

Autora:

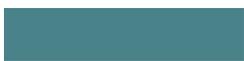
María Esther Laguna Bercero

Directora:

María Isabel Pérez Núñez

Tesis Doctoral

POTENCIAL REGENERATIVO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA FEMORAL



Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

La Doctora María Isabel Pérez Núñez, Profesora Asociada de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, CERTIFICA:

Que el presente trabajo de tesis doctoral que lleva por título “Potencial regenerativo de las células madre mesenquimales en un modelo experimental de fractura femoral”, de la Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Zaragoza, María Esther Laguna Bercero, ha sido realizado bajo su dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmo la presente en Santander, a 20 de abril de 2024.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'P. Núñez', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo.: Dra. M.ª Isabel Pérez Núñez

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

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral es parte de un proyecto de investigación que ha sido realizado gracias al trabajo de muchas personas. Muchísimas gracias a todos ellos.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis, Maribel. No puedo expresar en una frase todo lo que significa para mí. No solo es mi referente, admirando de ella su mente privilegiada y su capacidad de trabajo incansable. Me enorgullece poder decir que es mi amiga y compañera, por ese orden.

También a mi tutor el Dr. Riancho, al que agradezco enormemente haberme dado la oportunidad de pertenecer a este grupo de investigación y al que admiro profesionalmente.

A mi compañero Guillermo, con quien Maribel y yo hemos pasado muchas tardes operando a nuestros animales de experimentación.

A Álvaro, que ha colaborado en el procesado del estudio radiológico y el estudio estadístico.

A Carolina, encargada de recoger las muestras de los pacientes y cultivar las MSCs hasta estar listas para poder implantarlas en los ratones. Estando pendiente del laboratorio en todo momento.

Gracias a ambos, Álvaro y Carolina, por estar siempre dispuestos a despejar todas mis dudas.

Gracias a Alicia por encargarse del laboratorio cuando Carolina ha estado ausente.

También mi agradecimiento a Laura, que ha intervenido en otra parte de este proyecto.

Gracias a Miguel y el personal del SEEA por cuidar de los animales.

A los ingenieros del LADICIM, Diego y José, que llevaron a cabo la realización de las micro-TC.

A Remigio, anatomopatólogo encargado del estudio histológico de las muestras y su valoración. Gracias por enseñarme el laboratorio y la ejecución, paso a paso, de todo el procedimiento.

Gracias a mis padres Antonio y Ana. Porque me han hecho ser quien soy. Por su amor incondicional. Sé que una de las personas más orgullosas de la finalización de esta tesis es mi padre. Por fin, papá.

A mi hermano Miguel a quien también admiro.

Por último, gracias a Jesús y Daniel. Las personas más importantes de mi vida.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AP	Anatomía patológica
ARN	Ácido ribonucleico
BCP	Fosfato de calcio bifásico
BMD	Densidad mineral ósea
BMP	Proteína morfogenética ósea
BV/TV	Cociente volumen óseo / volumen de tejido total
C57BL/6	Cepa endogámica de ratón
CE	Conformidad europea
CFU-F	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos
COX	Ciclooxigenasa
CXCL13	Ligando 13 de la quimioquina CXC
DBM	Matriz ósea desmineralizada
DEXA	Absorciometría de rayos X de energía dual
Dkk1	Dickkopf 1
DMEM	Medio modificado de Eagle de Dulbecco
ESTROT	Sociedad europea de regeneración tisular en ortopedia y traumatología
ESWT	Terapia de ondas de choque extracorpóreas
ETV	Enfermedad tromboembólica venosa
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
FDG	Fluorodeoxiglucosa
FVB	Cepa de ratón albino endogámico que lleva el nombre de su susceptibilidad al virus de la leucemia B de Friend

Abreviaturas

Fz	Frizzled
G	<i>Gauge</i>
GDP-Fucosa	Guanosina difosfato-fucosa
GMP	Buenas prácticas de fabricación
H.E.	Hematoxilina eosina
HA	Hidroxiapatita
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank
HCELL	Ligando de células hematopoyéticas E y L-selectina
HECA-452	Anticuerpo monoclonal de rata, antiantígeno de linfocito cutáneo humano
HEPES	Ácido hidroxietilopiperacina-etanosulfónico
HLA	Antígeno leucocitario humano
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano-isotipo DR
i.m.	Intramedular
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleuquina
IQR	Rango intercuartílico
ISCT	Sociedad internacional de terapia celular
ITS	Insulina, transferrina y ácido selénico
LADICIM	Laboratorio de la división de ciencia e ingeniería de los materiales
LIPUS	Terapia de ultrasonidos pulsados de baja intensidad
LRP	Receptor relacionado con la lipoproteína de baja densidad
Micro-TC	Microtomografía computarizada
mir-21	Oncomicro-ARN
mRUST	Puntuación radiográfica de la consolidación para fracturas de tibia modificada
MSCs	Células madre mesenquimales

Abreviaturas

NOD/SCID	Cepa de ratón inmunodeficiente
NUSS	Sistema de puntuación de la no unión
OP-1	Proteína osteogénica-1
Osx	Osterix
P1NP	Propéptido N-terminal del procolágeno tipo I
PBS	Tampón fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PEMF	Campos electromagnéticos pulsados
PET	Tomografía por emisión de positrones
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
PLLA	Ácido poli-L-láctico
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMN	Polimorfonucleares
PTC	Prótesis total de cadera
PTH	Hormona paratiroidea
rhBMP	Proteína morfogenética ósea recombinante humana
RIA	Sistema de fresado, irrigación, aspiración
Runx2	Factor de transcripción 2 relacionado con Runt
RUST	Puntuación radiográfica de la consolidación para fracturas de tibia
SBF	Suero bovino fetal
SD	Desviación estándar
SEEA	Servicio de estabulación y experimentación animal
SEM/EDX	Microscopio óptico de barrido / rayos X de energía dispersiva

Abreviaturas

SNP	Polimorfismo de nucleótido único
TC	Tomografía computarizada
Tc99m-MDP	Tecnecio 99-metilen difosfonato
TCP	Fosfato tricálcico
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
UH	Unidades Hounsfield
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

1 RESUMEN	21
2 INTRODUCCIÓN	25
2.1 LA FRACTURA	27
2.1.1 INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA	27
2.1.2 CONSOLIDACIÓN DE LA FRACTURA	27
2.1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CONSOLIDACIÓN.....	32
2.1.4 ALTERACIONES DE LA CONSOLIDACIÓN: RETARDO DE CONSOLIDACIÓN Y PSEUDOARTROSIS	38
2.1.4.1 Clasificación de las pseudoartrosis	39
2.1.4.2 Criterios de consolidación de las fracturas y diagnóstico de los defectos de consolidación	40
2.1.4.3 Tratamiento de los defectos de consolidación	43
2.2 LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	49
2.2.1 DEFINICIÓN Y TIPOS DE CÉLULAS MADRE.....	49
2.2.2 HISTORIA DE LAS CELULAS MADRE MESENQUIMALES.....	51
2.2.3 CARACTERISTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	52
2.2.4 TEJIDOS FUENTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	55
2.2.5 PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	56
2.2.6 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA	58
2.2.7 CAPACIDAD TRÓFICA Y MIGRACION TRANSENDOTELIAL.....	59
2.2.8 MSCs PARA REGENERACIÓN ÓSEA	60
2.2.9 FUCOSILACIÓN	62

2.3 EL MODELO EXPERIMENTAL	63
2.3.1 GENERALIDADES	63
2.3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURAS	63
2.3.2.1 Diferencias entre especies animales.....	63
2.3.2.2 Diseño del modelo experimental de fractura	66
2.3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE RETARDO DE CONSOLIDACIÓN Y PSEUDOARTROSIS.....	69
2.3.3.1 Modelo de retardo de consolidación.....	69
2.3.3.2 Modelo de pseudoartrosis hipertrófica	69
2.3.3.3 Modelo de pseudoartrosis atrófica.....	70
3 JUSTIFICACIÓN	73
4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
5 MATERIAL Y MÉTODOS	81
5.1 DISEÑO DEL MODELO EXPERIMENTAL	83
5.1.1 ELECCIÓN DEL ANIMAL Y LA ESPECIE.....	83
5.1.2 CREACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA FEMORAL EN RATONES NOD/SCID	84
5.2 GRUPOS EXPERIMENTALES	86
5.3 AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANAS	88
5.3.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS MSCs.....	88
5.3.2 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS MSCs	90
5.4 FUCOSILACIÓN	91
5.4.1 PROTOCOLO DE FUCOSILACIÓN	91
5.4.2 VERIFICACIÓN DE LA FUCOSILACIÓN	92
5.4.3 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS FUCOSILADAS PARA INYECCIÓN EN EL RATÓN NOD/SCID	92

5.5 INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	93
5.5.1 ANESTESIA Y MANEJO DEL RATÓN NOD/SCID.....	93
5.5.2 TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	94
5.6 EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO	99
5.7 ESTUDIO RADIOLÓGICO	100
5.7.1 PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DE MICRO-TC, RECONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES.....	100
5.7.2 VALORACIÓN DEL ESTUDIO RADIOLÓGICO	102
5.8 ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	104
5.8.1 TÉCNICA HISTOLÓGICA	104
5.8.2 VALORACIÓN DEL ESTUDIO HISTOLÓGICO	106
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	109
6 RESULTADOS	111
6.1 EL MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA.....	114
6.1.1 ESTUDIO PILOTO PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA.....	114
6.1.2 ANÁLISIS DE LAS COMPLICACIONES.....	115
6.1.3 CONCLUSIONES DEL MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA.....	122
6.2 RESULTADOS DEL GRUPO C O GRUPO DE ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE MSCs FUCOSILADAS	123
6.3 RESULTADOS RADIOLÓGICOS.....	125
6.3.1 RESULTADOS DEL PARÁMETRO BV/TV	125
6.3.1.1 Puntuaciones del parámetro BV/TV.....	125
6.3.1.2 Administración sistémica de MSCs: comparación entre subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica) y 3 (artrosis).....	126
6.3.1.3 Administración local de MSCs: comparación entre subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica) y 3 (artrosis).....	127

6.3.1.4	Comparación entre grupos A (administración sistémica de MSCs) y B (administración local de MSCs).....	130
6.3.1.5	Resumen de los resultados del parámetro BV/TV callo + cortical y BV/TV callo	130
6.3.2	RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS CONSOLIDACIÓN Y CORTICALIZACIÓN	131
6.3.2.1	Puntuaciones de los parámetros consolidación y corticalización.....	131
6.3.2.2	Administración sistémica de MSCs: comparación entre subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica) y 3 (artrosis).....	132
6.3.2.3	Administración local de MSCs: comparación entre subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica) y 3 (artrosis).....	134
6.3.2.4	Comparación entre grupos A (administración sistémica de MSCs) y B (administración local de MSCs).....	136
6.3.2.5	Resumen de los resultados de consolidación y corticalización	136
6.4	RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	138
6.4.1	PUNTUACIONES DE LAS ESCALAS HISTOLÓGICAS	138
6.4.2	ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE MSCs: COMPARACIÓN ENTRE SUBGRUPOS 1 (CONTROL), 2 (FRACTURA OSTEOPORÓTICA) Y 3 (ARTROSIS).....	139
6.4.3	ADMINISTRACIÓN LOCAL DE MSCs: COMPARACIÓN ENTRE SUBGRUPOS 1 (CONTROL), 2 (FRACTURA OSTEOPORÓTICA) Y 3 (ARTROSIS).....	141
6.4.4	COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS A (ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE MSCs) Y B (ADMINISTRACIÓN LOCAL DE MSCs)	143
6.4.5	RESUMEN DE LOS RESULTADOS HISTOLÓGICOS	143
6.5	CORRELACIÓN ENTRE EL ESTUDIO RADIOLÓGICO Y EL ESTUDIO HISTOLÓGICO	144
6.6	CASOS DE RATONES NOD/SCID POR GRUPO DE TRATAMIENTO	145
7	DISCUSIÓN.....	147
7.1	EL MODELO EXPERIMENTAL	149
7.1.1	SELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	149

7.1.2	CREACIÓN DEL MODELO DE FRACTURA	151
7.1.2.1	Elección de la región anatómica a intervenir	151
7.1.2.2	Tipo de osteotomía	151
7.1.2.3	Método de fijación de la fractura	153
7.1.2.4	Métodos para alterar la consolidación	156
7.1.3	DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	157
7.2	TERAPIA CON MSCS Y CONSOLIDACIÓN EN MODELO EXPERIMENTAL	158
7.3	TERAPIA CON MSCs EN NUESTRO MODELO EXPERIMENTAL.....	168
7.3.1	GENERALIDADES DEL TRATAMIENTO CON MSCs PARA LA CONSOLIDACIÓN... ..	168
7.3.2	ORIGEN DE LAS MSCs.....	171
7.3.2.1	MSCs humanas de pacientes con fractura osteoporótica	172
7.3.2.2	MSCs humanas de pacientes con fractura osteoporótica comparadas con MSCs humanas de pacientes con artrosis	175
7.3.2.3	El papel de la inmunidad en el trasplante de MSCs.....	177
7.3.3	VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE LAS MSCs	181
7.3.3.1	Administración sistémica de MSCs	181
7.3.3.2	Administración local de MSCs.....	184
7.3.3.3	El papel de las matrices osteoconductoras o <i>scaffolds</i>	185
7.3.4	EVALUACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN MEDIANTE ESTUDIO RADIOLÓGICO	187
7.3.5	EVALUACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN MEDIANTE ESTUDIO HISTOLÓGICO	189
7.4	TERAPIA CON MSCs PARA CONSOLIDACIÓN EN HUMANOS.....	191
7.5	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	200
7.6	APORTACIONES DE ESTA TESIS Y PERSPECTIVAS FUTURAS	201
8	CONCLUSIONES	203
9	BIBLIOGRAFÍA.....	207
10	ANEXOS	237

1 RESUMEN

1 RESUMEN

El hueso representa uno de los pocos tejidos humanos adultos que se reparan con la formación de un tejido óseo original, es decir, sin la formación de un tejido cicatricial. Podríamos decir que se asemeja a una regeneración tisular, esto indica que las células y señales moleculares que conducen a la formación del nuevo tejido están todavía presentes en el hueso adulto.

La consolidación después de una fractura, es un proceso complejo y perfectamente orquestado que consta de varias fases biológicas. Cuando fracasa la consolidación aparecen complicaciones como el retardo de consolidación o la pseudoartrosis. Debido al aumento de fracturas, pero además otros factores como el envejecimiento de la población y enfermedades crónicas como la osteoporosis, el porcentaje de estas complicaciones también está en ascenso.

El tratamiento de la pseudoartrosis constituye un reto para los pacientes y los especialistas que la tratan, con tiempos de curación prolongados, consumo de recursos y abordajes de tratamiento complejos. Cuando fracasan los tratamientos estándar tenemos que buscar alternativas terapéuticas para potenciar o estimular este proceso reparativo. Dentro de estas alternativas tenemos las terapias celulares como son los tratamientos con células madre mesenquimales (MSCs). Las MSCs son células pluripotenciales que conservan la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares incluyendo los osteoblastos, que finalmente formarán tejido óseo. Por esta razón son candidatas de gran interés para la medicina regenerativa. La fuente natural de las MSCs es la médula ósea, donde pueden aislarse fácilmente y, aunque se encuentran en una pequeña proporción, se pueden expandir en cultivo.

Es habitual estudiar la función de las MSCs humanas en trasplantes realizados en modelos de experimentación. Estas células son capaces de formar tejido óseo en el tejido celular subcutáneo de ratones y en este trabajo se estudia la capacidad de consolidación en un modelo de fractura femoral en ratones NOD/SCID. Como consecuencia de su sistema inmunológico casi completamente ausente, estos ratones son perfectos para experimentos de transferencia celular, ya que vamos a administrar células humanas sin observar rechazo inmunológico. Las MSCs se obtienen de cilindros de cabezas femorales de pacientes sometidos a cirugía de sustitución protésica, diferenciando dos orígenes, fractura de cadera osteoporótica y coxartrosis. Por una parte, queremos estudiar si las MSCs de individuos osteoporóticos conservan las capacidades regenerativas, debido a que, en la osteoporosis, el número y la función de los precursores osteoblásticos pueden verse disminuidos. Como por razones éticas y prácticas no dispusimos de individuos sanos, las comparamos con MSCs de individuos con artrosis, puesto que parecen conservar estas capacidades regenerativas.

El cultivo de las células humanas se inyecta en los ratones NOD/SCID a los que previamente se ha realizado una osteotomía diafisaria femoral que se estabiliza mediante enclavado intramedular con aguja de 27 G, además, se cauteriza el periostio alrededor del foco de fractura para ralentizar el proceso de consolidación ósea. La administración celular para valorar la capacidad de consolidación se lleva a cabo mediante administración sistémica a nivel del seno retroorbitario y mediante administración local en el foco de fractura, comparando ambas administraciones. El estudio de consolidación se realiza mediante estudio radiológico con micro-TC y estudio histológico.

Nuestros resultados *in vivo* no muestran una clara mejoría en la consolidación ósea mediada por MSCs, independientemente de su origen (MSCs cultivadas de pacientes con fractura osteoporótica o de artrosis) y de su vía de administración (sistémica o local en el foco de fractura). Sin embargo, encontramos una disminución inesperada de consolidación cuando las MSCs se obtienen de pacientes con artrosis, especialmente cuando las células son administradas de forma sistémica. Aunque no conocemos los mecanismos implicados, podría estar relacionado con fenómenos inmunes.

Sin embargo, y de forma global, nuestros resultados muestran que las MSCs de pacientes con osteoporosis conservan las capacidades de regeneración ósea cuando se las compara con MSCs de pacientes con artrosis. Por ello, a pesar del potencial efecto negativo de la osteoporosis en la función de las MSCs, podrían ser igualmente válidas para las terapias regenerativas, al mantener sus funciones conservadas.

2 INTRODUCCIÓN

2 INTRODUCCIÓN

2.1 LA FRACTURA

2.1.1 INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

El tratamiento integral de las fracturas tiene como objetivo la consolidación ósea en un espacio de tiempo lo más corto posible y con la mejor recuperación funcional. Sin embargo, el porcentaje global de fracturas que desarrollan retardo de consolidación o pseudoartrosis es del 5-10 % (1, 2), aunque las tasas son variables según la localización y el tipo de fractura (3). Teniendo en cuenta el volumen total de fracturas, este fracaso del proceso de consolidación supone un gran impacto clínico y económico, con un incremento de la morbilidad, hospitalizaciones de repetición y un consumo de recursos significativo (4).

El envejecimiento de la población conlleva un incremento del riesgo de caídas y, por tanto, de fracturas, en estas personas que ya tienen una capacidad de regeneración ósea limitada (5). La osteoporosis también aumenta el riesgo de fracturas por fragilidad, pero el papel que tiene esta enfermedad, por sí misma, en la alteración del mecanismo de consolidación es menos claro (6). Estos dos factores, edad avanzada y osteoporosis, hacen que las complicaciones derivadas de la consolidación se den con mayor frecuencia.

El tratamiento de la pseudoartrosis es uno de los mayores retos a los que un cirujano debe enfrentarse. Debido a la complejidad en el tratamiento y a que es una patología en aumento, se están investigando alternativas terapéuticas como es el tratamiento con células madre mesenquimales (MSCs).

2.1.2 CONSOLIDACIÓN DE LA FRACTURA

El tejido óseo posee una capacidad innata de autorreparación después de una fractura, representando uno de los pocos tejidos humanos que pueden curar sin la formación de una cicatriz, es decir, se asemeja a una regeneración tisular (7). Este proceso de consolidación se considera que recapitula los eventos que ocurren durante la embriogénesis de la formación ósea, lo que indica que las células y señales moleculares están todavía presentes en el hueso adulto (8). La remodelación del callo óseo también es importante para la reparación de la fractura, resultando en un hueso de calidad y fuerza comparable al estado prefractura (9). Además, el tejido óseo no solo se va a recuperar de su fracaso estructural, sino también de la pérdida fisiológica de función, al estar involucrado en procesos endocrinos y homeostáticos (10, 11).

La consolidación ósea es un proceso complejo en el que intervienen diferentes tipos de células y matriz extracelular, además de numerosas señales moleculares. Cualquier alteración en esta cascada de la consolidación puede resultar en un retardo de consolidación o pseudoartrosis. Para buscar soluciones a estas complicaciones es preciso conocer detalladamente cómo consolida el hueso y qué factores pueden interferir en el proceso (12).

Los dos pilares básicos que condicionan la consolidación son: la estabilidad del foco, definida por la deformabilidad o movilidad entre los fragmentos; y la vascularización, definida por la tensión local de oxígeno. Así, se nos presentan tres escenarios. El primero, con deformabilidad baja y alta tensión de oxígeno, en el que se va a formar tejido óseo por osificación intramembranosa; es la denominada consolidación directa. Un segundo escenario con deformabilidad intermedia y baja tensión de oxígeno, que va a formar tejido cartilaginoso por osificación endcondral; es la denominada consolidación indirecta. Por último, un tercer escenario con deformabilidad alta en el que se va a formar tejido fibroso y, debido a esto, no se va a producir consolidación. En la osificación intramembranosa, la formación de hueso es directa. En la osificación endcondral, la formación de hueso es a través de un intermediario cartilaginoso (3).

La consolidación de la fractura se divide, tradicionalmente, en varias fases biológicas que siguen un orden cronológico. Aunque estas fases ayudan a comprender la biología de la reparación de la fractura, no pueden separarse estrictamente, es decir, pueden ocurrir simultáneamente en diferentes sitios y a diferentes ritmos en el callo de fractura (9, 13) (figura 1).

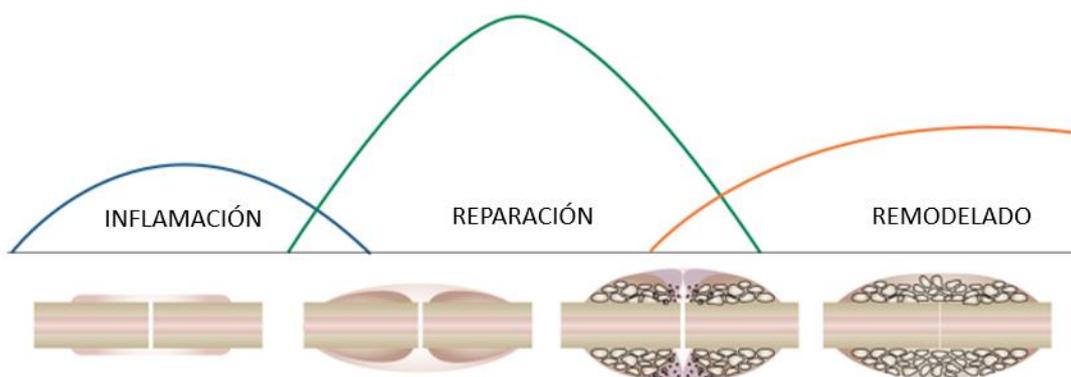


Figura 1. Esquema que representa las tres fases principales de la consolidación de las fracturas. Se aprecia que existe un solapamiento entre ellas. Imagen adaptada de Claes 2012 (13).

Las fases de la consolidación ósea son las siguientes:

1. Fase de formación de hematoma y respuesta inflamatoria aguda

Debido a la fractura y a la disrupción vascular, se forma un hematoma local que es una fuente de moléculas de señalización para activar la cascada de la consolidación. Añadido al traumatismo inicial, y de forma temporal, la hipoxia local causa necrosis de los tejidos blandos adyacentes y extremos óseos fracturarios. Este daño de los tejidos lleva consigo el reclutamiento de macrófagos que, con efecto fagocítico local, eliminan el hueso y tejido necrótico a nivel de la fractura. También se crea un entorno inflamatorio que se caracteriza por aumento del flujo sanguíneo y permeabilidad vascular, lo que promueve la afluencia de células proinflamatorias y producción aumentada de citoquinas (9). De esta forma, se promueve la migración de células mesenquimales desde el periostio y endostio. La formación del hematoma es esencial para la adecuada consolidación y se caracteriza por una elevada potencia osteogénica.

2. Fase de proliferación y diferenciación celular

Es una fase reparadora donde se va a formar el callo blando de fractura. Mientras el proceso de inflamación va declinando, la fase de reparación comienza en paralelo con la formación de tejido de granulación. Las células mesenquimales emergen y se diferencian a fibroblastos, estos producen proteínas de matriz extracelular como el colágeno tipo I y II. Las MSCs también se diferencian a células condrogénicas y osteogénicas para formar el callo blando. Esto provee el primer grado de estabilidad mecánica al callo de fractura.

Como ya se ha comentado, el tipo de osificación depende de la tensión de oxígeno. En la parte periférica de la fractura, con alta tensión de oxígeno, se produce mayor diferenciación a osteoblastos. Esta osteoblastogénesis es inducida preferentemente en el periostio, donde comienza la **osificación intramembranosa**. El proceso incluye la deposición de osteoide directamente de los osteoblastos que más tarde se convierte en hueso mineralizado. Por otra parte, en la zona central del callo y con baja tensión de oxígeno, se produce la **osificación endondral**. Este modelo de osificación incluye pasos secuenciales de condrogénesis por medio de diferenciación celular. Así se forma un callo cartilaginoso que puentea los extremos óseos, formado por condrocitos hipertróficos y cartílago, compuesto predominantemente por colágeno tipo II. La estabilidad ahora formada proporciona un ambiente mecánico que permite el crecimiento vascular (10). Además, esta fase se desarrolla en un ambiente ácido que impide la mineralización precoz.

3. Fase de osificación

Una vez formado el callo blando, se va a mineralizar, lo que se consigue por la incorporación de fosfato cálcico a la matriz extracelular. Los dos tipos de osificación, intramembranosa y endondral, ocurren en distintas condiciones, pero simultáneamente en diferentes zonas del

foco de fractura. En la osificación intramembranosa, las MSCs se diferencian a osteoblastos y producen matriz extracelular, que está principalmente compuesta por colágeno tipo I y otras proteínas específicas como la osteocalcina. Los osteoblastos depositan cristales de fosfato cálcico quedando atrapados en la matriz, ahora calcificada, y terminan diferenciándose a osteocitos mecanosensitivos. En contraste, la consolidación en la osificación endcondral se consigue a través de cartílago intermedio. Aquí, los condrocitos diferenciados de las MSCs producen matriz condrogénica que puentea la fractura. Los condrocitos hipertróficos del callo blando liberan vesículas que contienen proteasas para degradar la matriz y fosfatasas alcalinas que van a favorecer la mineralización y calcificación del callo. Eventualmente, los condrocitos se someten a apoptosis, mientras que el tejido cartilaginoso, rico en colágeno tipo II, es enzimáticamente degradado y reemplazado por tejido óseo, que contiene predominantemente colágeno tipo I. El crecimiento vascular en el foco de fractura incrementa el nivel de oxígeno, lo que favorece la diferenciación celular a osteoblastos y osteoclastos. Al final de esta fase, la fractura está consolidada y la construcción es entonces rígida (10).

4. Fase de remodelado óseo

Independientemente de la vía de consolidación, lo primero que se crea es un hueso inmaduro o fibrilar. Este tejido tiene una orientación aleatoria de las fibras de colágeno y el tejido mineralizado, siendo mecánicamente inferior. Después, debe ser remodelado para orientar las trabéculas y la cortical según la carga, convirtiéndose de esta forma en hueso maduro o laminar, que es mecánicamente competente. De forma similar a lo que ocurre en el hueso sano, en el que el 10 % del hueso es reemplazado y remodelado al año, la transición del hueso inmaduro o fibrilar al hueso maduro o laminar es mediado por la actividad balanceada de los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Este proceso se asocia con cambios finales en la arquitectura, de forma que el hueso adapta su forma a las demandas mecánicas requeridas (figura 2).

Introducción

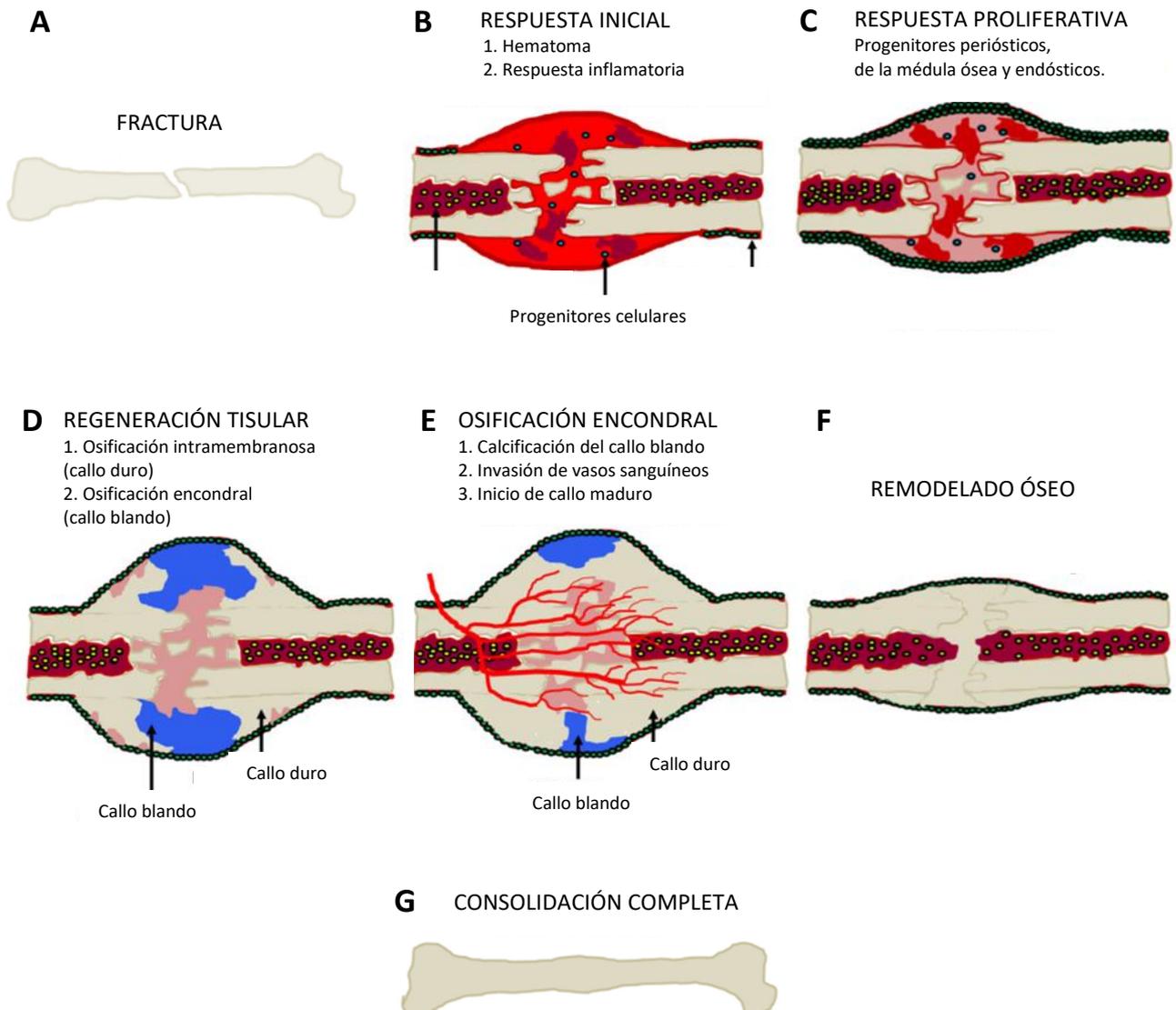


Figura 2 A-G. Fases de la consolidación ósea. **(A)** Después de una fractura, **(B)** la respuesta inicial de la lesión incluye la formación de un hematoma y el inicio de la respuesta inflamatoria. **(C)** En la fase de proliferación se activan los progenitores del periostio, médula ósea y endostio. **(D)** Debido a la diferenciación celular, tiene lugar la regeneración tisular o consolidación, que puede ser por osificación intramembranosa o encondral. **(E)** En la fase de osificación, el callo cartilaginoso se va a calcificar, lo que permitirá la formación de hueso maduro. También es invadido por vasos sanguíneos. **(F)** La reparación ocurre cuando la fractura se puentea con tejido calcificado y se completará con el remodelado óseo. **(G)** Consolidación completa. Imagen adaptada de Hadjiargyrou 2014 (14).

2.1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CONSOLIDACIÓN

Los factores que están implicados en la consolidación de las fracturas los podemos dividir en cuatro categorías: factores relacionados con el paciente, factores ambientales, características de la lesión y factores relacionados con la modalidad del tratamiento.

A. FACTORES RELACIONADOS CON EL PACIENTE

A.1. GENÉTICA

Cualquier alteración en la expresión de los genes y señales moleculares implicados en el proceso de la consolidación, puede afectar a la formación ósea. En concreto, se asocian a un riesgo significativamente estadístico de producir pseudoartrosis, dos polimorfismos de nucleótido único (SNP) de los genes que codifican dos moléculas inhibitorias de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs): Noggin y Smad6. También algún polimorfismo específico del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (15-17).

Existe una evidencia emergente de la predisposición genética para el desarrollo de pseudoartrosis y, aunque los datos en humanos son limitados (18), se estudia cómo estos biomarcadores o test genéticos predictivos pueden ayudar a la toma de decisiones (19, 20).

A.2. EDAD

El retardo de la consolidación en los pacientes ancianos se ha atribuido a un descenso del número de MSCs, que además tienen menor capacidad de división y diferenciación. También se debe a una alteración de la vascularización y a niveles más bajos de factores de crecimiento (6, 21). Aun teniendo en cuenta estos datos, es difícil determinar si la edad, como factor independiente, juega un papel significativo para el desarrollo de alteraciones en la consolidación (5).

A.3. FACTORES METABÓLICOS, ENDOCRINOS Y OTROS FACTORES SISTÉMICOS

- Metabolismo del Calcio y Vitamina D

El calcio y la vitamina D son esenciales para mantener la salud ósea. Su deficiencia es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la osteoporosis. También es probable que desempeñen un papel clave en la consolidación de las fracturas, debido a que se requieren cantidades suficientes de calcio para la mineralización del callo óseo y a que el papel de la vitamina D es esencial en la homeostasis del calcio (22).

Estas acciones clásicas de la vitamina D en la regulación del calcio están bien documentadas, pero se sabe menos sobre su papel en la consolidación (23). La insuficiencia de vitamina D causa hiperparatiroidismo secundario que conduce a un estado de recambio óseo elevado,

movilizando el calcio del hueso y afectando negativamente a la consolidación. Tanto el déficit de vitamina D como de calcio, se correlacionan con riesgo de desarrollar pseudoartrosis después de una fractura (23, 24), siendo más acusado en los pacientes osteoporóticos (22).

La prevalencia de la deficiencia de vitamina D ha alcanzado proporciones epidémicas. Gran parte de la literatura científica en relación con las fracturas se centra en el efecto de la vitamina D en la prevención del riesgo. La suplementación con vitamina D parece reducir el riesgo de fracturas en los ancianos (25, 26), no obstante, ha sido cuestionado por algunos autores (27).

Son varios los estudios acerca del efecto de la vitamina D en la consolidación ósea (23, 28, 29), pero aunque el mecanismo es poco conocido, sí se ha constatado que existe una alta prevalencia de hipovitaminosis D en pacientes con fracturas. Si la vitamina D mostrara un efecto positivo en la reducción de las complicaciones de las fracturas, ésta sería una opción preventiva altamente efectiva. Sin embargo, las conclusiones de diferentes revisiones sistemáticas, que son recopiladas por Gatt en 2023, nos informan de que la administración rutinaria de suplementos de vitamina D aislada, en el momento del diagnóstico de una fractura, no confiere ningún beneficio adicional (30).

Otro autor, Fischer, insiste en que el calcio, que es necesario para la mineralización del callo, se moviliza desde otra parte del esqueleto para garantizar la consolidación, ya que el suministro únicamente por la dieta no satisface las necesidades de calcio para la consolidación. Este aumento de la pérdida ósea postraumática podría exacerbar la osteoporosis y explica el riesgo tres veces mayor de fracturas secundarias. Es importante destacar que los datos experimentales muestran que la suplementación con calcio y vitamina D, iniciada después de la fractura y continuada durante todo el proceso de curación, no solo mejora la regeneración ósea, sino que previene la pérdida ósea postraumática. Según este investigador, los hallazgos implican un alto potencial de la suplementación con calcio y vitamina D, pero hay una escasez de investigaciones clínicas al respecto (22).

- Osteoporosis

La osteoporosis es una alteración del metabolismo óseo que aumenta el riesgo de fracturas, particularmente en la edad avanzada. A pesar de esta evidencia, habría que documentar si la disminución de la calidad ósea influye en el proceso de consolidación y, por esta razón, en el desarrollo de pseudoartrosis (3).

Como la osteoporosis está íntimamente relacionada con la edad, es difícil separar la influencia individual de ambas en la consolidación de las fracturas. El mecanismo por el que podría estar alterada la consolidación en la osteoporosis es multifactorial, entre el que se encuentra la disminución de la sensibilidad de los osteoblastos a las señales mecánicas, la disminución de las células osteoprogenitoras y la alteración de las señales moleculares (6). También hay que tener en cuenta la menor estabilidad mecánica de los implantes en el

hueso osteoporótico, siendo otro factor añadido que influye en la evolución final. Otro objeto de debate es cómo los diferentes tratamientos para la osteoporosis pueden interferir en el proceso de consolidación.

- **Diabetes Mellitus**

En ambos tipos de diabetes, tipo 1 y tipo 2, están aumentados tanto el riesgo de padecer fracturas como las alteraciones en el proceso de consolidación (24).

La etiología es multifactorial e incluye un pobre reclutamiento y diferenciación de las MSCs, desbalance entre la actividad osteoblástica y osteoclástica, además de la alteración en la síntesis de colágeno tipo I por la glicosilación no enzimática. Tanto la neuropatía como la vasculopatía periféricas que presentan estos pacientes, alteran la microarquitectura del hueso y asocian alteraciones en la consolidación (3, 16). También está aumentado el riesgo de infección (24).

En pacientes diabéticos con fracturas, es necesario un control adecuado del nivel de glucemia para tratar de evitar complicaciones durante el proceso de consolidación (5).

- **Hipoalbuminemia y malnutrición proteica**

En los estados de malnutrición existe una peor movilización de los aminoácidos necesarios para la formación del callo, lo que influye en la consolidación ósea. Si bien es cierto que los requerimientos metabólicos están aumentados durante el proceso de consolidación, no se ha demostrado que la suplementación de la dieta con proteínas, calcio u otros elementos, aparte de la recomendación diaria, aumenten el proceso de consolidación (24).

La anemia por deficiencia de hierro se asocia a retardo de consolidación y pseudoartrosis, esto se explica por la menor capacidad de transporte de oxígeno. Además, el callo óseo que se forma tiene menor resistencia mecánica (24).

- **Obesidad**

La gente obesa está predispuesta a lesiones musculoesqueléticas y a una tasa aumentada de complicaciones. Las dificultades técnicas para la reducción de la fractura y mantener la estabilidad con la osteosíntesis, pueden influir en el fracaso de la consolidación (16).

- **Otras anomalías endocrinas**

Como la disfunción tiroidea, paratiroidea, hipofisaria o de las hormonas reproductoras sexuales (24).

- **Enfermedades inflamatorias crónicas**

Como la artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico (21).

- Infección por VIH

Este virus parece afectar al recambio óseo, en concreto, mediante la inhibición de la formación ósea. Uno de los mecanismos por los que ejerce este efecto es mediante modulación de la superfamilia del TNF (factor de necrosis tumoral) (31). En estos pacientes hay una alteración de las citoquinas de forma crónica, dado que la infección por VIH es una infección controlable con el uso de fármacos antirretrovirales.

B. FACTORES AMBIENTALES

B.1. TABACO

El tabaco es el factor modificable dependiente del paciente mejor documentado. Se relaciona con la pseudoartrosis y largos tiempos de consolidación (21).

La nicotina es un potente vasoconstrictor con efecto en la microcirculación periférica, también inhibe la secreción del TNF- α que activa la ruta antiinflamatoria colinérgica. El monóxido de carbono reduce la capacidad del transporte de oxígeno en sangre y el cianuro de hidrógeno inhibe la citocromo-oxidasa, impidiendo el metabolismo aeróbico. Estos factores llevan a disminución de la perfusión tisular y, consecuentemente, hipoxia e isquemia, por lo que se ve alterado el proceso de consolidación (3, 16). Todo esto es más evidente en condiciones de compromiso de la vascularización, como en el caso de fracturas por alta energía o fracturas abiertas.

En el caso de procedimientos electivos, como artrodesis, se recomienda la abstención del hábito tabáquico en los 6 meses previos. Si no se puede elegir, como es el caso de las fracturas, también se considera que el cese del hábito es beneficioso para la consolidación (3, 32).

B.2. FARMACOLÓGICOS

Varios fármacos alteran la consolidación de las fracturas.

- Corticoides

Los corticoides dirigen a los osteoblastos y osteocitos a la apoptosis, inhiben la actividad osteoblástica y esto disminuye la síntesis de matriz. También aumentan la resorción ósea y disminuyen la absorción intestinal de calcio. A corto plazo no tienen efecto inhibitorio en la consolidación, pero a largo plazo producen osteoporosis, riesgo aumentado de fracturas y alteraciones en la consolidación (5, 24).

- Antibióticos

Antibióticos relacionados con alteraciones en la consolidación ósea o mantenimiento del cartílago son las quinolonas, aminoglucósidos como tobramicina o gentamicina, tetraciclinas y rifampicina (16). Estos antibióticos deberían ser evitados cuando tratamos las fracturas, aunque no siempre es posible (24).

- AINES

Existe gran variabilidad en la bibliografía acerca de la influencia de los AINES en la consolidación ósea. Los AINES inhiben ambas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), con diferente grado de selectividad dependiendo del tipo de fármaco. Las ciclooxigenasas juegan un papel de regulación en la cascada de la consolidación, particularmente en la fase inflamatoria temprana, en concreto la COX-2 es determinante para la inducción de los osteoblastos.

Debido al mecanismo de acción de estos fármacos, es razonable predecir que su administración pueda afectar en la consolidación de las fracturas. Desde el punto de vista clínico, los pacientes generalmente reciben tratamientos a corto plazo (de 3 a 30 días) y el efecto perjudicial para la consolidación parece ser reversible después de la finalización de su administración (33, 34). Por el contrario, aunque los datos son limitados, sí hay mayores tasas de pseudoartrosis en pacientes a los que se administran AINES de forma prolongada (más de 4 semanas) (3, 16). Al menos, como recomendación, se debería tener precaución cuando se administran estos fármacos en pacientes con riesgo elevado de fracaso en la consolidación (24, 34).

La asociación entre AINES y pseudoartrosis está fuertemente relacionada con la edad del paciente y no tiene efecto negativo en la edad pediátrica (34).

- Quimioterápicos

Los quimioterápicos afectan a la neovascularización, a la propia formación del callo y a la incorporación de injerto autólogo en el huésped.

- Anticoagulantes

Es importante conocer el mecanismo de estos fármacos porque se utilizan como profilaxis de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV) en las fracturas.

Los anticoagulantes se unen al endotelio vascular e interrumpen la transformación de los pericitos a células osteoprogenitoras. También alteran el hematoma interfragmentario y aumentan la citotoxicidad de las células del callo óseo, lo que retrasaría la reparación de la fractura. Estos efectos se atribuyen, sobre todo, a las heparinas no fraccionadas y a la warfarina. Sin embargo, las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y el rivaroxabán, parecen no tener efecto, o ser éste muy leve, en el proceso de consolidación. Por este motivo

serían de elección (24), de hecho, son las HBPM las que se utilizan en nuestro medio como profilaxis de la ETV.

B.3. ALCOHOL

Su efecto nocivo en la consolidación está peor documentado que el hábito tabáquico. El estrés oxidativo que provoca el alcohol antagoniza la diferenciación de MSCs para la reparación ósea, por lo que se retrasa el desarrollo del callo, está menos mineralizado y tiene menor estabilidad mecánica (16, 24). Además, las personas que abusan del alcohol tienen un riesgo aumentado de desarrollo de osteoporosis y, por consiguiente, más riesgo de sufrir fracturas.

C. CARACTERÍSTICAS DE LA LESIÓN Y FACTORES RELACIONADOS

El impacto del traumatismo (sea de alta o baja energía), la lesión vascular acompañante, la alteración de los tejidos blandos, el hecho de que sea una fractura abierta (posibilidad de contaminación y pérdida del hematoma fracturario), localización de la fractura con mayor predisposición de pseudoartrosis (diáfisis tibial, escafoides, odontoides, astrágalo...) (3, 21), segmento óseo afectado (las fracturas metafisarias al estar bien vascularizadas consolidan mejor) y las características del trazo de fractura, son algunos de los factores que influyen en la consolidación de la fractura (16).

La coexistencia de una infección, lo que da lugar a la entidad de pseudoartrosis infectada, es uno de los factores más importantes que impide la consolidación de una fractura. La infección es lo primero que debemos descartar ante la ausencia de consolidación. Puede estar presente hasta en el 40 % de las pseudoartrosis y se manifiesta como infección latente en el 5 % de los casos, es decir, sin clínica acompañante ni anomalías en los parámetros analíticos (35).

D. FACTORES RELACIONADOS CON LA MODALIDAD DE TRATAMIENTO

Es esencial una técnica quirúrgica cuidadosa, con un manejo adecuado de los tejidos blandos y preservación de la vascularización, siendo preferibles las técnicas percutáneas (16, 19, 36). También es importante la correcta elección de los implantes para conseguir la estabilidad apropiada para cada fractura, rígida o elástica (19, 36). Además, se debe realizar una pauta postoperatoria idónea en cuanto a tiempos de inmovilización y descarga, cuando sean necesarios (16). Todos estos factores pueden influir en la consolidación.

2.1.4 ALTERACIONES DE LA CONSOLIDACIÓN: RETARDO DE CONSOLIDACIÓN Y PSEUDOARTROSIS

La consolidación es un proceso largo, complejo y continuo, por lo que es muy difícil determinar un punto de inflexión en el cual pasar de fractura sin consolidar a fractura consolidada. El tiempo de consolidación es variable y depende de la localización, tipo de fractura y gravedad. Pero puede verse influenciado por numerosos factores.

Cuando se altera o fracasa el proceso de consolidación de una fractura, aparecen las entidades de retardo de consolidación y pseudoartrosis.

Podemos definir retardo de consolidación cuando la fractura tarda en consolidar más de lo normal, pero finalmente lo hace. Es decir, la consolidación ocurre, pero en un periodo de tiempo mayor a lo esperado para el tipo concreto de fractura. Como podemos observar, esta definición queda abierta a la hora de definir un marco temporal, aunque de forma general asumimos de 3 a 6 meses (37). Por el contrario, en la ausencia de consolidación hay un cese de todo proceso reparativo y esto conlleva la no curación de la fractura.

La palabra pseudoartrosis deriva del griego y significa falsa articulación. En algunos textos se considera pseudoartrosis como sinónimo de ausencia de consolidación y en otros, como un subtipo de ésta. Al detenerse la consolidación se cierra la medular ósea, aparece un tejido fibroso denso que comunica ambos extremos óseos e incluso surge una cavidad fibrocartilaginosa recubierta por una membrana pseudosinovial.

A partir de ahora nos referiremos indistintamente con ambos términos, ausencia de consolidación o pseudoartrosis, para denominar la no consolidación.

Existen varias definiciones de pseudoartrosis. La *European Society of Tissue Regeneration in Orthopedics and Traumatology* (ESTROT) define pseudoartrosis como una fractura que no consolidará a no ser que se actúe terapéuticamente sobre ella, independientemente de la duración de los tratamientos previos. De acuerdo con la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos (FDA), una pseudoartrosis se define cuando una fractura no ha consolidado después de 9 meses de su producción y no evidencia progresión de la consolidación en, al menos, 3 meses (9, 21, 38).

2.1.4.1 Clasificación de las pseudoartrosis

Clásicamente se describe la **clasificación de Weber-Cech** de 1976, que divide las pseudoartrosis en dos grandes grupos (39).

- **Pseudoartrosis viable o vascular**, que incluye:
 - **Pseudoartrosis hipertrófica o hipervascular**: tiene un excelente potencial de consolidación debido a un exuberante callo en formación e hipervascularización. En el foco de fractura aparece un amplio callo cartilaginoso, pero sin existencia de puentes óseos. Todo esto indica falta de estabilidad, aunque buena biología.
 - **Pseudoartrosis oligotrófica**: la formación de callo es incompleta, pero tiene vascularización. Contempla un espectro intermedio entre la pseudoartrosis hipertrófica y la atrófica (3, 21, 38).
- **Pseudoartrosis no viable, atrófica o avascular**: es la que tiene callo mínimo o ausente, y deficiencia de vascularización ósea. Esto indica pobre respuesta biológica. La etiología es múltiple e incluye lesión grave de los factores locales intrínsecos del foco de fractura. Como resultado, existe una disrupción del proceso fundamental de la consolidación.

El tratamiento de elección difiere para ambos tipos. En las pseudoartrosis hipervasculares se ha de optimizar la fijación de la fractura para aumentar la estabilidad, puesto que el soporte biológico permanece intacto; mientras que en las pseudoartrosis avasculares hay que añadir algún tipo de terapia adicional para estimular la biología (3).

Con posterioridad se han ideado nuevas clasificaciones. La clasificación ideal debería dar información suficiente para orientar el tratamiento en función de la gravedad y unificar los criterios para el consenso entre los especialistas.

En el año 2008, Calori y colaboradores desarrollaron la **escala NUSS (Non-Union Scoring System)** (38). En esta escala se consideran diversos parámetros que tienen en cuenta no solo las características radiológicas, sino también la situación biológica del paciente y parámetros analíticos. De esta manera se obtiene una puntuación de 0 a 100 y se establecen cuatro categorías por orden de gravedad. En función de la puntuación se asigna una estrategia de tratamiento. Esta clasificación ha demostrado su fiabilidad, mostrando acuerdo sustancial interobservador y una clara relación entre el tratamiento y la gravedad otorgada por la puntuación (40).

2.1.4.2 Criterios de consolidación de las fracturas y diagnóstico de los defectos de consolidación

La consolidación de la fractura se define por la combinación de criterios clínicos y radiológicos.

Los **marcadores clínicos** para valorar la consolidación incluyen la resolución del dolor en el lugar de la fractura, ausencia de movilidad patológica y la capacidad de soportar la carga con dicha extremidad (21, 37).

Dentro de los **criterios radiológicos**, la formación y crecimiento de un callo externo, así como la aparición de puentes óseos en la fractura, son los elementos más rápidamente reconocibles (10, 21). Por el contrario, la persistencia de línea de fractura, ausencia de puentes óseos, falta de progresión de la consolidación en radiografías seriadas, deformidad progresiva y la presencia de aflojamiento o rotura de los implantes; se asocian con ausencia de consolidación (10, 41).

La radiografía y la tomografía computarizada (TC) son las herramientas más frecuentemente utilizadas para esta valoración, estando también la ecografía.

La **radiografía simple** es un método diagnóstico económico, que tiene buena disponibilidad y bajo perfil de radiación.

Otra prueba diagnóstica empleada es la **tomografía computarizada multicorte (TC multicorte)**. Detecta la formación de callo externo antes que la radiografía, pero no se usa de forma rutinaria por su mayor coste y perfil de radiación. La TC estaría indicada en pacientes con dudas de consolidación clínica y radiográfica a partir de los 3 meses tras la fractura, en fracturas con riesgo de necrosis avascular o para evaluar la consolidación previamente a la retirada de un implante (37). Esta prueba es el estándar oro en el diagnóstico de las pseudoartrosis, dado que aporta el carácter tridimensional y es más precisa a la hora de valorar la consolidación de las cuatro corticales. Un inconveniente de la TC es el artefacto que se produce si existen implantes metálicos que generan baja calidad de las imágenes.

Asegurar la consolidación de la fractura continúa siendo un desafío, por eso se han propuesto varios sistemas de puntuación que puedan ser reproducibles (42). Para determinar de una manera objetiva la existencia de consolidación se desarrolló la **escala RUST (Radiographic Union Score for Tibia Fractures)**, si bien Whelan la definió inicialmente para valorar la consolidación de fracturas de tibia tratadas con clavo intramedular (43). Se valora la consolidación de la fractura en las cuatro corticales (0-3 puntos), en radiografías anteroposterior y lateral. Se otorga un mínimo de puntuación de 4 puntos (sin consolidación) y un máximo de 12 puntos (consolidación completa).

Litrenta propone una **modificación de la escala RUST** (mRUST) añadiendo una categoría de consolidación (4 en vez de 3), así describe de forma más precisa el proceso radiográfico que finalmente lleva a la consolidación. El rango de puntuación va ahora desde 4 puntos (sin callo en ninguna de las corticales) hasta 16 puntos (remodelado completo de las 4 corticales) (44). De esta forma mejora el acuerdo interobservador y la precisión de la consolidación.

En líneas generales, y extrapolando la escala RUST modificada, un valor mínimo de consolidación corresponde a puente en el callo de fractura en 3 de las 4 corticales (21, 44).

Un paso más para mejorar las clasificaciones existentes fue realizado por Gómez Barrena y su equipo, al validar la **escala de consolidación ósea REBORNE** en 2020 (45). Las clasificaciones anteriores suelen tener dificultades para interpretar la progresión hacia la consolidación en la pseudoartrosis de huesos largos, especialmente cuando se incorporan biomateriales en el tratamiento quirúrgico. Concretamente, en su estudio valoraron la pseudoartrosis de tibia, húmero y fémur tratados con una combinación de MSCs y biomateriales. En las radiografías y secciones de TC del estudio, se evaluaron las cuatro corticales de la región de la fractura. La escala REBORNE se estima siguiendo esta fórmula: puntuación REBORNE = (valor cortical interna + valor cortical externa + valor cortical anterior + valor cortical posterior) / (4 x número de corticales evaluadas). El valor de cada cortical se asigna con una puntuación de 0 a 4 (1 punto: fractura sin cambios; 2 puntos: callo inicial no continuo; 3 puntos: callo continuo con fractura aún aparente; 4 puntos: callo con la misma densidad que la cortical; 0 puntos: cortical no interpretable o no visible). Esta escala tiene un rango de puntuación de 0/16 a 16/16 puntos. Se establece un umbral de consolidación radiológica a partir de una puntuación REBORNE de 11/16 (0.6875), es decir, al menos un puente en 3 de 4 corticales y la presencia inicial de callo en la última (3 + 3 + 3 + 2).

Analizando las distintas escalas, se aprecia que la escala RUST tiene algunas limitaciones, por ejemplo, no se realiza ninguna comparación con la TC, tampoco se establece un umbral para definir la consolidación ósea en un momento determinado y es una escala que surgió para la evaluación de fracturas, pero no para pseudoartrosis. Por el contrario, la escala REBORNE ha demostrado la concordancia confirmada entre observadores y la concordancia de las puntuaciones de TC y radiográficas. También se ha encontrado una alta sensibilidad y notable especificidad para el umbral de consolidación ósea, aparte de que define mejor los estadios intermedios. Por todo esto, se puede concluir que la escala REBORNE, medida en radiografías, es válida para evaluar la consolidación con una puntuación comparable a la TC. Se ha establecido un umbral para definir la consolidación y se puede aplicar para la evaluación de pseudoartrosis con diferentes métodos de fijación, particularmente con la incorporación de biomateriales donde la interpretación de la imagen es más compleja.

La **ecografía** es un método no invasivo y de bajo coste. Es capaz de detectar signos de consolidación a partir de la primera o segunda semana de producirse la fractura, por lo que es más precoz que la radiografía. Su uso está limitado a que no sean fracturas muy

profundas. Podría tener su interés en los niños, pues evita la exposición a la radiación y por el desafío que suponen las radiografías para valorar los componentes cartilagosos del esqueleto pediátrico (46). No es habitual su realización en la práctica clínica.

También disponemos de **técnicas de medicina nuclear**. Éstas no se utilizan para el diagnóstico en sí, sino para diferenciar el tipo de pseudoartrosis. La gammagrafía ósea con Tc99m-MDP (tecnecio 99-metilen difosfonato) es una técnica de imagen funcional para distinguir una pseudoartrosis viable de otra no viable (37); mientras que el PET-TC con 18-FDG (tomografía por emisión de positrones con 18-fluorodeoxiglucosa) discrimina si una pseudoartrosis es séptica, al tener una alta sensibilidad para diagnosticar la osteomielitis crónica.

Es obligado en toda pseudoartrosis descartar la presencia de infección, para lo que nos ayudaremos de **parámetros analíticos** como el recuento leucocitario y la proteína C reactiva.

El **diagnóstico histológico** es un método invasivo y cruento que no se usa de forma habitual en la clínica. Se utiliza en el contexto de una cirugía para confirmar el diagnóstico y, fundamentalmente, para descartar osteomielitis o pseudoartrosis infectada. El microscopio óptico permite medir histomorfométricamente los diferentes parámetros de la consolidación como el tamaño y volumen del callo cartilaginoso o mineralizado, la sección cortical o de médula ósea, las células, el material osteoide, el colágeno, etc. Rutinariamente se usa la tinción de hematoxilina-eosina y existen varios sistemas de evaluación histopatológica, como la escala de Allen (47) y Huo (48). Además, con el uso de imágenes microscópicas de alta calidad combinadas con un algoritmo de clasificación estadístico, se puede realizar la detección y conteo automático de las células (49).

Sería interesante un **diagnóstico bioquímico**, ya que son numerosas las señales moleculares y células implicadas, tanto en la cascada temprana de la inflamación como durante todo el proceso de reparación. La clínica y la radiología detectan retraso o ausencia consolidación cuando el evento ya ha ocurrido, por lo que los marcadores bioquímicos son prometedores para el diagnóstico precoz.

No es fácil encontrar un marcador que sea predictor de una consolidación alterada. De todos ellos, el P1NP (Propéptido N-terminal del procolágeno tipo I) es un buen candidato debido a su larga vida media, baja variabilidad interindividual y estabilidad (50). Los marcadores del remodelado óseo están relacionados con la fase de sustitución del callo blando por el callo duro y nos interesaría un marcador todavía más precoz. En este aspecto, se ha visto que el TGF- β (factor de crecimiento transformante- β) se podría utilizar como indicador de consolidación. Los niveles elevados de este mediador disminuyen marcadamente, como si se consumieran, durante el establecimiento de la pseudoartrosis. Se sugiere que la disminución de este valor es indicativo de problemas en la consolidación, por lo que el diagnóstico de no unión lo podríamos realizar a partir de la cuarta semana de producirse la fractura (51, 52).

Otra línea de investigación es la BMP-9 (proteína morfogenética ósea-9), puesto que es la única BMP que tiene concentraciones plasmáticas disminuidas si hay problemas en la consolidación (53).

Como conclusión, la monitorización seriada de ciertos marcadores bioquímicos podría usarse conjuntamente con los parámetros clínicos y radiológicos para predecir estas complicaciones (50).

Otro apartado atractivo es el **diagnóstico genético** de predisposición a pseudoartrosis. En este punto hay que destacar las variaciones en los genes que codifican la BMP-9. También algunos SNPs (polimorfismos de nucleótido único) para los genes que codifican dos moléculas inhibitorias (Noggin y Smad6) de la BMP-2 y BMP-7 (15, 53). De esta forma se podría predecir el paciente de riesgo de forma temprana.

Por el momento, ni el diagnóstico bioquímico ni el genético se utilizan en la práctica clínica habitual.

2.1.4.3 Tratamiento de los defectos de consolidación

El tratamiento se basa en el “concepto de diamante”, un marco conceptual descrito por Giannudis en 2007, que posteriormente evolucionó al “pentágono de la regeneración” al añadir la vascularización (54-56).

La **estabilidad mecánica** constituye la primera punta del diamante. Representa un factor vital para la consolidación ósea, de forma que, sin la adecuada estabilización, una fractura no consolidará. La **biología** la constituyen las células osteogénicas, la matriz osteoconductiva y los factores de crecimiento como estímulo osteoinductivo; formando así las otras tres puntas del diamante. Es el mismo Giannoudis quien incorpora un año más tarde los conceptos de **vascularización** apropiada y **perfil fisiológico del huésped**, como factores importantes para que se produzca la consolidación ósea. Estos cuatro factores se consideran igual de importantes (figura 3).

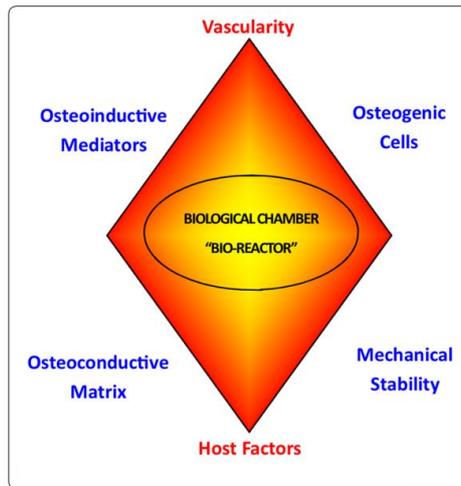


Figura 3. Ilustración del “concepto de diamante” en la consolidación ósea. Imagen tomada de Andrzejowski y Giannoudis 2019 (57).

El centro o corazón de esta elevada actividad biológica quedaría enmarcada dentro de la denominada **cámara biológica** que describió Calori en 2011 (58). Debe ser una cámara permeable que permita la contención de los elementos celulares, factores de crecimiento o injerto óseo implantados. A su vez, ha de permitir el transporte de oxígeno, nutrientes, señales moleculares y migración de células osteoprogenitoras. En este aspecto, la técnica de la membrana inducida de Masquelet representa el material ideal para cerrar la cámara biológica, porque se produce de forma natural y tiene la capacidad de secretar factores de crecimiento.

Hay que identificar el problema prioritario en cada tipo fundamental de pseudoartrosis, porque el tratamiento difiere sustancialmente. En las pseudoartrosis viables nos encontramos con un problema de estabilidad mecánica sin alteración de la biología, por lo que el tratamiento debe ir enfocado a **establecer una fijación rígida**. Se puede realizar mediante un clavo bloqueado, una placa a compresión o un fijador externo a compresión.

En el otro lado tenemos las pseudoartrosis no viables, aquí la alteración está en la biología de la consolidación ósea. A la hora de plantear el tratamiento se debe realizar un **aporte biológico**, además de una fijación rígida. Dentro de los estímulos biológicos posibles, a pesar de la disponibilidad de sustitutos óseos artificiales, el **injerto autólogo** de cresta ilíaca continúa siendo el estándar oro. Se debe a que combina las tres propiedades biológicas de osteogenicidad, osteoinductividad y osteoconductividad (9, 59, 60). Sin embargo, el injerto tiene una disponibilidad limitada (en torno a 20 cm³) y se acompaña de morbilidad en la zona de extracción. Una forma relativamente reciente de obtención de esponjosa autóloga es por medio del sistema RIA (*Reamer Irrigator Aspirator System*). Esta técnica permite la extracción de alrededor de 80 cm³ de fresado-aspirado de hueso esponjoso y ha ganado amplia aceptación en los últimos años. Los estudios reflejan altas concentraciones de MSCs y

factores de crecimiento, con complicaciones significativamente bajas y altas tasas de consolidación (21, 59, 61). En contraposición, a pesar de que ambos métodos tienen similares propiedades osteogénicas y osteoinductivas, el aspirado obtenido por RIA no tiene propiedades osteoconductoras ni tampoco estabilidad mecánica intrínseca (9).

El [injerto óseo alogénico](#) es una alternativa relativamente segura al autoinjerto. Se usa habitualmente como injerto morselizado de hueso esponjoso, otras veces puede proporcionar algún grado de soporte estructural. Debido a su naturaleza porosa tiene muy buenas propiedades osteoconductoras, sin embargo, su procesado para la esterilización y conservación provoca pérdida de las propiedades osteogénicas y osteoinductivas. Tampoco contiene células viables. El aloinjerto puede ser fresco, congelado o liofilizado. Mientras que su uso puede ser beneficioso para el tratamiento de fracturas agudas metafisarias, los resultados en pseudoartrosis de huesos largos son decepcionantes (9, 60). Otros problemas del aloinjerto son la posibilidad de rechazo del injerto y transmisión de enfermedades. Precisan mayores plazos de integración que el injerto autólogo y puede apreciarse su reabsorción con el paso del tiempo.

Finalmente, se puede disponer de [matriz ósea desmineralizada \(DBM\)](#), que se obtiene del aloinjerto por extracción ácida. Este proceso permite la conservación del colágeno tipo I y las proteínas no colágenas. Posee propiedades osteoconductoras y osteoinductivas, esta última es variable según la forma de extracción y procesado. La capacidad de proporcionar soporte mecánico es limitada (9).

Para defectos críticos (mayor de 2 cm o mayor de 5 cm³) o sospecha de infección, se recomiendan procedimientos secuenciales, con la implantación temporal de un espaciador de cemento para la inducción de una membrana según la [técnica de Masquelet](#). Este espaciador de cemento se retira después de un intervalo de 6 a 8 semanas y el defecto se rellena de hueso esponjoso autólogo protegido por la membrana de Masquelet inducida. Esto permite finalmente la consolidación (62).

En caso de amplios defectos, otras técnicas son el [transporte óseo y los injertos vascularizados](#) (9).

Además del abordaje de la estabilidad y la estimulación biológica, se puede favorecer la consolidación por medio de la estimulación mecánica y la estimulación eléctrica. Ambas terapias requieren estabilidad mecánica suficiente, así como un entorno biológico intacto. Están indicadas en las fases tempranas de los defectos de consolidación.

Dentro de la [estimulación mecánica](#) podemos incluir:

- **Dinamización de la fractura:** consiste en permitir que el foco de fractura pueda comprimirse mínimamente de forma fisiológica para estimular la consolidación (21).

- **Terapia de ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS):** los ultrasonidos producen nanomovimientos a nivel de la fractura similares a la estimulación con la carga de la extremidad (1, 5, 21, 46).
- **Terapia de ondas de choque extracorpóreas (ESWT):** aunque los mecanismos exactos no son del todo claros, se ha hipotetizado que la respuesta biológica de las ondas de choque desencadena la mecanotransducción, un proceso que transforma el estímulo mecánico en señales bioquímicas (63).

La **estimulación eléctrica** consiste en la aplicación de corrientes o campos electromagnéticos en el foco. Los que han demostrado mayor utilidad son los campos electromagnéticos pulsados (PEMF).

Estas últimas terapias descritas (LIPUS, ondas de choque y estimulación eléctrica), requieren más investigación clínica.

El estándar oro en el tratamiento de las pseudoartrosis no viables, continúa siendo el tratamiento quirúrgico con desbridamiento del tejido no viable, asociado a fijación rígida e injerto autólogo de cresta ilíaca (2).

NUEVAS TERAPIAS. Si bien la mayor parte de las pseudoartrosis se tratan de forma satisfactoria con los procedimientos descritos, existen nuevos abordajes terapéuticos para facilitar la regeneración ósea.

1. Mediadores moleculares para la aplicación sistémica

Teriparatida. Es el fragmento aminoterminal de la hormona paratiroidea (PTH 1-34). Además de su uso como tratamiento osteoformador en el tratamiento de la osteoporosis, la teriparatida puede considerarse un tratamiento adyuvante para la consolidación de fracturas femorales atípicas. Estas fracturas son de baja incidencia (0.35 % de todas las fracturas femorales), pero se asocian a largos periodos de tratamiento con bifosfonatos o denosumab (3). Son fracturas con elevado índice de pseudoartrosis (hasta el 26 %), en el que las terapias convencionales fracasan. Por extensión, se amplía su uso al tratamiento de otros retardos de consolidación, en casos seleccionados. Se recomienda una duración de tratamiento por un periodo de dos años si el paciente tiene una osteoporosis establecida, aunque no está claro cuánto tiempo deben mantenerlo los que no presentan la enfermedad, pudiendo ser razonable cumplir el tratamiento de 8 a 12 semanas (64). De todas formas, los mecanismos por los que la teriparatida mejora la consolidación de fracturas en pacientes con retardo de consolidación o pseudoartrosis, no se conocen por completo (65).

Romosozumab. Es un anticuerpo monoclonal inhibidor de la esclerostina. La esclerostina es una proteína codificada por el gen SOST, que se expresa en los osteocitos y se conoce como un inhibidor establecido de la señalización Wnt. Las proteínas Wnt son un grupo de proteínas que forman parte del grupo de moléculas de señalización para procesos biológicos y del desarrollo. La vía Wnt- β -catenina es crucial en la formación ósea. Los ligandos Wnt enlazan con el receptor Frizzled (Fz) que forma un complejo con el receptor relacionado con la lipoproteína de baja densidad 5 y 6 (LRP 5 y 6). Subsecuentemente, LRP 5 y 6, y Fz desactivan el complejo de destrucción de la β -catenina, lo que lleva a la acumulación de β -catenina dentro de la célula. La β -catenina transloca el núcleo, donde se regula la transcripción de genes específicos y, con ello, la osteogénesis. Existen dos antagonistas de este proceso, la esclerostina y una proteína soluble llamada Dickkopf 1 (Dkk1). El romosozumab inhibe la esclerostina, por lo que se ha convertido en un potente agente terapéutico para la osteoporosis. También la inhibición de Dkk1 es una promesa para el futuro. Ambas terapias podrían ser herramientas futuras para aumentar la reparación ósea (3, 66).

2. Mediadores moleculares para la aplicación local: factores de crecimiento

Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Hoy en día, son el grupo de factores de crecimiento mejor estudiado y más eficiente para el tratamiento de los defectos óseos. Las BMPs forman una extensa subfamilia dentro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Proporcionan las señales morfogenéticas para el desarrollo del esqueleto durante la embriogénesis y son las responsables de la consolidación de las fracturas recapitulando la cascada de eventos celulares asociados a la formación ósea embrionaria.

Comercializadas y aprobadas están la proteína recombinante BMP-2 (rhBMP-2, Medtronic), y la proteína osteogénica-1 o también llamada proteína recombinante BMP-2 (rhBMP-7 / OP-1 Putty, Stryker). Independientemente de sus potenciales efectos adversos (calcificaciones heterotópicas y riesgo aumentado de neoplasia), se consideran inductores potenciales de la formación ósea. Las investigaciones las han adaptado a que su uso sea más seguro y eficaz. Ambas tienen estrictas indicaciones clínicas y su precio es elevado, por lo que deben considerarse en casos seleccionados en los que los tratamientos tradicionales han fracasado (5, 67). La rhBMP-2 está indicada para artrodesis lumbar y fracturas abiertas de tibia, mientras que la rhBMP-7 está indicada para pseudoartrosis de tibia (68).

Factores de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFs). Están indicados para artrodesis de tobillo y retropié (9).

3. Sustitutos óseos

Son materiales naturales o sintéticos con efecto osteoconductor. Son capaces de proporcionar un andamiaje adecuado que permite la migración, proliferación y diferenciación celular, así como la producción de matriz extracelular. A diferencia del injerto autólogo, no asocian morbilidad de la zona donante, no existe posibilidad de complicaciones

inmunogénicas debido a su biocompatibilidad y tienen disponibilidad ilimitada. Son productos que permiten o inducen la neovascularización, además pueden proveer cierto grado de estabilidad mecánica. Los podemos agrupar en los siguientes grupos:

Compuestos de fosfato cálcico. Incluyen cerámicas y cementos de fosfato cálcico. Tienen propiedades osteoconductoras que se atribuyen a su estructura microporosa. Las que más se usan son la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico. Forman osteoide al ponerse en contacto con el hueso, que posteriormente se mineraliza y se reabsorbe sustituyéndose por hueso.

Compuestos de sulfato cálcico. El sulfato cálcico pierde su microestructura porosa, lo que implica pérdida de osteoconductividad. Además, se asocia a reabsorción temprana a las 4-8 semanas y confiere menor fuerza mecánica.

Cristales bioactivos. Son cerámicas basadas en silicatos con propiedades bioactivas. Tienen propiedades osteoconductoras debido a su naturaleza porosa y se reabsorben rápidamente con una pequeña respuesta inflamatoria. A parte de efectos positivos en la osteoinducción, se describe una actividad antimicrobiana. Esto se debe a que durante la degradación del biocristal, la disolución de la sal crea un aumento local de pH y presión osmótica que es bactericida. Es un material interesante para defectos óseos en presencia de infección.

Sustitutos óseos orgánicos. Son nanocompuestos que, principalmente, contienen colágeno tipo I que mimetizan el andamio natural de colágeno. Para mejorar la osteoconducción se suelen combinar con fosfato cálcico, factores de crecimiento o células madre. Pueden ser polímeros de colágeno naturales o sintéticos reabsorbibles, como los polímeros PLLA (*poly L-lactic acid*) y PLGA (*polylactic-co-glycolic acid*).

Biomateriales innovadores. Dentro del campo de la ingeniería tisular se pueden desarrollar tejidos bioinspirados que asemejen las propiedades del tejido nativo. Utilizando impresoras 3D se pueden diseñar implantes con complejidad estructural a nivel nanoscópico. Para mejorar la actividad biológica se pueden integrar factores de crecimiento o células madre, mejorando las propiedades osteoinductivas y osteogénicas. De esta manera se forman construcciones híbridas (9, 60).

4. Terapia con células madre

Esta terapia es el objeto de estudio de este trabajo y se va a desarrollar a continuación.

2.2 LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

2.2.1 DEFINICIÓN Y TIPOS DE CÉLULAS MADRE

Las células madre son células indiferenciadas precursoras de los tejidos. Tienen capacidad de autorrenovación, proliferación manteniendo su fenotipo y potencial de diferenciación hacia diferentes tipos celulares (69). Son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de nuestro organismo, pero también pueden regenerar tejidos dañados, constituyendo así una alternativa terapéutica para enfermedades que de otro modo no tendrían cura.

Estas células son capaces de renovarse a sí mismas por medio de división celular, incluso después de largos periodos de inactividad. Además, bajo determinadas condiciones fisiológicas o experimentales, pueden diferenciarse hacia células de tejidos u órganos con funciones específicas. A la hora de dividirse, lo pueden hacer de forma simétrica generando dos células madre idénticas, o bien de forma asimétrica, dando lugar a una célula troncal genéticamente igual a la inicial (clonogenicidad) y a otra célula comprometida hacia un linaje determinado. Este último proceso se conoce como diferenciación. Debido a estas características, son capaces de mantener o reparar los diferentes tejidos en los que se encuentran (70).

1. Las células madre se pueden clasificar en función del **potencial de diferenciación** (figura 4) en los siguientes tipos de células:

Células totipotentes: pueden formar un organismo completo y tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares, incluidas las células extraembrionarias. La célula madre por excelencia es el cigoto.

Células madre pluripotentes: aunque no pueden formar un organismo completo, pueden diferenciarse en todas las células del organismo, incluyendo las células madre embrionarias y todas las células derivadas de las tres capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo).

Células madre multipotentes: pueden diferenciarse a más de un tipo celular dentro de la misma capa germinal.

Células madre unipotentes: pueden diferenciarse a un tipo celular único.

2. Otra clasificación sencilla es en función de su **procedencia**:

Células madre embrionarias: proceden de la masa celular interna de un embrión en la etapa de blastocisto y son pluripotentes (71).

Células madre adultas o somáticas: son multipotentes, se obtienen de tejidos postnatales y son necesarias para el mantenimiento de los órganos y tejidos.

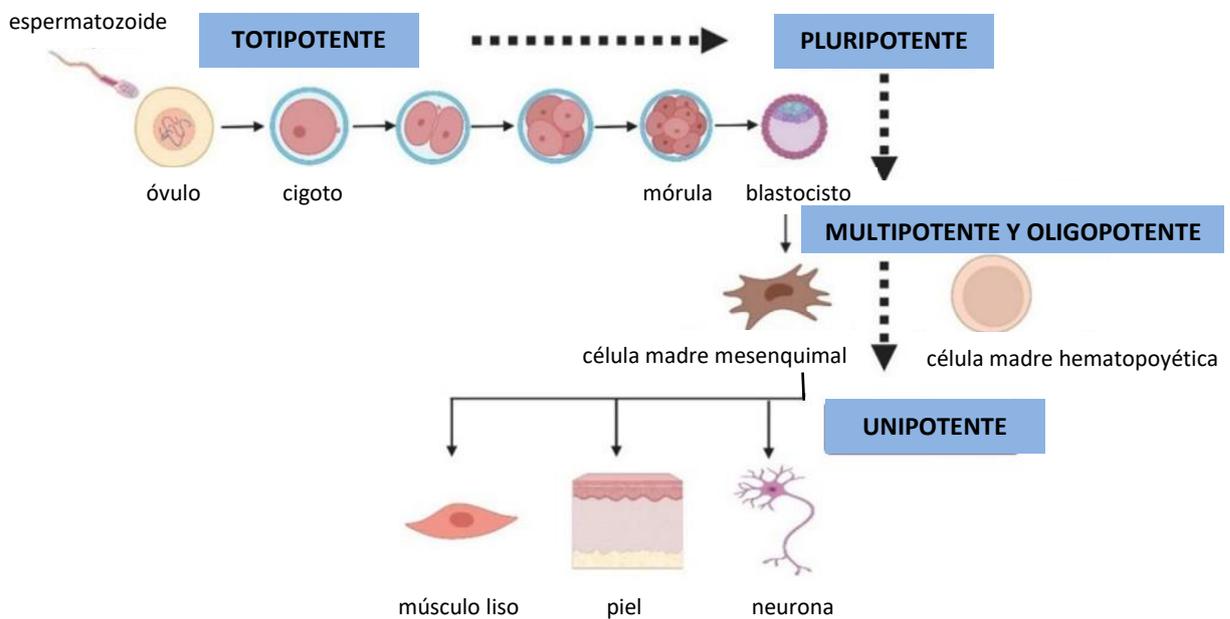


Figura 4. Representación esquemática de las células madre según el potencial de diferenciación. Imagen adaptada de Zhanaskody 2022 (72).

Un tipo concreto de células madre adultas son las denominadas **células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells* o **MSCs**)**, también llamadas células troncales mesenquimales o células estromales mesenquimales. Son células multipotenciales primitivas con morfología fibroblastoide y que se originan a partir de la capa germinal mesodermal. Tienen la capacidad de diferenciarse a diversos tipos celulares, incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, fibroblastos u otros. Pueden encontrarse en casi todos los órganos y tejidos postnatales y residen en zonas específicas que reciben el nombre de nicho de células madre, concepto primeramente descrito por Schofield (73). Están presentes en el estroma de los diferentes tejidos, pero predominantemente las encontramos en el estroma de la médula ósea. Si bien se trata de una población escasa, en cultivo muestra una gran capacidad de expansión.

Las MSCs, además de constituir una herramienta potencial para regenerar tejidos, presentan dos características importantes, tienen una baja inmunogenicidad en el trasplante alogénico (74) y evitan el conflicto ético que presentaría el empleo de células madre embrionarias.

Debemos tener presente que el número de MSCs va variando de modo inversamente proporcional a la edad, aunque llegan a estar presentes durante toda la vida del individuo. Sin embargo, su capacidad para diferenciarse en cartílago y hueso es independiente de la edad.

2.2.2 HISTORIA DE LAS CELULAS MADRE MESENQUIMALES

Cohnheim, a finales del siglo XIX, fue el primero en plantear la hipótesis de la existencia de células con capacidad regenerativa, al sugerir que los fibroblastos derivados de la médula ósea estaban involucrados en la curación de heridas (75).

Posteriormente, el científico ruso Maximow describió en 1924 que existía una fuerte relación entre el desarrollo del tejido mesodérmico y los componentes celulares sanguíneos durante el periodo de la embriogénesis (76).

Los científicos Becker y Siminovitch fueron los primeros en evidenciar la naturaleza clonal de las células de la médula ósea en la década de 1960 (77, 78).

Pero, sobre todo, hay que destacar a Friedenstein y colaboradores en el descubrimiento de estas células. Fue entre los años 60 y 70, cuando encontraron en el estroma de la médula ósea de ratones y cobayas, un tipo de células adherentes al plástico con alta capacidad de replicación *in vitro*. Éstas formaban colonias de células con un aspecto similar a los fibroblastos del tejido conectivo (79, 80). Se las denominó “unidades formadoras de colonias de fibroblastos” (*colony-forming units fibroblasts* o CFU-F). Posteriormente vieron que, al ser trasplantadas *in vivo* en cobayas, podían generar osteoblastos, siendo las responsables de generar el soporte estromal necesario para albergar el tejido hematopoyético (81, 82).

En 1980, Owen y Ashton demostraron que estas células eran capaces de generar hueso, cartílago y tejido conectivo en un estudio *in vivo*, al ser implantadas en cámaras de difusión en peritoneo de conejos (83).

En un estudio conjunto de Owen y Friedenstein en 1988, se propuso por primera vez la existencia de una célula troncal en el estroma de la médula ósea, diferente a las ya conocidas células troncales hematopoyéticas. El término que emplearon para su denominación fue de “célula troncal estromal” (84).

Caplan fue el primero en acuñar el término “célula madre mesenquimal” (*mesenchymal stem cell*) a final de la década de los 90, debido a la vinculación con la formación de tejidos mesenquimales durante el desarrollo embrionario (85). Este autor fue uno de los primeros en conseguir cultivar y trasplantar estas células en humanos, además de observar la formación de hueso y cartílago.

La denominación de células madre mesenquimales fue reforzada por Pittenger, al corroborar la capacidad de estas células para diferenciarse *in vitro* en células de tejidos de origen mesenquimal como el hueso, cartílago, grasa, tendón, músculo y estroma medular (69).

2.2.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Morfología

Las células troncales mesenquimales se caracterizan por presentar una morfología espigada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo alargado central que contiene de dos a tres nucléolos (86, 87).

Desde los primeros estudios de Owen, se observó que las colonias de células troncales mesenquimales contenían células morfológicamente diferentes (83, 87). Posteriormente, son diversos los autores que han descrito, fundamentalmente, dos tipos de morfología en los cultivos celulares. La mayoría de las células son espigadas con forma fibroblastoide y una proporción menor de células presentan un mayor tamaño y forma poligonal. Las primeras corresponden a células mesenquimales progenitoras y las últimas a células mesenquimales maduras (88-90).

En la figura 5 se puede ver una de nuestras preparaciones, donde se aprecia la morfología fibroblastoide de las células madre mesenquimales.

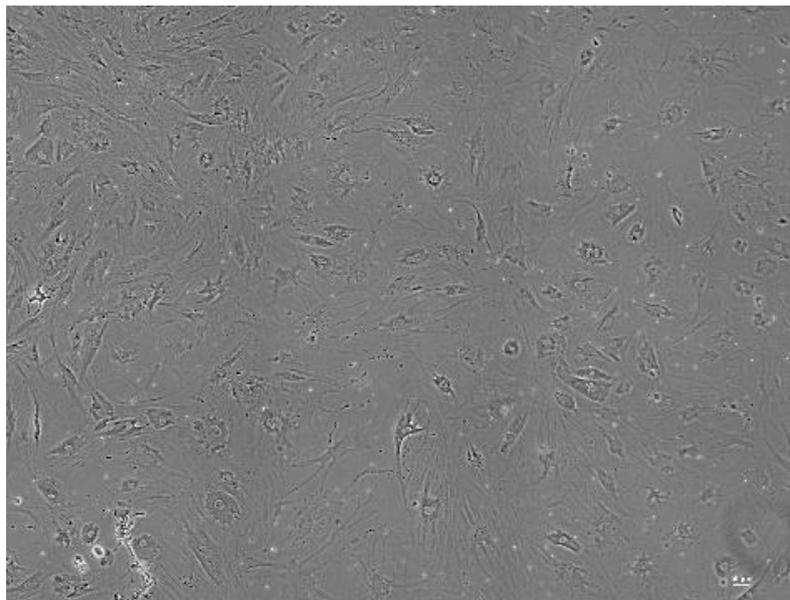


Figura 5. Fotografía realizada con microscopio óptico de células madre mesenquimales cultivadas en nuestro laboratorio.

Fenotipo

Tras el descubrimiento y caracterización de las células madre mesenquimales, los científicos buscaban un método para aislar de forma prospectiva poblaciones de células progenitoras, basado en la selección de marcadores expresados en la superficie celular.

Para definir las, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció en 2006, un conjunto de criterios mínimos para la definición de MSCs (91):

1. Deben ser capaces de adherirse en el plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo.
2. Deben ser positivos (más del 95 % de la población de MSCs) para los antígenos específicos de superficie CD105, CD73 y CD90, y negativos (menos del 2 %) para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR.
3. Deben ser capaces de diferenciación mesenquimal trilineaje (osteoblastos, adipocitos y condroblastos) bajo condiciones de diferenciación estándar *in vitro* (91).

El hecho de que los antígenos de superficie deban ser negativos, es para evitar la confusión con las células hematopoyéticas, ya que están presentes habitualmente en estas preparaciones. Estos criterios son exclusivamente de aplicación para las MSCs humanas. Además de estos marcadores, las células presentan coloración positiva para la fosfatasa alcalina granulocitaria, sudán y esterasa.

Capacidad de proliferación

Una característica que define a la célula madre es su potencial de autorrenovación, es decir, puede realizar un número elevado de divisiones mitóticas generando copias idénticas a ella misma. La baja cantidad de MSCs aisladas desde una muestra de tejido hace necesaria su proliferación *in vitro* para obtener un número apropiado para su aplicación clínica. No obstante, el número de divisiones mitóticas debe ser limitado, debido a que durante el cultivo las MSCs envejecen, experimentando una marcada disminución de su capacidad proliferativa (92) y una pérdida gradual del potencial de diferenciación múltiple (93). La densidad celular también juega un papel importante, son preferibles siembras a bajas densidades para producir altas expansiones.

Potencial de diferenciación

La diferenciación es el proceso por el cual las células madre adquieren compromiso con un linaje celular específico y comienzan a adquirir las características fisiológicas, morfológicas y moleculares de su célula destino.

El gran interés que existe por las MSCs proviene de su capacidad para diferenciarse hacia tejidos de origen mesodérmico como hueso, cartílago, tendón, músculo y tejido adiposo, entre otros. Además, exhiben una gran plasticidad, al ser capaces de diferenciarse a tipos celulares diferentes de su tejido de origen o incluso de una capa embrionaria diferente. Esto último es lo que se conoce como transdiferenciación. Se ha documentado que las MSCs pueden transdiferenciarse *in vitro* a células derivadas de origen ectodérmico como las células neuronales, cardiomiocitos y células epiteliales; o las derivadas de origen endodérmico como hepatocitos, células pulmonares e incluso islotes pancreáticos (94-97) (figura 6).

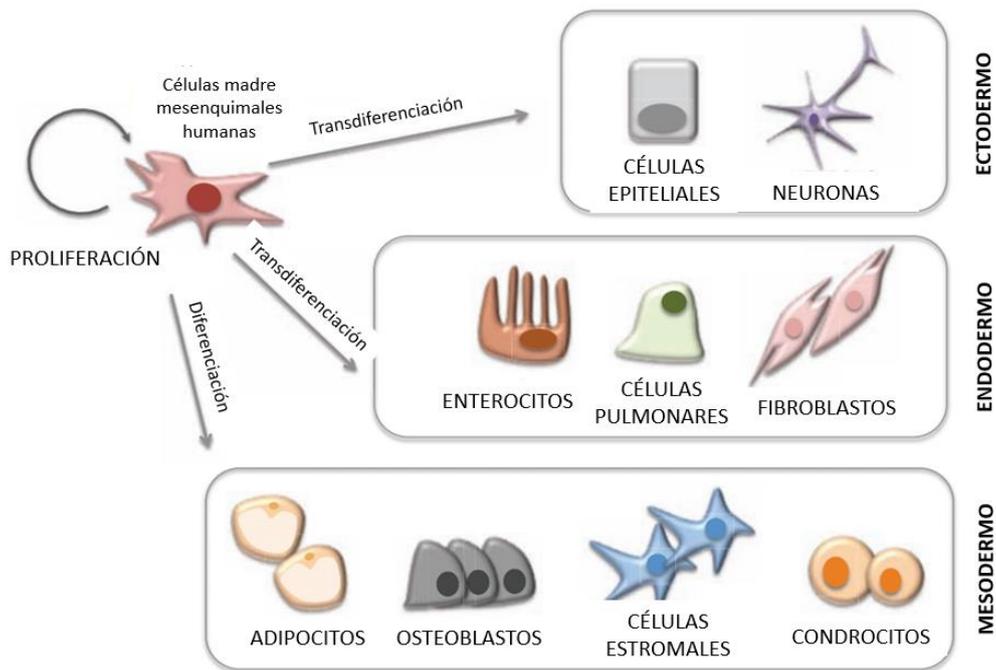


Figura 6. Las células madre mesenquimales, además de su capacidad de autorrenovación, son capaces de diferenciarse hacia diferentes tipos celulares, no solo de su misma capa germinal mesodérmica (como osteoblastos, condrocitos y adipocitos), sino a otras de origen endodérmico o ectodérmico. Esto último se conoce como transdiferenciación. Imagen adaptada de Pérez Campo 2015 (98).

En el transcurso de esta diferenciación, las células están influenciadas tanto por el material genético como por señales externas, entre las que se encuentran sustancias químicas secretadas por otras células, el contacto físico con las células que las rodean y microvesículas que están en el microambiente de la célula en diferenciación. La interacción de estas señales hace que el ADN de la célula madre adquiera marcas epigenéticas, que restringen la expresión de genes de pluripotencia y potencian la expresión de factores de transcripción específicos. Éstos se transmitirán a través de la división celular (98).

De forma artificial en el laboratorio, la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo puede definir la multipotencialidad de las MSCs (99).

La diferenciación mesodérmica (osteogénica, condrogénica y adipogénica) es fácilmente alcanzable para las MSCs porque poseen el mismo origen embrionario.

La **diferenciación osteogénica** implica el progreso de una serie de etapas, en las que se obtienen estadios intermedios de diferenciación osteoblástica que culminan con la formación de osteoblastos maduros y funcionales. Es posible reconstituir este modelo de osteodiferenciación mediante el cultivo de MSCs en presencia de factores osteoinductores como dexametasona, β -glicerofosfato de sodio y ácido ascórbico.

Por otra parte, la inducción del proceso de **diferenciación condrogénica *in vitro*** se ha visto favorecida con la adición de factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), dexametasona, solución ITS (insulina, transferrina y ácido selénico), piruvato de sodio y ácido ascórbico.

En el caso de la **diferenciación adipogénica *in vitro***, se utilizan factores inductores como dexametasona, dimetilsulfóxido, indometacina e isobutilmetilxantina.

2.2.4 TEJIDOS FUENTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las MSCs están presentes en el estroma de los diferentes tejidos, pero predominantemente las encontramos en el estroma de la médula ósea. También pueden aislarse en el tejido adiposo (100), sangre periférica (101, 102), membrana sinovial (103), músculo esquelético (104), páncreas (105), dermis (106), cordón umbilical (107), pulpa dentaria y ligamento periodontal (108-111), entre otros.

La **médula ósea** es actualmente la fuente más utilizada de células madre mesenquimales adultas debido a su facilidad de obtención, elevada capacidad proliferativa y potencial regenerativo. Las MSCs se diferencian de manera eficiente a osteoblastos y su expansión en cultivo no muestra complicaciones en el seguimiento a largo plazo.

La médula ósea es un tejido complejo compuesto por células hematopoyéticas (precursores y células diferenciadas) y una mezcla heterogénea de células denominada estroma. En el estroma se incluyen adipocitos, reticulocitos, células endoteliales y células fibroblásticas; que están en contacto con los elementos hematopoyéticos. Es entre las células del estroma donde se encuentra la pequeña población celular de MSCs, de hecho, solo suponen entre el 0.001 y el 0.01 % del total de las células mononucleadas de la médula (112).

De todas las localizaciones, la de más fácil acceso es el hueso esponjoso de la cresta ilíaca, puesto que se puede realizar la extracción directa del tejido, generalmente por **aspirado**.

También existen kits comerciales para la obtención de un **aspirado concentrado de médula ósea (BMAC)**, que se obtiene mediante gradiente de densidad tras centrifugado. Existen otras técnicas con mínima manipulación de la médula ósea. Uno de ellos es la obtención mediante el **sistema RIA (Reamer Irrigator Aspirator System)**. Tiene la ventaja de que, además de aumentar la concentración de las MSCs humanas, proporciona una influencia positiva en la actividad osteogénica de estas células, mejorando la del propio tejido por sí mismo (113). En este caso se extrae de huesos largos, como el fémur o la tibia.

También existe la posibilidad de la obtención de MSCs de **aloinjertos viables**. Se extraen de hueso esponjoso de cadáver después de separar el componente celular inmune del injerto, preservando la fracción de MSCs.

En las últimas décadas se ha generado una enorme expectativa por las células madre mesenquimales obtenidas del **tejido adiposo**. Tienen una morfología y capacidad de diferenciación *in vitro* similar a las obtenidas de la médula ósea, pero aunque tienen una mayor capacidad de proliferación, son menos eficientes a la hora de su diferenciación hacia osteoblastos (114). Una ventaja es su accesibilidad relativamente fácil a muestras de tejido adiposo. Las técnicas para su obtención incluyen el lipoaspirado o tejidos desechados tras actos quirúrgicos en cirugía plástica (115). A pesar de que el injerto directo de estas células no ha demostrado mucho éxito en la consolidación, hay un interés creciente en la aplicación de factores osteoinductivos con la esperanza de estimular la osteogénesis (116).

Otros tejidos que contienen MSCs incluyen la membrana sinovial y el músculo esquelético, todas ellas comparten el fenotipo vascular de los pericitos. Las MSCs derivadas de la membrana sinovial son células estromales pluripotenciales que proveen una alternativa terapéutica para las lesiones focales de cartílago (116).

Además de las anteriormente citadas, otros tipos de células madre como las derivadas de la sangre del cordón umbilical y de la pulpa dental, se han utilizado para mejorar la regeneración ósea (73, 116).

2.2.5 PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Propiedades tróficas y efecto paracrino

Las MSCs pueden presentar efectos locales regulando el microambiente que las rodea. Son capaces de liberar diversos factores biológicamente activos para ejercer efectos en la dinámica celular, de este modo, pueden secretar una amplia variedad de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y microvesículas. Este secretoma induce la proliferación celular y la angiogénesis, promoviendo la regeneración del tejido lesionado o favoreciendo la cicatrización (117-120) (figura 7).

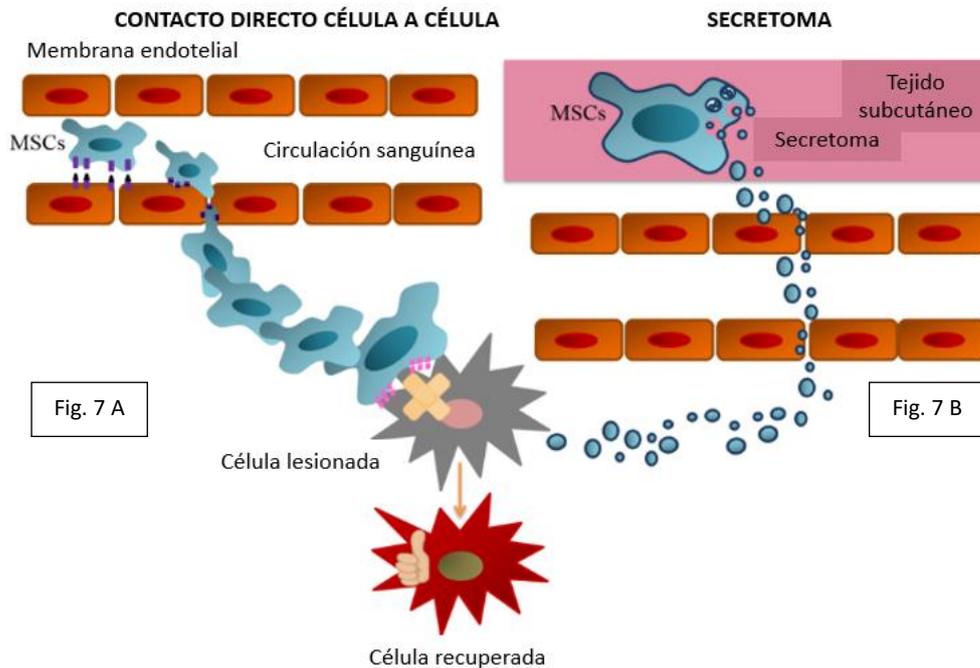


Figura 7 A-B. (A) Las MSCs pueden ejercer su mecanismo mediante el contacto directo célula a célula, adhiriéndose y cruzando la membrana endotelial. (B) También lo pueden hacer mediante la secreción celular de factores, lo que se conoce como secretoma, que también atraviesa la membrana endotelial. Imagen adaptada de Crivelli 2017 (117).

Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras

Estas células modulan el ambiente inflamatorio que acontece como respuesta a determinadas lesiones, entre las que encontramos los traumatismos musculoesqueléticos. También tienen propiedades inmunomoduladoras (121-123), de forma que modulan la proliferación o activación de muchas células inmunes inflamatorias, incluyendo los linfocitos B y T, células *natural killer*, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Debido a estas propiedades inmunomoduladoras han sido relacionadas con la disregulación inmunitaria de algunas enfermedades (124, 125).

Se podría decir que las MSCs carecen de inmunogenicidad, ya que expresan bajos niveles del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (HLA I) y muestran ausencia de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (HLA II). Esto es una ventaja para evitar el reconocimiento por el sistema inmune en terapias alogénicas (91).

Propiedades antiapoptóticas

Otra propiedad importante de las MSCs es la capacidad para rescatar células apoptóticas inducidas por la hipoxia, traumatismos, productos químicos o radiación. De esta forma se promueve la regeneración del tejido lesionado (125-128).

Propiedades antimicrobianas

Las MSCs parecen ser un agente terapéutico potencial para las infecciones agudas y sistémicas, no solo por tener un efecto directo sobre los agentes microbianos, sino por la influencia en el reclutamiento de células inmunes. Las MSCs secretan péptidos antibacterianos con actividad directa frente a un amplio rango de microorganismos, también pueden interactuar por sí mismos con las MSCs modulando su proliferación, migración y regeneración (129).

2.2.6 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA

Las células madre mesenquimales de médula ósea generalmente se aíslan de aspirados de la cresta ilíaca. Otras alternativas son el fémur, la tibia o el esternón. Los aspirados son posteriormente cultivados en placas, con medio suplementado con factores de crecimiento. Estas MSCs recién aisladas se mantienen en cultivo durante varios días, en los que las células hematopoyéticas no adherentes van siendo eliminadas con los sucesivos cambios de medio. La población resultante de células con adherencia al plástico se considera cultivo primario.

Las MSCs pueden ser subcultivadas sin perder su propiedad de proliferar y diferenciarse. Sin embargo, si se cultivan durante periodos extensos se pueden observar signos de senescencia. Esto puede afectar a la multipotencialidad y capacidad de diferenciación, para finalmente acabar en la detención del crecimiento y apoptosis. Este fenómeno se conoce como senescencia replicativa (130). Es común en cultivos de células diploides y puede ser causado por varios factores, incluyendo el acortamiento de los telómeros (131) o la ausencia de actividad telomerasa. Por cuestiones de seguridad clínica, la expansión no debe exceder de cuatro pases, en un intento de minimizar la aparición de células senescentes.

Se han desarrollado varios medios de cultivo para la expansión *in vitro* de MSCs. La mayoría incluyen suero bovino fetal (SBF) en varias concentraciones, como un suplemento que promueve el crecimiento. Sin embargo, existe riesgo de contaminación con agentes extraños y residuos potencialmente inmunogénicos de la especie bovina en el producto final. Es por este motivo que se ha pensado en otras opciones para la expansión de MSCs. En este contexto, el lisado de plaquetas humanas es considerado como una buena alternativa al SBF (132-134). Este producto está fabricado a partir de concentrados de plaquetas, en el que, por

ciclos repetidos de congelación-descongelación, las plaquetas se rompen mecánicamente para liberar sus factores de crecimiento. El uso de estos suplementos humanos puede suponer cambios significativos en las características de las MSCs. Con esta técnica se eliminan la mayor parte de patógenos, sin ocasionar toxicidad o efecto en la potencia de las células. Es más efectivo en términos de crecimiento celular que el SBF y se ha demostrado que las células mesenquimales preservan las propiedades inmunomoduladoras (135). Es importante destacar que no parece estar asociado con inestabilidades cromosómicas recurrentes, que sí se han observado en las MSCs cultivadas con SBF (136, 137).

Otro parámetro para tener en cuenta es la densidad de siembra, lo cual es importante para la expansión de las MSCs en cultivo. Una siembra inicial a una densidad de 50 células/cm², mejora significativamente el crecimiento, proporcionando gran número de células a partir de una pequeña cantidad de médula ósea (90, 138).

El cultivo monocapa es la técnica básica para la expansión de MSCs. Las células se cultivan comúnmente en botellas de vidrio o poliestireno, matraces de cultivo o placas de Petri. Los recipientes de plástico utilizados garantizan una buena adherencia de las células a las paredes del recipiente. Por otra parte, se han estudiado diversos cultivos tridimensionales, con materiales que incluyen alginato, ácido hialurónico, colágeno, fibrina o quitosán (139).

2.2.7 CAPACIDAD TRÓFICA Y MIGRACION TRANSENDOTELIAL

Las células madre mesenquimales van a tener la capacidad de migrar a un tejido diana específico. Esta **capacidad trófica** radica en que son capaces de alcanzar el tejido dañado en respuesta a unas moléculas de señalización del tejido lesionado y los correspondientes receptores presentes en las MSCs (140, 141). El ingreso de las células al sistema circulatorio es un proceso activo guiado por un gradiente de quimioquinas. La comprensión profunda de los mecanismos moleculares que conducen a la llegada de las células mesenquimales desde el sistema vascular al tejido lesionado, es esencial para el éxito de las terapias celulares. También se trabaja en la optimización de la seguridad y eficacia del proceso.

La migración de las células desde el torrente circulatorio hacia el tejido dañado, se realiza mediante la adhesión al endotelio vascular para atravesarlo posteriormente. Es lo que se denomina **migración transendotelial**. Esta migración se rige por una cascada de interacciones moleculares que involucra a selectinas e integrinas. La extravasación de las células se produce principalmente en las vénulas postcapilares, ayudado por el enlentecimiento del flujo sanguíneo. En una primera fase, mediada principalmente por las selectinas y sus ligandos, se da lugar al frenado inicial y posterior rodamiento de las células que están en contacto directo con la superficie endotelial (**fase de anclaje y rodamiento**). Este rodamiento permite un estrecho contacto de la célula con el endotelio, de forma que las células pueden exponerse a señales químicas como quimioquinas, citoquinas y otros agentes

inflamatorios presentes en el medio local (**fase de activación**). De esta manera, se produce la activación de la integrina que se une a su receptor endotelial, conduciendo a una adhesión firme (**fase de adhesión**), seguido por la transmigración endotelial (**fase de extravasación**) (142) (figura 8).

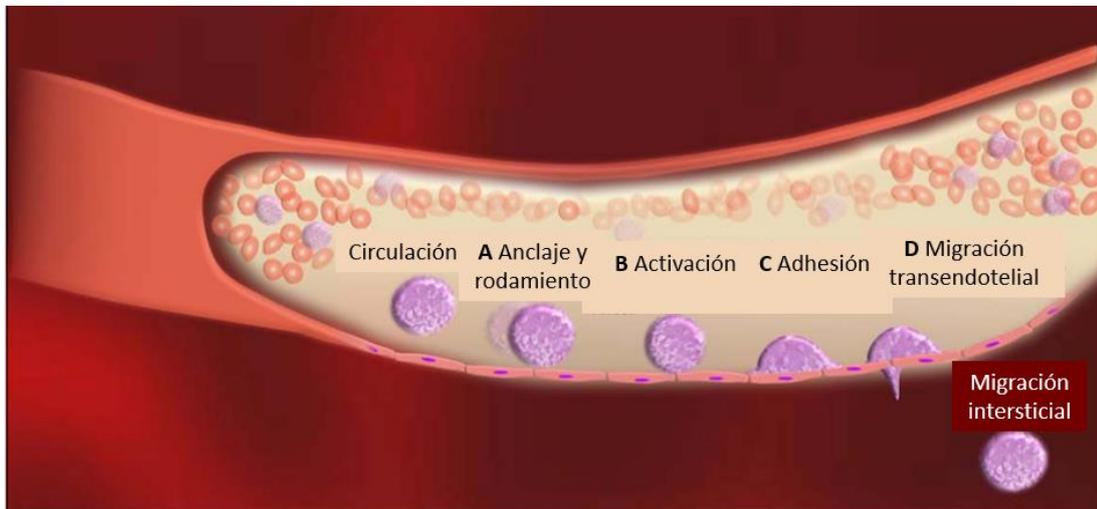


Figura 8. Representación esquemática de la migración transendotelial de las MSCs: **(A)** las células circulantes enlentecen su velocidad teniendo lugar la fase de anclaje y rodaje, **(B)** se exponen a señales químicas que permiten la activación (fase de activación), **(C)** después se adhieren al endotelio mediante integrinas (fase de adhesión) y **(D)** migran a través del endotelio (fase de extravasación). Imagen adaptada de Nitzsche 2017 (142).

Las MSCs obtenidas de la médula ósea ofrecen una ventaja y es que, al haber estado en contacto con el nicho medular, poseen receptores específicos que reconocen las señales procedentes de éste. En el caso del hueso, el portal de entrada desde el torrente sanguíneo se encuentra en los sinusoides de la médula ósea.

2.2.8 MSCs PARA REGENERACIÓN ÓSEA

Las MSCs derivadas de la médula ósea son las más apropiadas para inducir la reparación ósea, esto es debido a su excelente potencial osteogénico. Una gran ventaja es la facilidad de extracción, habitualmente mediante aspirado de médula ósea.

Se pueden utilizar terapéuticamente de diversas formas.

Terapias celulares sin expansión en cultivo

- **Trasplante directo:** las células madre frescas se aíslan y se trasplantan directamente en el tejido, mediante su diferenciación *in vivo* se convertirán en el tipo celular deseado.
- **Trasplante tras concentración:** para aumentar el número de células mesenquimales y tras una mínima manipulación, es posible separar las células y concentrarlas. Para ello, se extrae por aspiración al vacío un volumen definido de médula ósea de la cresta ilíaca. El aspirado se suspende en una solución con heparina y citrato-dextrosa, como anticoagulantes, en una bolsa de transfusión. Posteriormente, las células mononucleares se separan en un proceso de centrifugado mediante gradiente de densidad (113).

Terapias celulares con expansión *ex vivo*

Las células se cultivan en laboratorio para expandir la población celular, pero hay que mantener la calidad de las células, especialmente las características biológicas. A pesar de la relativa alta estabilidad genética de las MSCs, el daño en el genoma ocurre en fases tardías. Hay que valorar si estos efectos genotóxicos del cultivo prolongado se manifiestan clínicamente después del retrasplante (113).

Modificación por ingeniería genética

Las MSCs pueden ser modificadas por ingeniería genética para expresar ciertos tipos de genes y prediferenciarse antes de la implantación, de esta forma se realizan cambios epigenéticos (73, 143).

Administración de citoquinas

Mediante la administración de citoquinas específicas, se pueden reclutar células madre circulantes endógenas hacia el lugar de la lesión y así facilitar la proliferación tisular, migración, adhesión y diferenciación (73).

Matriz osteoconductora

De cualquiera de las formas anteriormente descritas, las MSCs se pueden añadir a una matriz osteoconductora que puede ser sintética o natural. Funciona como un soporte cuyo objetivo es facilitar el efecto local de las células. Otras denominaciones son las de andamio o *scaffold* en terminología anglosajona (60, 144). También se pueden realizar construcciones más complejas mediante ingeniería tisular (145).

2.2.9 FUCOSILACIÓN

La distribución de las MSCs tras la infusión intravenosa, estudiada en diferentes modelos animales, indica que la mayor parte de las células administradas quedan retenidas en la microcirculación de los grandes filtros pulmonares del organismo (pulmón, hígado y bazo). Por lo que, finalmente, el número de células que alcanza el tejido diana es limitado. Esto se ha visto en un estudio realizado por nuestro grupo, en el que se inyectaron MSCs humanas por vía intravenosa en ratones. Se comprobó que, tras las primeras 24 horas y hasta el séptimo día, únicamente eran detectables en pulmón y no se detectaron de manera consistente ni en hígado ni en hueso (146).

Para optimizar el rendimiento, se están ensayando estrategias para aumentar el tropismo de las MSCs por el tejido óseo. Se pueden realizar modificaciones celulares *in vitro* antes del trasplante como es la fucosilación, en la que mediante la glicosilación enzimática, se agregan unidades de azúcar fucosa al antígeno CD44 presente en la superficie de las MSCs (147).

En la fase de anclaje y rodamiento de la transmigración endotelial, se producen interacciones físicas entre la E-selectina de las células endoteliales y el ligando HCELL (*Hematopoietic Cell E and L-selectin Ligand*) de las células madre, lo que facilita su contacto. HCELL es la glicoforma sialofucosilada del antígeno de superficie CD44. Aunque el CD44 se expresa de forma ubicua en todos los tipos celulares humanos, su glicoforma HCELL se encuentra exclusivamente en la membrana de las células progenitoras hematopoyéticas. Esto lo hacen gracias a la enzima fucosiltransferasa VII, que apone una fucosa en posición α -1,3 a la N-acetil glucosamina en los residuos lactosamina. Las MSCs no expresan HCELL, pero tienen una fuerte expresión de antígeno CD44. El Dr. Robert Sackstein y su grupo diseñaron un método para modificar de forma transitoria el antígeno CD44. Esto lo realizan mediante fucosilación enzimática *ex vivo* por medio de la fucosiltransferasa VI, consiguiendo MSCs con la glicoforma HCELL (148-150). Mediante esta técnica, se incrementa significativamente la adhesividad de las células al endotelio y se potencia la transmigración endotelial. Permite la extravasación y un mayor tropismo por el hueso (151), por lo que abre la posibilidad de mejorar el rendimiento de la infusión intravenosa de las MSCs y, por consiguiente, su eficacia terapéutica (152-156).

2.3 EL MODELO EXPERIMENTAL

2.3.1 GENERALIDADES

Los resultados obtenidos en estudios *in vitro* pueden ser difíciles de extrapolar a organismos vivos. Por esta razón, la investigación en modelos animales es, en ocasiones, el paso previo para poder evaluar la seguridad y eficacia de nuevas terapias. Para que esta experimentación sea científica, debe cumplir una serie de condiciones y garantías.

Para estudiar la fisiopatología de las alteraciones de la consolidación, se necesitan modelos fiables y reproducibles. Estos modelos animales deben estar bien estandarizados y, lo más importante, deben aproximarse a la situación clínica en los seres humanos. Solo los estudios con el uso de los modelos apropiados, contribuirán a una mejor comprensión de los mecanismos de la enfermedad y ayudarán al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. No obstante, no existe un modelo perfecto que replique la consolidación de las fracturas en humanos (2), ni todos los modelos animales con una fractura que no consolida favorablemente, pueden ser adecuados para estudiar los problemas de consolidación (157).

Aunque el empleo de animales de experimentación se remonta a la antigüedad, Russell y Burch establecieron en 1959 el "principio de las 3R" (Reducción, Reemplazamiento y Refinamiento) en su libro *"The Principles of Humane Experimental Technique"* (158). Con posterioridad, se ha desarrollado todo un sistema legal de protección animal que persigue principalmente dos objetivos, asegurar el mejor trato posible al animal de experimentación y desarrollar protocolos experimentales homologados. Además, se hará todo lo posible por emplear métodos alternativos que eviten o minimicen al máximo el empleo de animales. Toda esta normativa se ha incorporado a los comités de bioética que examinan los proyectos de investigación. Mientras no encontremos métodos alternativos que puedan sustituir a los modelos animales, la experimentación animal debe desarrollarse bajo la normativa vigente, que no solo regula y protege la investigación científica, sino que garantiza la seguridad de las personas, los animales y el medio ambiente.

2.3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURAS

2.3.2.1 Diferencias entre especies animales

Un modelo experimental para estudiar la reparación ósea debe reflejar la fisiología y la biomecánica lo más fielmente posible a lo que ocurre en el humano (159). Por ello, uno de los factores más importantes es la elección de la especie adecuada. Aunque se han utilizado múltiples modelos para investigar la consolidación de fracturas, ninguno cumple con todas las propiedades del tejido óseo humano (160).

El tiempo de consolidación estimado de las fracturas es variable en función de la especie. Este factor debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar el modelo experimental (157, 161). También existen otras diferencias morfológicas y fisiológicas, una de ellas es el diferente tiempo de cierre fisario, otra, el hecho de que la bipedestación en humanos hace modificar la densidad mineral ósea y las propiedades biomecánicas del hueso.

Vamos a repasar brevemente las características y diferencias de los modelos animales más utilizados. El modelo de **ratón** en la reparación ósea se usa con frecuencia debido a la facilidad de su adquisición y manejo, además, se pueden diseñar genotipos y fenotipos específicos. Esto se puede realizar mediante la manipulación de modelos modificados genéticamente (*knock out*) y cepas endogámicas (*inbred strains*). En concreto, en ratones NOD/SCID, parece estar retrasada la consolidación de las fracturas, puesto que exhiben defectos inmunitarios severos. De hecho, son apropiados para investigar la importancia de la respuesta inmune en la consolidación y se usan en experimentos de retardo de consolidación o pseudoartrosis. En esta cepa, la consolidación de la fractura está retrasada porque se altera la osificación endondral, aunque la formación ósea en las fases iniciales no se ve afectada (162).

Sin embargo, el hueso murino presenta un crecimiento óseo continuo, ausencia de cierre fisario, un contenido limitado en hueso trabecular y falta de remodelación secundaria o haversiana. Se desconoce si estas diferencias afectan a la fisiopatología de la lesión ósea cuando lo comparamos con otras especies (2, 159). Otro inconveniente es que las pruebas biomecánicas del hueso requieren de equipos altamente sensibles debido a su reducido tamaño (159).

La **rata**, igualmente es un modelo popular de retardo de consolidación y pseudoartrosis. Como ocurre en el ratón, carece de sistema haversiano, tiene un porcentaje importante de hueso inmaduro y poca capacidad de remodelado. Otra limitación incluye el tamaño y la diferente elasticidad del hueso. Sin embargo, la rata es un modelo útil cuando queremos un estudio sobre huesos largos. Con frecuencia, se asume que las cepas endogámicas de ratas son genéticamente homogéneas, lo que sería una ventaja, pero existe cierta heterogeneidad genética en la variación del número de SNPs (polimorfismos de nucleótido único). Se desconoce cómo puede afectar esta variación.

En las ratas ovariectomizadas, sobre todo si son añosas, podemos encontrar disminución de la densidad mineral ósea y retraso en la consolidación. Es por esta razón que sería un modelo adecuado para el estudio de osteoporosis o de fracturas osteoporóticas (163).

En general, hay mayores dificultades para el desarrollo de modelos estandarizados y fiables de retardo de consolidación y pseudoartrosis en murinos, debido a que tienen una gran capacidad de curación al ser animales inferiores en la escala filogenética. Incluso fracturas con pobre fijación mecánica o sin fijación, son capaces de consolidar sin un retraso

significativo (157, 161). A pesar de lo descrito, los modelos murinos se emplean con frecuencia en estudios de la regeneración del tejido óseo (164), entre otras cosas porque los resultados pueden determinarse después de periodos cortos de estudio. Como ventajas, encontramos que son animales de cría rápida, fáciles de alojar, son higiénicos y de coste asequible. Además, la mayoría de las intervenciones pueden ser realizadas por un solo investigador.

Veamos otros modelos de mayor desarrollo en la escala filogenética. El **conejo** ofrece ventajas similares a las del ratón y la rata en cuanto a adquisición, mantenimiento, anestesia y monitorización del dolor, pero también difiere en tamaño y peso corporal en comparación con los seres humanos. A diferencia de los roedores, se utilizan más cepas exogámicas (*outbred strains*), por lo que se requieren estudios con un mayor número de animales debido a la variación individual. El hueso del conejo sí que contiene sistemas haversianos y su densidad mineral ósea es similar a la nuestra, por lo que es un modelo adecuado y utilizado en la investigación (164). No obstante, tiene un remodelado muy rápido que puede crear falsas expectativas (2, 159).

Es el **modelo canino** el que más se aproxima a la composición del hueso humano, con una densidad mineral ósea similar. La capacidad de remodelación ósea es muy variable (159, 160) y, biomecánicamente, el hueso cortical es capaz de soportar mayores fuerzas de compresión. Como otros inconvenientes tenemos que son animales caros y demandantes para mantener. Finalmente, las cuestiones éticas adicionales hacen que no sea un modelo habitual de estudio (2).

Las **ovejas** ofrecen la ventaja de poseer un peso corporal similar a las personas adultas y tienen huesos largos de dimensiones apropiadas para probar los implantes quirúrgicos (2, 164). El hueso de la oveja tiene una macroestructura comparable, también la remodelación ósea y la consolidación son similares a las del humano. Sin embargo, desde el punto de vista histológico, es diferente (159, 164). Otra característica es que cuando las ovejas envejecen, la fisiología ósea se asemeja a la nuestra y aumenta el hueso osteoporótico. Por este motivo, podría ser un modelo adecuado para estudio de la osteoporosis (2). Tanto la edad como la nutrición deben ser tenidas en cuenta cuando se elige este modelo animal para la experimentación.

Los **caballos** son unos buenos modelos preclínicos para la regeneración ósea, pues tienen remodelación haversiana. Pero la reparación de la fractura no es exactamente igual a la humana por tener una rápida expansión perióstica con hueso plexiforme. Son un modelo adecuado para estudios de artrosis y otros problemas articulares, sin embargo, tienen el inconveniente del elevado coste económico (2).

Los **cerdos** se consideran modelos representativos cercanos a nuestra regeneración ósea debido a su anatomía, morfología, densidad, capacidad curativa y remodelación. Además,

tienen una estructura ósea lamelar similar a la de los seres humanos, aunque con una red trabecular más densa. El tamaño del cerdo es relativamente más pequeño, por lo que no se pueden usar los mismos implantes (159, 164). Sí que es un buen modelo para probar sustitutos óseos en defectos porque su tasa de regeneración ósea es comparable. Son animales más difíciles de manejar, dado que son ruidosos y agresivos. A menudo son rechazados en favor de otras especies (164).

Todas estas diferencias que se han descrito entre el tejido óseo de los animales y los humanos ponen de manifiesto la complejidad de diseñar un modelo experimental completamente extrapolable. La combinación de animales pequeños y grandes tendría que ser necesaria para transferir los hallazgos de la investigación básica a la aplicación clínica (165).

Independientemente de las especies, existen otros factores que alteran los resultados, como son las propias características demográficas de los animales. Por tanto, debemos tener en cuenta la edad y el sexo del animal de experimentación.

- **La edad:** afecta tanto a la calidad del hueso como al tiempo de reparación de la fractura. Las mitosis son más lentas en los animales de mayor edad, entran menos células en el ciclo mitótico y se diferencian significativamente menos células precursoras osteogénicas. En cualquier estudio, la edad del animal debe ser cuidadosamente controlada (157, 159, 163, 166).
- **El sexo:** los ciclos hormonales de las hembras influyen en el recambio óseo y en la reparación de las fracturas (157, 166). La densidad ósea y el crecimiento endocranal se enlentecen durante los ciclos reproductivos y la lactancia. Teniendo en cuenta los diferentes animales, la rata es la especie en la que las hembras se recuperan más rápido al finalizar los ciclos reproductivos (167). En un modelo experimental para el estudio de fracturas, el sexo de los individuos debe ser constante. Se prefiere que los animales sean del sexo masculino para que las fluctuaciones hormonales no influyan en los resultados, salvo en estudios de osteoporosis en los que se elegirán hembras.

2.3.2.2 Diseño del modelo experimental de fractura

Ya hemos visto que son diversos los factores dependientes de las características del animal que pueden alterar el resultado final del estudio, pero también lo son las diferentes técnicas quirúrgicas o implantes utilizados.

Fractura abierta o cerrada

En primer lugar, se puede optar por realizar una fractura abierta o cerrada. Ambos métodos tienen sus ventajas e inconvenientes.

Existen técnicas capaces de producir una **fractura cerrada** en el hueso del animal, de forma que se conserva más vascularización procedente del periostio, musculatura y tejidos circundantes, además de que el hematoma permanece contenido en el lugar de la fractura (168). En contraposición, se pierde precisión, resulta más difícil realizar la fractura siempre en el mismo segmento óseo, evitar la conminución o estandarizar la orientación del trazo fracturario (169). Si con este método empleamos el enclavado intramedular como método de estabilización, vamos a reproducir con bastante fidelidad una consolidación secundaria por osificación endocranal (157). Aunque son técnicas utilizadas, lo cierto es que existen menos modelos cerrados (170-173).

Si, por el contrario, utilizamos **técnicas abiertas**, perdemos el hematoma fracturario. De esta forma no solo alteramos la consolidación, sino que aumentamos el riesgo de infección. Otra desventaja de los modelos abiertos es la necesidad de un abordaje lateral invasivo y un mayor daño tisular. Con un método abierto se gana en precisión y reproducibilidad de la fractura, además, permite la visualización directa de la alineación ósea y la colocación de los implantes quirúrgicos en el mismo acto quirúrgico (159). Estos modelos permiten una fijación más rígida comparada con los modelos cerrados, lo que nos puede interesar según el modelo que busquemos (170).

Método de realización de la fractura

También debemos tener en cuenta el método de creación de la fractura. En los **métodos cerrados** la fractura se realiza utilizando un **sistema de flexión de tres puntos**, que tiene su origen en la guillotina de tres apoyos descrita por primera vez por Einhorn y Bonnarens (172) (figura 9). Después lo han empleado otros autores ideando dispositivos similares que aplican una fuerza lateral a la diáfisis del fémur (170, 174, 175). Como es lógico, el procedimiento es menos reproducible, ya que el fémur no está expuesto y se deben usar puntos de referencia óseos para colocar el elemento de impacto sobre la diáfisis. En contraposición, se produce menor daño de los tejidos blandos y la fractura va a tener más estabilidad inherente a la envoltura muscular (159).

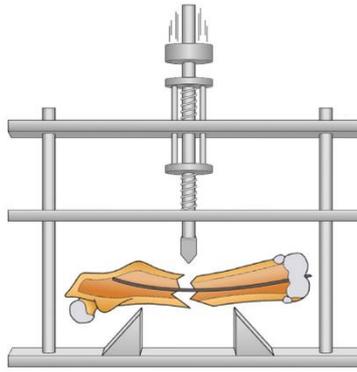


Figura 9. Esquema representativo del sistema de flexión de tres puntos, que tiene su origen en la guillotina de tres apoyos descrita por Einhorn y Bonnarens. Imagen tomada de Gunderson 2020 (169).

En los **métodos abiertos** va a influir la herramienta empleada, se puede usar una **sierra de Gigli** (176), una **sierra oscilante** (177) o una **fresa** (178). Esta osteotomía crea una fractura más limpia y controlada, pero la reacción del tejido óseo difiere a la producida por la fractura y puede alterar la consolidación (157). En el caso de la sierra oscilante, la generación de calor puede provocar necrosis tisular. El modelo de osteotomía debe utilizarse con precaución en investigación, puesto que puede implicar una diferencia en la curación histológica y biomecánica (159).

Técnicas de estabilización

Por último, hay que tener en cuenta las diferentes técnicas de estabilización. Si utilizamos técnicas de fijación rígida, como las placas, predominará la consolidación intramembranosa; si optamos por una fijación elástica, mediante enclavado o fijador externo, predominará la consolidación endondral. Teniendo esto en cuenta, elegiremos el método de fijación que nos interese para el modelo experimental (163, 168).

Los **fijadores externos** son un tipo de fijación muy utilizada. Su ventaja fundamental es que, al implantarse lejos del foco de fractura, no interfieren con la evaluación radiológica, histológica o biomecánica (159, 177). Además, se pueden retirar fácilmente, prácticamente sin manipular la región a estudio. Los inconvenientes de su uso a largo plazo están asociados al riesgo de infección y osteolisis (179).

Dentro de la **fijación interna** se incluyen la fijación intramedular y las placas de osteosíntesis.

La **fijación intramedular** es un método empleado con frecuencia en animales de todos los tamaños y permite la reparación indirecta de las fracturas (179-181). Entre estos dispositivos incluimos las **agujas**, **clavos** o **tornillos intramedulares**. Sus inconvenientes son la agresión de la vascularización endomedular, la interferencia con las evaluaciones radiológicas y la posible alteración del foco con la retirada del material (159). Una variación de esta técnica es el

denominado *pin-clip*, que consiste en la asociación de una aguja intramedular con un clip externo, de forma que se mantiene el defecto óseo creado o la distracción del foco de fractura (169, 181, 182).

El método de fijación más estable lo proporcionan las [placas de osteosíntesis](#) y permiten la reparación directa del foco de fractura (176, 183, 184). Sus desventajas son las siguientes: la necesidad de una cirugía abierta para su implantación, el aumento del riesgo de infección, la eliminación del hematoma fracturario y el daño del periostio. Además, los resultados de los estudios biomecánicos podrían verse alterados por el debilitamiento de la cortical debido a los orificios de los tornillos (159). Las ventajas de las placas son la estabilidad que proporcionan al hueso y que se puede iniciar la carga inmediata de la extremidad tras la intervención.

2.3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE RETARDO DE CONSOLIDACIÓN Y PSEUDOARTROSIS

Es difícil establecer un marco temporal a partir del cual una fractura no consolidará y esto es similar en los animales, además de variable en función de la especie. En humanos, un periodo de 6 meses es el aceptado para definir la no unión o pseudoartrosis. Si consideramos que el tiempo de consolidación normal es de 8 semanas en huesos largos, la pseudoartrosis es casi tres veces superior al tiempo requerido para la consolidación normal.

En el caso de los ratones, debido al gran potencial que tienen para la reparación ósea, el desarrollo de un modelo reproducible de pseudoartrosis es exigente. Se requieren alrededor de 4 semanas para una consolidación ósea normal, por tanto, la pseudoartrosis debe ser definida como fracaso de la consolidación después de un periodo de tiempo tres veces superior, es decir, 12 semanas. En ratas es de 15 semanas. Estas definiciones son acordes con los modelos de pseudoartrosis descritos (157).

Se pueden diferenciar tres tipos de modelos en función del objetivo del estudio: retardo de consolidación, pseudoartrosis hipertrófica o pseudoartrosis atrófica. Se han publicado multitud de modelos experimentales, con tasas de éxito dispares.

2.3.3.1 Modelo de retardo de consolidación

De nuevo, el problema de diseño de estos modelos es la falta de consenso sobre qué se considera retardo de consolidación. Para que un modelo animal sea considerado adecuado, es necesario que haya un grupo control en el que se demuestre que se han superado los plazos de tiempo de consolidación para esa misma fractura. Se han publicado pocos modelos que cumplan estas premisas, dado que es el modelo más difícil de conseguir (157).

2.3.3.2 Modelo de pseudoartrosis hipertrófica

Tampoco hay muchos animales que hayan conseguido un modelo estable de pseudoartrosis hipertrófica, demostrada radiológica e histológicamente. La mayor parte de los estudios lograron pseudoartrosis atróficas.

El primer informe de un método fiable para desarrollar pseudoartrosis de fracturas en ratones es el realizado por Oetgen y colaboradores en 2008 (185), es el modelo que hemos elegido para nuestro estudio. Hietaniemi utiliza previamente un modelo en ratas en el que logra la pseudoartrosis mediante una fijación inestable asociada a una cauterización semicircunferencial del periostio (186). Siguiendo estos modelos, lo más probable es que se desarrolle una pseudoartrosis hipertrófica. Otro modelo de pseudoartrosis hipertrófica es el descrito por Cullinane, quien realiza una osteotomía en ratas de 3 mm estabilizada con fijador externo y a la que aplica una tensión de flexión diaria (187).

2.3.3.3 Modelo de pseudoartrosis atrófica

Para establecer un modelo experimental de pseudoartrosis atrófica, debemos añadir algo más a la osteotomía para impedir la consolidación. Esto lo podemos conseguir con varios procedimientos:

- **Interposición de un material extraño a la fractura:** se interpone en el foco de fractura un material que impida la consolidación. Fue uno de los primeros métodos en utilizarse, pero su reproducibilidad es limitada y sus resultados inconsistentes. El modelo de Azad interpone una esponja de colágeno (188), Fujita interpone músculo (189) y Schmidhammer interpone una lámina de silicona (183).
- **Agresión térmica o química:** se basa en lesionar el periostio bien por cauterización, lesión térmica por fresa de alta velocidad o mediante algún procedimiento químico. De esta forma se altera el potencial biológico y se simula la pseudoartrosis atrófica.

Son ejemplos de estos modelos los realizados por los siguientes autores. Geris crea la fractura con una fresa de alta velocidad provocando un aumento de temperatura a nivel del foco que destruye el periostio circundante (190), mientras que Minkwitz emplea un disco de diamante (175). El modelo de Kokubu está basado en el modelo de Bonnarens-Einhorn para crear una fractura femoral cerrada, en el grupo que va a inducir pseudoartrosis abre a nivel del foco y realiza una cauterización del periostio. Posibles limitaciones a esta técnica son una adicional necrosis térmica del hueso cortical cercano a la fractura y variaciones en la disección de los tejidos blandos durante el procedimiento quirúrgico abierto (191). Hietaniemi desarrolló un modelo de pseudoartrosis en ratas basado en la inestabilidad rotacional y cauterización del periostio (186). En el modelo de Oetgen, el periostio lateral se

cauteriza 2 mm proximal y distal a la fractura creada, asegurándose de que el periostio medial no se lesiona y así evitar la total devascularización de la fractura. A pesar de la lesión perióstica, este modelo se describe como pseudoartrosis hipertrófica debido a la inestabilidad proporcionada por la fijación de los fragmentos (185).

- **Eliminación del foco de fractura:** puede realizarse mediante una irrigación continua del foco para eliminar el hematoma fracturario (157, 192) o mediante reintervención quirúrgica con el objeto de eliminar el tejido reparativo. Este último ha conseguido buenos resultados, pero tiene el inconveniente de que los animales deben someterse a una segunda cirugía (159, 193).

- **Creación de un defecto óseo segmentario:** consiste en la eliminación de un segmento óseo de tamaño variable, según los estudios. En general, en el modelo murino, el defecto se puede clasificar en defecto óseo menor (inferior a 3 mm) y defecto óseo crítico (de 3 a 8 mm). Como ejemplo de defecto óseo menor tenemos los modelos de Einhorn, Kaspar, García y Pérez Núñez (172, 179, 194, 195); como ejemplo de defecto óseo crítico, los modelos de Hsu, Zhang y Mehta (166, 179, 196, 197). Son modelos ampliamente utilizados y, en ocasiones, combinan una resección o daño térmico del periostio. Hay autores que no recomiendan esta asociación, porque es difícil distinguir entre el defecto óseo y la lesión de los tejidos blandos como causantes de la alteración de la consolidación (157). La realidad es que la mayor parte de los defectos óseos menores la asocian, porque la osteotomía por sí sola no suele ser suficiente para impedir la consolidación.

3 JUSTIFICACIÓN

3 JUSTIFICACIÓN

Debido al envejecimiento de la población y el aumento de enfermedades crónicas como la osteoporosis y la diabetes, no solo están en aumento las fracturas, sino el porcentaje de estas mismas que desarrollarán complicaciones como el retardo de consolidación o la pseudoartrosis. Todo ello supone una gran impacto clínico, social y económico.

La consolidación del hueso después de una fractura no es un proceso de cicatrización, más bien se asemeja a una regeneración tisular, formando un tejido óseo semejante al original. Esto indica que las células y señales moleculares que conducen a la formación del nuevo tejido están todavía presentes en el hueso adulto, de ahí la importancia que tienen las MSCs.

Giannoudis describió el “concepto de diamante” para interrelacionar los factores implicados en la consolidación de las fracturas. Nuestra propuesta de tratamiento corresponde a la punta del diamante que hace referencia al ambiente biológico, en concreto, a las células osteogénicas. Las células precursoras de los osteoblastos son las células madre mesenquimales, cuya fuente natural es la médula ósea.

El tratamiento de la pseudoartrosis es un reto para traumatólogos y cirujanos ortopédicos debido a la complejidad de su abordaje. Por este motivo se buscan terapias alternativas a los tratamientos estándar como el aporte de injerto óseo autólogo. Uno de estos tratamientos es el basado en terapias celulares. Las MSCs son células multipotentes y pueden diferenciarse a osteoblastos, pero también a adipocitos o condrocitos. Es por esta razón por la que son candidatas de gran interés para la medicina reparativa.

Las MSCs pueden aislarse fácilmente a partir de las células mononucleares presentes en los lavados o aspirados medulares, pudiendo mantenerse en cultivo, lo que permite su expansión. Mediante la diferenciación de estas células hacia precursores osteoblásticos y, posteriormente, hacia osteoblastos maduros, serán capaces de reparar los defectos esqueléticos.

La función de las MSCs humanas se estudia habitualmente en trasplantes realizados en roedores. Se sabe que estas células son capaces de formar tejido óseo en el tejido celular subcutáneo de ratones y ahora se va a estudiar la capacidad de consolidación en un modelo de fractura femoral en ratones NOD/SCID.

Una opción es la administración de las MSCs por vía intravenosa, tras lo cual, las células circulan por todo el organismo. Después hay que estudiar su tropismo hacia el sitio diana, en nuestro caso, la fractura. Para facilitar el proceso, también se prueba la inyección de las MSCs directamente en el foco de fractura.

Por otra parte, vamos a comparar el origen de las MSCs humanas, que pueden aislarse de pacientes con fractura osteoporótica de cadera o de pacientes con coxartrosis. No está claro si las MSCs de pacientes con osteoporosis podrían ser adecuadas en estrategias de terapia celular, ya que el número y la actividad de los precursores osteogénicos pueden estar disminuidos. Mientras que las que tienen su origen en pacientes con artrosis no deberían tener alterado su potencial regenerativo.

Este trabajo tiene por objeto el estudio de una línea de tratamiento de las fracturas o sus complicaciones, mediante una terapia basada en células formadoras de tejido óseo como son las células madre mesenquimales.

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis general de este estudio es que las células madre mesenquimales cultivadas *in vitro* tienen capacidad regenerativa en la consolidación de fracturas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

1. Valorar la consolidación ósea en un modelo experimental de fractura femoral, mediante la inyección sistémica o local en el foco de fractura, de MSCs cultivadas *in vitro* de cabezas femorales de pacientes con fractura osteoporótica o coxartrosis.

Objetivos específicos:

1. Diseñar un modelo experimental de fractura diafisaria femoral en ratones NOD/SCID, apropiado para la valoración del tratamiento con MSCs humanas.
2. Valorar la consolidación ósea del modelo experimental mediante estudio radiológico por micro-TC.
3. Valorar la consolidación ósea del modelo experimental mediante estudio histológico.
4. Valorar la correlación entre el estudio radiológico y el histológico.
5. Valorar la diferencia en la consolidación ósea de los grupos en los que se inyectan MSCs cultivadas *in vitro*, respecto a los grupos control en los que no se inyectan células.
6. Valorar la diferencia en la consolidación ósea de las MSCs cultivadas *in vitro* en función de la vía de administración, sistémica o local en el foco de fractura.
7. Valorar la diferencia en la consolidación ósea de las MSCs cultivadas *in vitro* de pacientes con fractura osteoporótica de cadera, respecto a las obtenidas de pacientes con coxartrosis.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5 MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se expone la creación del modelo experimental de fractura, los tratamientos practicados a los animales con las células mesenquimales, los estudios realizados y la metodología para el análisis de los datos obtenidos. Esta investigación fue financiada mediante una beca del Instituto de Salud Carlos III, PI16/00915 (véase anexo I).

5.1 DISEÑO DEL MODELO EXPERIMENTAL

5.1.1 ELECCIÓN DEL ANIMAL Y LA ESPECIE

La primera etapa del proyecto fue el diseño del modelo experimental, para lo que el primer paso fue decidir el animal y la cepa a utilizar en nuestro experimento. Esto nos llevó a la elección de ratones NOD.CB17-Prkdc scid/J, también conocidos como NOD/SCID, obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA).

Las características favorables a la hora de trabajar con ratones son, como ya se ha comentado, su asequibilidad y accesibilidad, además de tener una tasa de reproducibilidad alta. Además, el tiempo de consolidación de las fracturas es breve, lo que permite estudiar un número adecuado de individuos en un tiempo razonable. En cuanto al manejo en el estabulario, son animales higiénicos y el personal está familiarizado con sus cuidados, puesto que son ampliamente utilizados en experimentación animal.

La elección de una cepa de ratones inmunodeficientes fue debida a que son idóneos para experimentos de transferencia celular, porque íbamos a administrar células humanas primarias sin que mostraran rechazo inmunológico. La cepa NOD.CB17-Prkdc scid/J es una cepa de modelo de ratón endogámico que se caracteriza por presentar una inmunodeficiencia muy grave. La mutación “scid” (*severe combined immunodeficiency*) es autosómica recesiva y apareció espontáneamente en el año 1980 en el *Fox Chase Cancer Center* de Filadelfia (Estados Unidos). Se trata de un gen de reparación del ADN llamado Prkdc (*protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*) lo que bloquea la diferenciación temprana de los linfocitos B y T. Los ratones homocigotos scid/scid (ratones SCID), cuya apariencia externa es normal, poseen niveles muy bajos o directamente carecen de inmunoglobulinas en suero. Los ganglios linfáticos, el bazo y el timo son anormalmente pequeños y rudimentarios, y carecen de linfocitos y células plasmáticas. La ausencia de células B y T maduras explica la incapacidad de estos animales de generar una respuesta inmune, tanto humoral como celular. El término “NOD” (*non obese diabetes*) de la cepa hace referencia a una línea consanguínea de ratones que desarrolla de forma espontánea una patología muy similar a la diabetes tipo I humana, solo que aquí no se desarrolla por la alteración de la inmunidad. Debido a la inmunodeficiencia que presentan estos ratones,

deben manipularse en condiciones de esterilidad, empleando campana de flujo laminar y utilizando comida y bebida esterilizada.

Otra característica de los ratones NOD/SCID es que son albinos, por lo que su pelaje es completamente blanco, además han sido descritos como animales muy activos y nerviosos, se reproducen bien y tienen camadas grandes.

5.1.2 CREACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA FEMORAL EN RATONES NOD/SCID

En primer lugar, se realizó un estudio piloto con animales que no se incluyeron en los análisis definitivos. Todo ello con la finalidad de evaluar el modelo teórico diseñado previamente y perfeccionar la técnica quirúrgica.

Nuestro propósito fue la creación de un modelo experimental de fractura con un ambiente mecánicamente inestable, además de alterar varios aspectos biológicos de la consolidación de la fractura. Se resumen en los siguientes puntos:

- Abordaje quirúrgico abierto para la creación de la fractura, lo que implica la pérdida del hematoma fracturario.
- Realización de la fractura a nivel de la diáfisis femoral. Esta es una localización anatómica propensa al desarrollo de alteraciones en la consolidación debido a sus características histológicas, biomecánicas y de vascularización.
- Fijación inestable de la fractura mediante un implante intramedular no bloqueado.
- Alteración de la vascularización endóstica debida al dispositivo intramedular.
- Cauterización del periostio a nivel del foco de fractura como lesión añadida a la alteración de la consolidación.

El modelo elegido fue descrito por Oetgen y colaboradores en 2008 (185). Para la realización de la fractura se empleó un abordaje lateral del fémur derecho, al que se practicó una osteotomía completa en su tercio medio realizada mediante corte con un bisturí del número 15. Posteriormente, se sintetizó la fractura mediante enclavado retrógrado con aguja de 27 G. Tras la osteosíntesis, se cauterizó el periostio alrededor de la osteotomía para ralentizar la consolidación.

Uno de los problemas que nos encontramos fue la realización de la osteotomía. El fémur del ratón es muy pequeño y su diámetro a nivel diafisario es de 2 a 2.5 mm, por lo que no disponíamos de una sierra oscilante lo suficientemente pequeña, creando trazos de fractura

generalmente conminutos. Finalmente, mediante corte con bisturí del número 15, logramos realizar fracturas de trazo transverso simple, de forma reproducible.

En otros modelos de fractura se utilizan murinos como las ratas que, aunque también de pequeño tamaño, permiten el alojamiento en el fémur de implantes de mayores dimensiones, como tornillos o fijadores externos. Estos dispositivos confieren más estabilidad a la fractura. El canal medular femoral del ratón NOD/SCID es tan pequeño que solo podía albergar una aguja fina de 27 G. El inconveniente de las agujas es que, aunque confieren alineamiento de los extremos óseos y cierta estabilidad anteroposterior y mediolateral, no proporcionan estabilidad rotacional.

Nosotros estábamos condicionados al empleo de estos animales para poder albergar los implantes de células humanas. A pesar de que es una osteosíntesis inestable, los animales consolidaron sin deformidad residual.

Otras diferencias anatómicas entre el fémur del humano y el ratón hacen que se planteen problemas técnicos en la ejecución del enclavado. En la práctica clínica, el enclavado femoral se suele realizar por abordaje anterógrado, mientras que el abordaje retrógrado se emplea para fracturas femorales distales, politraumatizados o cuando existen problemas de inserción a nivel del trocánter mayor. Las características anatómicas de la cadera del ratón imposibilitan su inserción anterógrada, ya que el trocánter mayor es muy estrecho en el plano anteroposterior. Se eligió un abordaje desde el foco de fractura de forma anterógrada hacia el fragmento distal, hasta que la aguja sale por la rodilla en la región intercondílea. Después se avanzó la aguja en sentido retrógrado, reduciendo la fractura y estabilizando ambos fragmentos. Al igual que en las inserciones retrógradas puras desde la rodilla, son técnicas más sencillas, pero pueden provocar protrusión de la aguja intramedular a través de la articulación si el implante se moviliza. En la figura 10 se muestra un ejemplo de esta complicación.

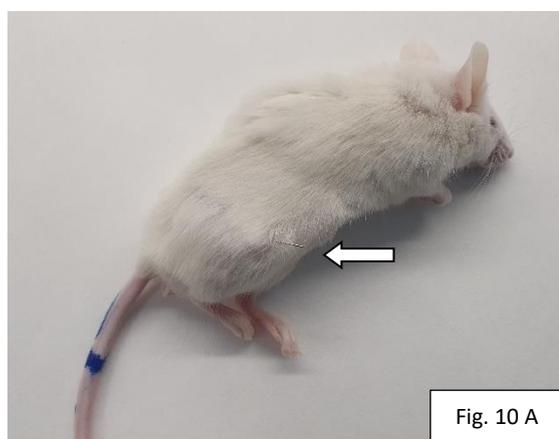


Figura 10 A-B. (A) Ratón con movilización de la aguja y protrusión a nivel de la rodilla. (B) Fémur una vez extraído para estudio donde se aprecia la movilización de la aguja.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Todas las fases de la experimentación animal (recepción, cría, intervención quirúrgica, reanimación, mantenimiento hasta el sacrificio y eutanasia) se realizaron en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Universidad de Cantabria. En lo referente al manejo, salud y bienestar de los animales se rigen por el Real Decreto 53/2013 y por la normativa de la Comunidad Autónoma de Cantabria. El proyecto de investigación animal fue aprobado por la Consejería de Ganadería y por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria, n.º de registro 2016/14 (véase anexo II).

Ya se ha comentado que se escogió como animal de experimentación al ratón macho de cepa NOD/SCID, en concreto, NOD.CB17-Prkdc scid/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Posteriormente, para facilitar la coordinación de fechas entre tener MSCs disponibles en cultivo y ratones de la edad adecuada, mantuvimos y criamos la colonia de ratones NOD/SCID en nuestro estabulario.

Para el estudio se emplearon 68 ratones que fueron intervenidos a las 8 semanas de edad, con un peso entre 24 a 28 gramos.

Los animales se dividieron de forma randomizada en tres grupos experimentales: **Grupo A** en el que ensayó la administración sistémica de MSCs, **Grupo B** en el que se ensayó la administración local de MSCs y **Grupo C** en el que se ensayó la administración sistémica de MSCs fucosiladas. Dentro de cada grupo se establecieron otros subgrupos de la forma siguiente:

- **Grupo A o Grupo de administración sistémica de MSCs:** formado por 29 ratones, a su vez, divididos en:
 - **Grupo A1 o Grupo control de administración sistémica:** formado por 13 ratones a los que se inyectaron 0,1 ml de suero salino sin células.
 - **Grupo A2 o Grupo fractura osteoporótica de administración sistémica:** formado por 8 ratones a los que se inyectaron 10^6 MSCs resuspendidas en 0,1 ml de suero salino, cultivadas *in vitro* de pacientes con fractura osteoporótica.
 - **Grupo A3 o Grupo artrosis de administración sistémica:** formado por 8 ratones a los que se inyectaron 10^6 MSCs resuspendidas en 0,1 ml de suero salino, cultivadas *in vitro* de pacientes con artrosis.

La administración intravenosa de las MSCs, aunque se había previsto inicialmente que fuera a través de la vena de la cola, se sustituyó por inyección en el seno venoso retroorbitario. Se decidió así para que su administración resultara más sencilla y reproducible, dado que los vasos de la cola eran de tamaño muy reducido. Se llevaron a cabo en el segundo día postoperatorio.

- **Grupo B o Grupo de administración local de MSCs:** formado por 30 ratones, a su vez, divididos en:
 - **Grupo B1 o Grupo control de administración local:** formado por 11 ratones a los que se inyectaron 0,1 ml de suero salino sin células.
 - **Grupo B2 o Grupo fractura osteoporótica de administración local:** formado por 9 ratones a los que se inyectaron 10^6 MSCs resuspendidas en 0,1 ml de suero salino, cultivadas *in vitro* de pacientes con fractura osteoporótica.
 - **Grupo B3 o Grupo artrosis de administración local:** formado por 10 ratones a los que se inyectaron 10^6 MSCs resuspendidas en 0,1 ml de suero salino, cultivadas *in vitro* de pacientes con artrosis.

En este grupo, las células fueron administradas directamente en el foco de fractura femoral, en el mismo acto quirúrgico.

- **Grupo C o Grupo de administración sistémica de MSCs fucosiladas:** formado por 9 ratones, a su vez, divididos en:
 - **Grupo C1 o Grupo control de MSCs:** formado por 4 ratones a los que se inyectaron 10^6 MSCs resuspendidas en 0,1 ml de suero salino, cultivadas *in vitro* de pacientes con fractura osteoporótica o artrosis.
 - **Grupo C2 o Grupo de MSCs fucosiladas:** formado por 5 ratones a los que se inyectaron 10^6 MSCs fucosiladas resuspendidas en 0,1 ml de suero salino, cultivadas *in vitro* de pacientes con fractura osteoporótica o artrosis.

Al igual que en el grupo A, las células fueron administradas de forma sistémica a través del seno retroorbitario, en el segundo día postoperatorio.

5.3 AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANAS

5.3.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS MSCs

Las MSCs se obtuvieron de tejido óseo de la cabeza femoral de pacientes sometidos a cirugía de sustitución protésica de cadera, bien por fractura de cadera osteoporótica o por artrosis de cadera. Los pacientes donantes de MSCs fueron intervenidos en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, dando su consentimiento informado por escrito para la extracción de MSCs (véase anexo III). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica de Cantabria, Cód. 2016-0159 (véase anexo IV).

La media de edad de los donantes fue de 82.65 años en el grupo de osteoporosis (rango 53-93) y de 71.78 años en el grupo de artrosis (rango 60-95). Se excluyeron fracturas por alta energía, osteoporosis secundaria o artrosis secundaria.

De la parte central de la cabeza femoral se extrajeron cilindros de hueso trabecular con un trócar de 8 mm de diámetro (figura 11), a los que posteriormente se retiró la parte subcondral y el borde fracturario.



Figura 11 A-B. (A) Cabeza femoral y fragmentos de cuello femoral. (B) Trócar de 8 mm para la extracción de cilindros óseos.

Se realizaron lavados con 50 ml de tampón fosfato salino (PBS) para así obtener una suspensión celular que se separó mediante gradiente de densidad con Lymphoprep™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá) por centrifugado. La capa mononuclear que se

formó en la interfase entre la fase acuosa y la capa de Lymphoprep, es la que se recuperó y se lavó con PBS. Finalmente, se cultivó en frascos de cultivo de poliestireno con *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM®; Sigma-Aldrich que ahora es Merck KGaA, Darmstadt, Germany), alto en glucosa 4.5 g/L, L-glutamina, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio y rojo fenol. Este medio se suplementó con 10 % de suero bovino fetal (SBF), 1 % de penicilina-estreptomicina (10,000 unidades de penicilina y 10 mg estreptomicina por mL en 0.9 % NaCl) y 1 % de anfotericina B (250 µg/mL), (todos de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Al alcanzar una confluencia del 80 % es cuando se realizaron los experimentos de diferenciación celular. Solo se utilizaron células de los 2 primeros pases.

En la figura 12 se muestra la incubadora de nuestro laboratorio con los frascos de cultivo conteniendo las MSCs. En la figura 13 se muestran varias preparaciones de los cultivos celulares en diferentes fases de maduración observadas mediante microscopio óptico.



Fig. 12

Figura 12. Frascos de cultivo con MSCs en la incubadora.

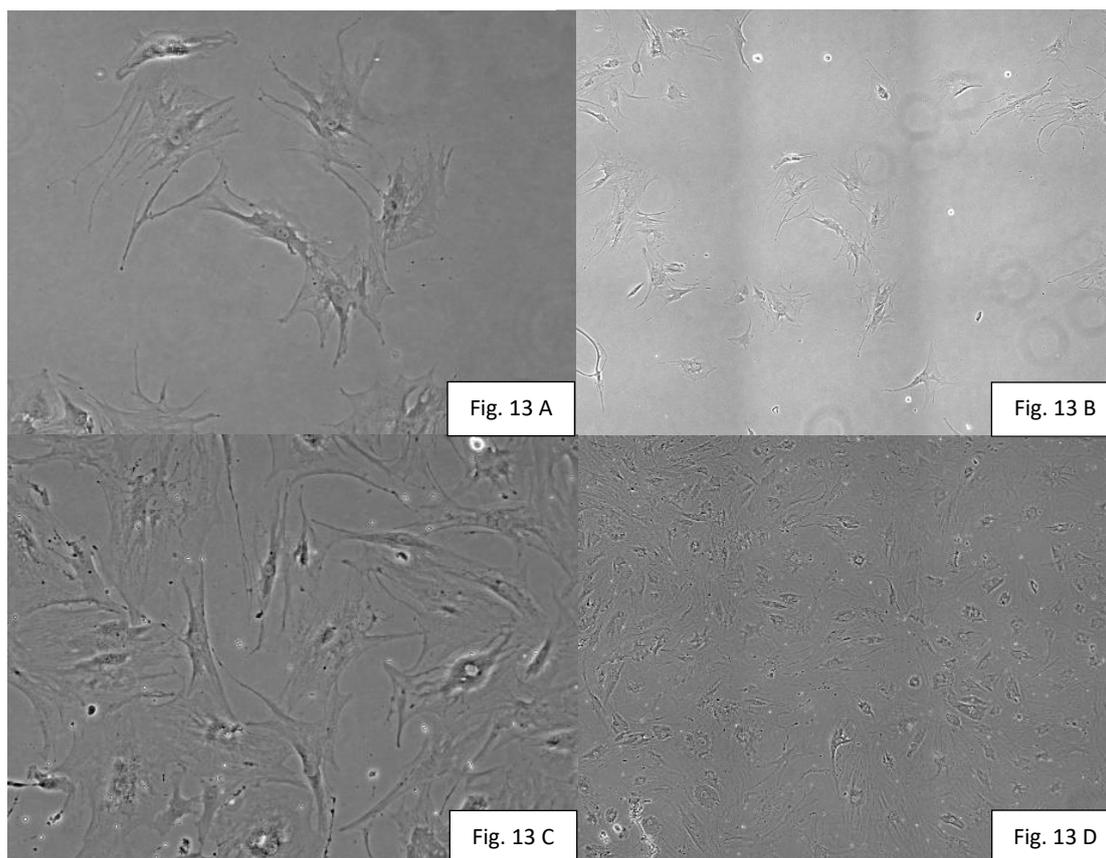


Figura 13 A-D. Células mesenquimales cultivadas en nuestro laboratorio en diferentes fases de maduración y magnificación en microscopio óptico. **(A)** Fase inicial (200 x), **(B)** fase inicial (100 x), **(C)** fase de maduración (200 x), **(D)** fase de maduración (100 x).

5.3.2 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS MSCs

Las MSCs se sembraron con una densidad de 2×10^4 células/cm² en placas de 12 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 1-2 días hasta alcanzar la confluencia. Entonces se añadió el medio de inducción osteogénica. Este medio estaba compuesto por DMEM® suplementado con 10 % de suero bobino fetal (SBF), 100 nM de dexametasona, 50 µM de ácido ascórbico y 10 mM de glicerol 2-fosfato (todos de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El medio se cambió tres veces por semana durante un total de tres semanas.

Comprobamos que bajo estas condiciones las células se diferenciaron hacia osteoblastos y formaron una matriz mineralizada, como se puso de manifiesto con la tinción rojo de alizarín al 2 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). También se evaluó la actividad de la fosfatasa alcalina en los lisados celulares (198).

La obtención de las células, el cultivo y su caracterización se realizaron en el Laboratorio de Investigación Médica Traslacional de la Facultad de Medicina.

5.4 FUCOSILACIÓN

5.4.1 PROTOCOLO DE FUCOSILACIÓN

Se utilizó la fucosiltransferasa VII para fucosilar los receptores de membrana CD44 de las células madre mesenquimales humanas de médula ósea. Los reactivos necesarios para el protocolo fueron los siguientes:

- Solución de Hank o *Hank's Balances Salt Solution* (HBSS), sin magnesio ni calcio (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Tampón HEPES 1 M (HEPES Solution BioXtra, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Albumina humana (Albutein® 20 %, Grifols, Barcelona, España).
- Proteína recombinante humana Fucosiltransferasa VII (RnDSystems, Minneapolis, MN, USA).
- GDP-Fucosa (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Anticuerpo para citómetro HECA-452 (BDBiosciences, San José, CA, USA), que es un anticuerpo monoclonal de rata, antiantígeno de linfocito cutáneo humano marcado con ficoeritrina.

Se siguieron los pasos que se detallan a continuación:

1. Preparación de tampón Fucosiltransferasa VII: para la preparación de 1 ml se añadieron 985 μL de HBSS, 5 μL de Albumina Humana y 10 μL de HEPES 1 M.
2. Preparación de la reacción de fucosilación: las MSCs humanas se resuspendieron en PBS y se cogieron 10^6 células que se centrifugaron en un tubo Falcon de 50 ml. A continuación, se retiró el sobrenadante por decantación y se dejó escurrir boca abajo el resto de líquido. Sobre el *pellet* celular se añadió la reacción completa de fucosilación compuesta por 47.35 μL de tampón Fucosiltransferasa VII, 1 μL de GDP-Fucosa y 1.65 μL de Fucosiltransferasa VII. Las células se incubaron a 37^o C durante 1 hora, agitando suavemente cada 10 minutos, además hubo que añadir HEPES (5 μl cada vez, diluido en tampón 1/10) cada 20 minutos para evitar la acidificación del medio.
3. Finalización de la reacción: pasado ese tiempo, la reacción se cortó con 10 ml de PBS y se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante.

5.4.2 VERIFICACIÓN DE LA FUCOSILACIÓN

Tras la exofucosilación, se separaron 10^5 células que se resuspendieron en 96 μ L de PBS con suero (1 %), a lo que se añadió 4 μ L de anticuerpo HECA-452. La preparación se incubó 15 minutos en ausencia de luz. Se volvieron a lavar las células con 3 ml de PBS con suero (1 %), se centrifugaron y se resuspendieron en 300 μ L de PBS para luego pasar a un volumen fijo para el citómetro.

Se empleó un citómetro de flujo para verificar que las células se habían fucosilado (figura 14). Los controles realizados fueron:

- Células sin anticuerpos, no fucosiladas.
- Células con HECA-452, no fucosiladas.
- Células con HECA-452, fucosiladas.

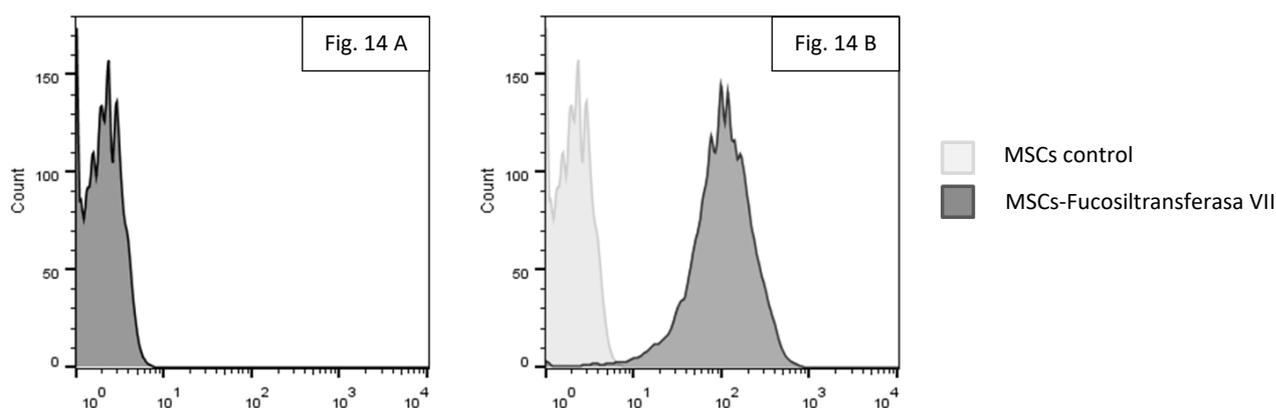


Figura 14 A-B. Verificación de la fucosilación de las MSCs con el citómetro de flujo. **(A)** MSCs sin anticuerpos, no fucosiladas. **(B)** MSCs con anticuerpos, sin y con fucosilación.

5.4.3 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS FUCOSILADAS PARA INYECCIÓN EN EL RATÓN NOD/SCID

Las células se resuspendieron en 210 μ l de medio completo, se pasaron a un tubo Eppendorf y se cargaron en una jeringa para la inyección en el ratón NOD/SCID.

5.5 INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

5.5.1 ANESTESIA Y MANEJO DEL RATÓN NOD/SCID

La intervención quirúrgica se practicó en una campana de flujo laminar (figura 17) y en condiciones de esterilidad en todo momento. Se realizó una anestesia intraperitoneal con Ketamina (Ketolar®, Pfizer-España, Alcobendas, Madrid, España) a dosis de 40 mg/Kg y Xilacina (Rompun®, Bayer HealthCare, Leverkusen, Alemania) a dosis de 2.5 mg/Kg. Así mismo, se administró profilaxis antibiótica mediante Enrofloxacino (Baytril®, Bayer HealthCare, Leverkusen, Alemania) a dosis de 10 mg/Kg, también por vía intraperitoneal.

Como prevención de la hipotermia, la cirugía se realizó sobre una manta eléctrica a temperatura de 36° C.

Al finalizar, para revertir los efectos sedantes, se administró Atipamezol (Antisedan®, Pfizer-España, Alcobendas, Madrid, España) intraperitoneal a dosis de 0.1 mg/Kg. Como analgésico postoperatorio se empleó Buprenorfina (Tecnopren®, Tecnofarma, Ciudad de México, México) por vía intraperitoneal a dosis de 0.1 mg/Kg.

El ratón intervenido se alojó en jaula individual con acceso libre a comida y agua esterilizadas, estando bajo la supervisión del personal del animalario.

En las figuras 15 y 16 se pueden ver los viales de los fármacos administrados y el ratario con las jaulas donde se alojaron los animales de experimentación.

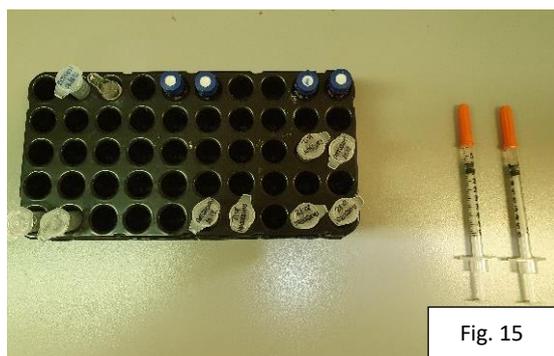


Figura 15. Fármacos empleados en la cirugía.

Figura 16. Ratario con jaulas individuales para el alojamiento de los animales.

5.5.2 TÉCNICA QUIRÚRGICA

La intervención quirúrgica se efectuó con la utilización de instrumental de microcirugía (figura 17) y gafas-lupa quirúrgicas de aumento (3.5x).



Figura 17. Campana de flujo laminar para mantener la esterilidad e instrumental necesario para la cirugía.

La extremidad posterior derecha del ratón se preparó mediante rasurado y aplicación de clorhexidina (Bohmclorh®, Bohm, Fuenlabrada, Madrid, España). Se realizó una incisión lateral en la piel a nivel medio-diafisario del fémur, después se seccionó longitudinalmente la fascia lata y se disecó de forma roma el rafe entre el músculo vasto lateral y el bíceps femoral para realizar un abordaje subvasto lateral (figura 18 A-D).



Figura 18 A-N. Protocolo de intervención quirúrgica. **(A)** Preparación del ratón mediante rasurado de la extremidad. **(B)** Incisión longitudinal centrada sobre el fémur derecho. **(C)** Disección entre el músculo vasto lateral y el bíceps femoral de forma roma para evitar el sangrado. **(D)** Detalle de la disección femoral.

Una vez expuesta la diáfisis femoral procedimos a realizar una osteotomía completa a nivel del tercio medio, realizada mediante corte con un bisturí del número 15 (figura 18 E-F).

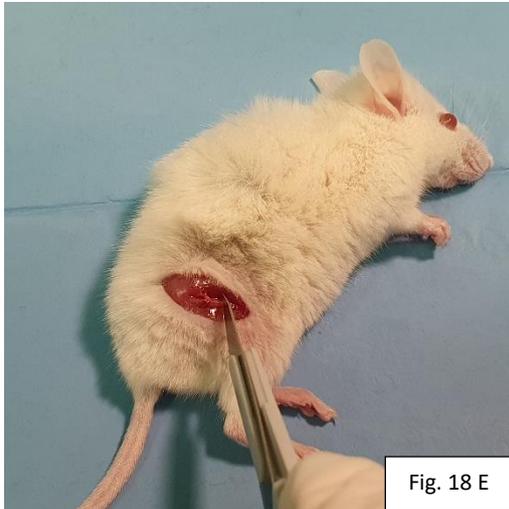


Figura 18 A-N. Protocolo de intervención quirúrgica. **(E)** Osteotomía femoral a nivel del tercio medio mediante bisturí del número 15. **(F)** Detalle de la osteotomía femoral.

Posteriormente, se estabilizó la fractura mediante enclavado con aguja 27 G. Se insertó desde el foco de fractura haciéndola progresar en sentido distal hasta salir por la región intercondílea del fémur, esto fue facilitado por la flexión completa de la rodilla. La aguja se cortó por su base y se continuó avanzando distalmente hasta que la parte proximal quedó a ras de la osteotomía (figura 18 G-H).



Figura 18 A-N. Protocolo de intervención quirúrgica. **(G)** Inserción de aguja 27 G desde el foco de fractura en el fragmento distal, hasta salir por la región intercondílea de la rodilla. **(H)** La aguja se corta a nivel proximal.

Se redujo la fractura afrontando los fragmentos, después, se progresó con la aguja en sentido retrógrado. Se continuó hasta notar cierta resistencia o tope (150 mm en total), lo que indica que nos clavamos en la región trocantérea de la cadera, así se proporciona cierta estabilidad y se evita la migración de la aguja. Finalmente, la aguja sobrante se cortó a nivel de la rodilla para evitar su protrusión (figura 18 I-J). Debemos asegurarnos de que la extremidad presenta una alineación y rotación correcta, que no existe diástasis de la fractura y que el implante no interfiere en la movilidad de la rodilla.



Figura 18 A-N. Protocolo de intervención quirúrgica. **(I)** Reducción de la fractura que queda estabilizada con la aguja al hacerla progresar intramedularmente en sentido retrógrado. Hay que progresar hasta clavarse en la región trocantérea. **(J)** La aguja sobrante se corta a nivel de la rodilla.

Una vez sintetizado el fémur, se cauterizó el periostio alrededor de la osteotomía con un electrocauterio bipolar portátil a 800° C (figura 18 K).



Figura 18 A-N. Protocolo de intervención quirúrgica. **(K)** Cauterización del foco de fractura con electrocauterio bipolar portátil a 800° C.

En el grupo B o Grupo de administración local de MSCs, se procedió a la inyección local de las MSCs a nivel del foco de fractura. Para evitar la migración de las células, previamente se colocó un parche de colágeno de 3 mm² (Lyostypt®, B. Braun, Melsungen, Alemania) y se procedió al cierre de la fascia. Para finalizar, las MSCs se administraron mediante una jeringa Omnifix®-F de 1 ml y aguja Sterican® 25 G de 0.50 x 16 mm (todo de B. Braun, Melsungen, Alemania). La fascia y la incisión de la piel se cerraron mediante sutura no reabsorbible con Prolene® 5-0 (Ethicon, Raritan, NJ, USA) (figura 18 L-N). Posteriormente se aplicó clorhexidina (Bohmclorh®, Bohm, Fuenlabrada, Madrid, España) en la piel.



Figura 18 A-N. Protocolo de intervención quirúrgica. **(L)** Colocación de parche de colágeno de 3 mm² (Lyostypt®). **(M)** Cierre de la fascia e inyección local de las MSCs a nivel del foco de fractura, en el caso del Grupo B o Grupo de administración local. **(N)** Cierre de la incisión de la piel mediante sutura no reabsorbible con Prolene® 5-0.

Como protocolo postoperatorio se permitió la carga inmediata de la extremidad.

5.6 EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO

Los animales se sacrificaron a las 4 semanas de la intervención quirúrgica para la extracción de los fémures a estudio. Para realizar el procedimiento, se sedó a los animales mediante inhalación de éter dietílico, extra puro, SLR, estabilizado con butilhidroxitolueno (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente, se practicó la eutanasia por dislocación cervical. Se procedió a la extracción del fémur intervenido y el contralateral. Como dato técnico, hay que puntualizar que no interesa la extirpación exhaustiva de la musculatura adherida al foco de fractura, de hecho, es preferible cierta cobertura de partes blandas para una mejor imagen radiológica en la micro-TC. La aguja del fémur intervenido no se retiró en este momento, sino que su extracción se realizará en el momento del estudio histológico. Los fémures se fijaron sobre depresores de plástico (figura 19) con cinta adhesiva, en sentido longitudinal y evitando malrotaciones. Se conservaron en tubos Falcon de 15 ml sumergidos en formalina al 10 % neutra tamponada (CellPath, Powys, United Kingdom) (figura 20). El fémur sano contralateral se utilizó para estudiar la presencia de ADN humano en el hueso del ratón y poder confirmar la migración de las MSCs al tejido diana.

Además, en los grupos de administración sistémica de MSCs, se procedió a la extirpación de pulmones e hígado. También se realizó para valorar la existencia de material genético humano en los ratones NOD/SCID. Para ello, se realizó una incisión en línea media que permitió el acceso a las dos cavidades, torácica y abdominal. Igualmente, los órganos extraídos se conservaron en formalina al 10 % hasta su estudio.



Fig. 19

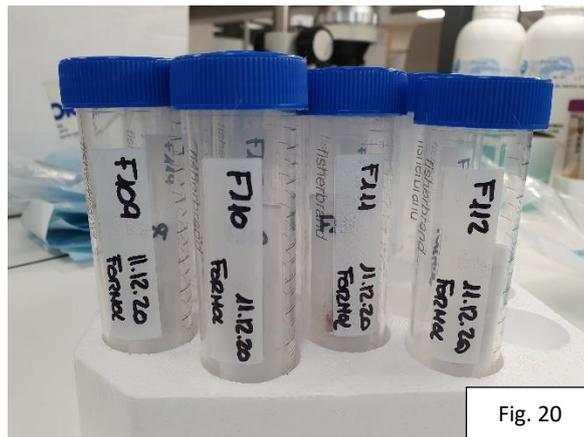


Fig. 20

Figura 19. Fémur extirpado sin retirar la aguja y colocado sobre depresor.

Figura 20. Tubos Falcon donde se conservan los fémures sumergidos en formalina al 10 %.

5.7 ESTUDIO RADIOLÓGICO

5.7.1 PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DE MICRO-TC, RECONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES

El estudio radiológico para valorar la consolidación de las fracturas se realizó mediante micro-TC, de acuerdo con los protocolos previamente publicados como el de Campbell (199). El modelo de escáner utilizado fue el SKYSCAN 1172 de la marca BRUKER® (Kontich, Bélgica) y un software de captación de datos SKYSCAN 1172 μ CT, también de BRUKER® (Kontich, Bélgica) (figura 21). El análisis de los fémures se llevó a cabo en el Laboratorio de la División de Ciencia e Ingeniería de los Materiales (LADICIM) de la Escuela Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos de Santander.

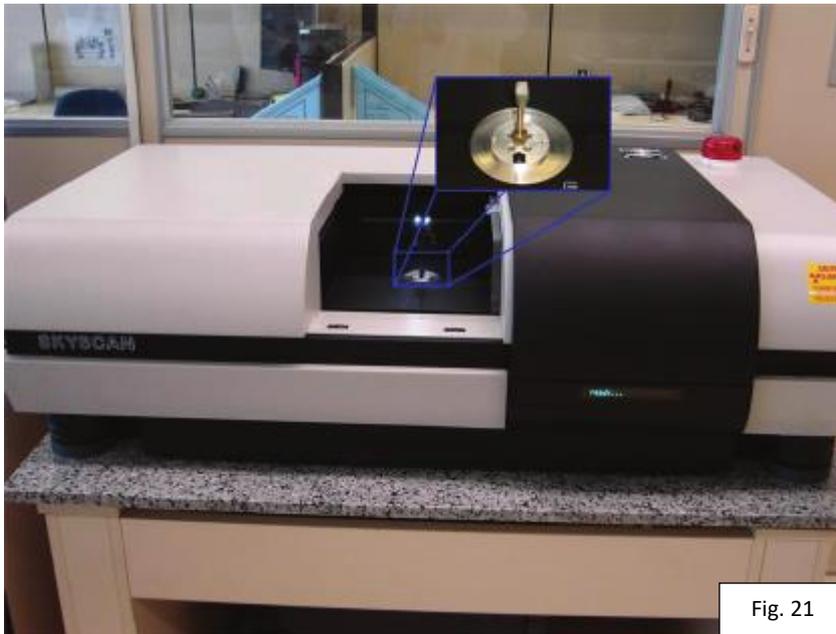


Fig. 21



Fig. 22

Figura 21. Equipo Micro-TC SKYSCAN 1172 de BRUKER®.

Figura 22. Ejemplo de radiografía obtenida durante la fase de escaneo.

El estudio mediante micro-TC consta de tres etapas: escaneo, reconstrucción y análisis.

1. Escaneo y adquisición de datos

El fémur del ratón se colocó en el soporte de micro-TC dentro de un tubo de plástico en posición vertical. De esta forma se expuso ante la fuente de rayos X obteniendo una radiografía. Posteriormente, la muestra se hizo girar sobre el eje vertical y se repitió el

proceso, obteniendo radiografías longitudinales de la muestra desde las diferentes posiciones. Para escanear tejido denso como el hueso, la fuente de rayos X se fijó en un voltaje de 50 kV, con una intensidad de corriente de 100 μ A. En la figura 22 se puede ver un ejemplo de la imagen obtenida.

2. Reconstrucción

En esta fase del proceso se buscó transformar la información obtenida en el escaneo (radiografías longitudinales) en información sobre las secciones transversales de la muestra. Para esta tarea se utilizó el software comercial NRecon (ScancoMedical, Brüttisellen, Switzerland). Los cortes se realizaron cada 6 μ m, generando imágenes de los cortes transversales de las muestras de proximal a distal. De esta forma fue posible generar un modelo digital 3D, que posteriormente fue analizado.

3. Análisis

El análisis se dividió en dos fases, análisis cualitativo y cuantitativo, mediante los softwares CTAn[®] y CTVox[®], ambos de BRUKER[®] (Kontich, Bélgica).

CTAn[®] o CT-Analyzer: en este programa se cargó el conjunto de datos de las imágenes y se estableció un umbral conocido, de 60-254 unidades Hounsfield (UH), para delimitar la absorción de interés (hueso). Se estableció este umbral porque la aguja intramedular absorbe el punto máximo de esta escala que son 255 UH. En cada corte transversal se delimitó la región de interés interpolando de imagen a imagen, la región de interés incluyó el hueso primario más el callo formado. Después de esto, se pasó a realizar un análisis 2D del escaneo y obtuvimos diferentes parámetros. En nuestro caso, el parámetro elegido fue el cociente BV/TV o Bone Volume / Tissue Volume, es decir, el volumen óseo sobre el volumen de tejido total. Este parámetro es proporcional a la masa ósea, como pudimos comprobar en el laboratorio con una muestra patrón.

CTVox[®]: con este programa el software realizó una reconstrucción 3D del escaneo, de tal forma que se obtuvieron cortes en los tres planos del espacio (axial, coronal y sagital). Nosotros seleccionamos dos cortes, uno en el plano coronal y otro en el sagital, para valorar las cuatro corticales alrededor del callo de fractura. En el corte coronal se tomó como referencia la cabeza femoral para la orientación medio-lateral y se seleccionó el corte centrado sobre la aguja en su eje longitudinal. En este corte valoramos la consolidación de las corticales medial y lateral. Para el corte sagital, tomamos el corte perpendicular al anterior, igualmente centrado sobre la aguja, donde valoramos la cortical anterior y posterior.

5.7.2 VALORACIÓN DEL ESTUDIO RADIOLÓGICO

En el estudio 2D utilizando el programa **CTAn**[®], el parámetro estudiado fue el cociente BV/TV. Dentro de este parámetro diferenciamos dos valores: BV/TV del callo fracturario más la cortical primaria del hueso, es lo que denominamos **BV/TV callo + cortical**; y BV/TV únicamente del callo fracturario, lo que denominamos **BV/TV callo**. De esta forma se obtuvieron sendos valores numéricos que se analizaron posteriormente.

En el estudio 3D utilizando el programa **CTVox**[®], se valoró la consolidación de las cuatro corticales (anterior, posterior, medial y lateral) mediante dos parámetros, la consolidación y la corticalización del callo de fractura. Para el estudio de la **consolidación** se propuso un sistema de graduación basado en el número de corticales en los que existió consolidación, es decir, se formó un puente óseo entre ambos fragmentos. Esta clasificación se detalla en la tabla 1 A, de tal forma que se otorgaron de 0 a 4 puntos en función del número de corticales consolidadas. Esta valoración de la consolidación es un método que ha demostrado ser reproducible (21) y que se utiliza habitualmente en la clínica. Para valorar la **corticalización** del callo se puntuaron, dentro las corticales consolidadas, aquellas que también se corticalizaron. Es decir, el callo de fractura se remodeló y la radiodensidad fue equivalente a la densidad de la cortical original. También se otorgó un punto por cada cortical consolidada con corticalización, de tal manera que la puntuación máxima no puede ser mayor que el número de corticales consolidadas (tabla 1 B).

CONSOLIDACIÓN DEL CALLO		CORTICALIZACIÓN DEL CALLO	
Nº de corticales consolidadas (anterior, posterior, medial, lateral)	Tabla 1 A Puntuación	Nº de corticales consolidadas con corticalización	Tabla 1 B Puntuación
0 corticales	0 puntos	0 corticales	0 puntos
1 cortical	1 punto	1 cortical	1 punto
2 corticales	2 puntos	2 corticales	2 puntos
3 corticales	3 puntos	3 corticales	3 puntos
4 corticales	4 puntos	4 corticales	4 puntos

Tabla 1 A-B. (A) Escalas de graduación para la valoración radiológica de la consolidación y (B) corticalización del callo de fractura.

De esta forma se otorgó, a cada animal de experimentación, una puntuación formada por dos números. El primero corresponde al número de corticales consolidadas y el segundo, al número de corticales consolidadas con corticalización.

Cada fractura fue valorada de manera ciega por cuatro observadores independientes, sin conocer el tratamiento al que se sometieron los animales de experimentación. En caso de

discrepancia en la valoración, los cortes fueron reevaluados y la puntuación final fue alcanzada por consenso.

En la figura 3 se ilustra, a modo de ejemplo, una de las fracturas con la puntuación otorgada para los parámetros consolidación y corticalización.

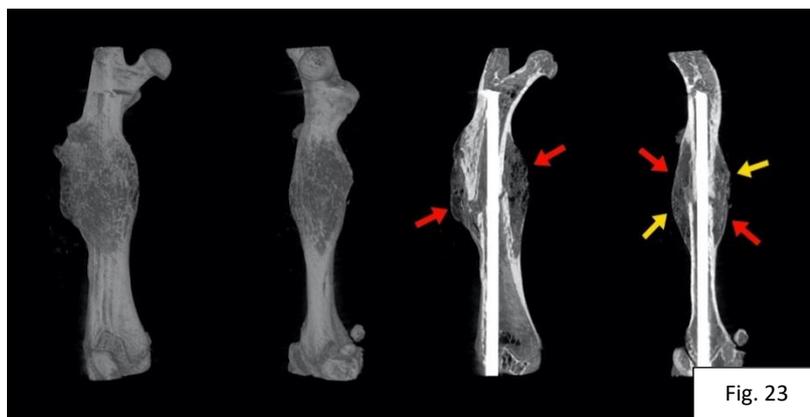


Figura 23. Imágenes de micro-TC que corresponden a la fractura 106. Las dos primeras son reconstrucciones tridimensionales para ver de forma global el callo, las dos últimas corresponden a los cortes coronal y sagital donde se valoran las cuatro corticales. La puntuación asignada fue de 4 corticales consolidadas (flechas rojas), con 2 de ellas corticalizadas (flechas amarillas). En este caso, la puntuación global de consolidación-corticalización fue 4-2.

5.8 ESTUDIO HISTOLÓGICO

5.8.1 TÉCNICA HISTOLÓGICA

Para realizar el análisis histológico, los fémures extraídos de los ratones se sometieron a un proceso de **fijación y descalcificación**. En primer lugar, se introdujo la muestra apenas extraída, en un fijador compuesto por formalina al 10 % (VWR Quemicals, Radnor, PA, USA). Posteriormente, el fémur se pasó a una solución descalcificante para médula ósea (Casa Álvarez. Ref. 10-6331, Madrid, España) que contenía ácido clorhídrico (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca). La descalcificación del hueso es imprescindible para poder analizarlo histológicamente de forma correcta y las muestras se mantuvieron sumergidas el tiempo suficiente para que desapareciera la mayor parte del calcio, aproximadamente 24 h.

Después de este proceso, se extrajeron las agujas intramedulares para proceder a la **inclusión y formación de bloques de parafina**. Las piezas sumergidas en formalina (VWR Quemicals, Radnor, PA, USA) se sometieron a concentraciones crecientes de etanol (de 70º a 96º) (Montplet S.A.U., Barcelona, España) para deshidratar las piezas, posteriormente, se clarificaron en xileno (VWR Quemicals, Radnor, PA, USA). Para finalizar, se realizaron cuatro incubaciones sucesivas de los fémures en parafina líquida (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). Todo esto se realizó de forma automatizada con el procesador de tejidos. Tras la infiltración completa de la muestra, se vertió la parafina líquida en moldes o *cassettes* y se introdujo la muestra según la orientación deseada de corte. Los bloques de parafina se dejaron solidificar sobre una placa fría.

Una vez obtenidos los bloques (figura 24), se procedió a realizar los **cortes con un microtomo de rotación** (HistoCore Multicut R de LEICA®) a 3 µm de grosor (figura 25). Para que el tejido quedara perfectamente extendido, los cortes se depositaron en un baño con agua destilada a una temperatura entre 35º y 40º C. Posteriormente, los cortes se recogieron en un portaobjetos y se procedió a la tinción con hematoxilina-eosina.



Figura 24. Fémur incluido en bloque de parafina.

Figura 25. Microtomo HistoCore Multicut R de LEICA® realizando los cortes del bloque de parafina.

Para realizar la **tinción de hematoxilina-eosina** se tiene que realizar un tratamiento previo de desparafinado e hidratación. Se empezó por sumergir los cortes en xileno (VWR Quemicals, Radnor, PA, USA) para eliminar los restos de parafina y después rehidratarlos en una serie de alcoholes en concentración decreciente (100º, 96º y 70º), posteriormente, se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de alcohol. Se procedió a la tinción con hematoxilina (colorante básico) (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca), para lo que se sumergieron las muestras en el colorante durante 10 minutos. Después se lavaron para eliminar el exceso de coloración, se pasaron rápidamente por alcohol clorhídrico (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca), que se neutralizó en bicarbonato sódico y se volvieron a lavar con agua. Finalmente, se sumergieron 30 segundos en eosina (colorante ácido) (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca). Para terminar el proceso, se lavaron en agua, se volvieron a pasar por una serie de alcoholes en concentración creciente (70, 96º y 100º) para deshidratar y se terminó de nuevo en xileno. Esto se realizó de forma automatizada con la máquina LEICA® Autostainer XL.

Una vez teñidas las muestras, se protegieron con un cubreobjetos para su posterior observación con el microscopio óptico. Se tomaron varios cortes de cada muestra, eligiendo siempre los más centrales de la pieza, de forma que permitieran la valoración del foco de fractura y dos corticales. En la figura 26 se pueden ver unos ejemplos de las preparaciones histológicas.

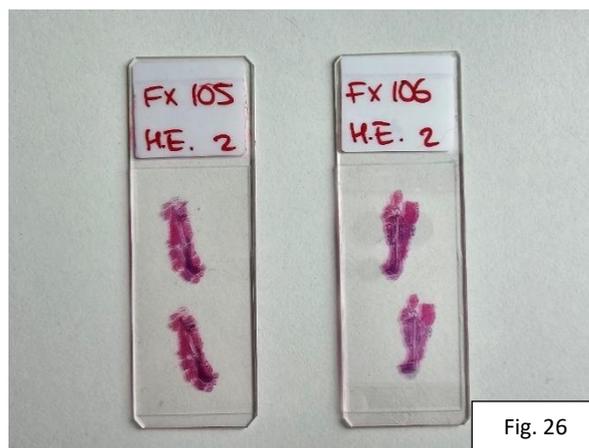


Figura 26. Preparaciones histológicas en los portaobjetos una vez teñidas con hematoxilina-eosina.

5.8.2 VALORACIÓN DEL ESTUDIO HISTOLÓGICO

Los cortes histológicos fueron evaluados mediante microscopio óptico por un anatomopatólogo sin conocer el tratamiento realizado al ratón NOD/SCID, es decir, siguiendo un protocolo de enmascaramiento doble ciego.

El callo de fractura se evaluó mediante dos escalas numéricas semicuantitativas. La clasificación descrita por Allen en 1980, que otorga una puntuación del 1 al 6 (47) (tabla 2 A), y la clasificación de Huo descrita en 1991, con una puntuación del 1 al 10 (48) (tabla 2 B). Además, se empleó la clasificación de puente óseo, considerado la presencia o ausencia de éste en las dos corticales óseas de la preparación histológica, siendo las puntuaciones del 0 al 2 (tabla 2 C).

CLASIFICACIÓN DE ALLEN		Tabla 2 A
Grado de Consolidación	Características Histológicas	
Grado 1	Pseudoartrosis: tejido fibroso entre los fragmentos	
Grado 2	Unión incompleta: tejido fibroso y cartilaginoso	
Grado 3	Unión completa con tejido cartilaginoso	
Grado 4	Unión ósea incompleta con áreas de osificación: cantidad equivalente de cartílago y hueso trabecular	
Grado 5	Unión ósea incompleta con predominancia de células óseas	
Grado 6	Consolidación ósea completa: hueso entre ambos fragmentos óseos	

CLASIFICACIÓN DE HUO		Tabla 2 B
Grado de Consolidación	Características Histológicas	
Grado 1	Tejido fibroso	
Grado 2	Tejido predominantemente fibroso con pequeña cantidad de cartílago	
Grado 3	Igual mezcla de tejido fibroso y cartilaginoso	
Grado 4	Predominantemente cartílago con pequeña cantidad de tejido fibroso	
Grado 5	Cartílago	
Grado 6	Predominantemente cartílago con pequeña cantidad de hueso inmaduro	
Grado 7	Igual mezcla de cartílago y hueso inmaduro	
Grado 8	Predominantemente hueso inmaduro con pequeña cantidad de cartílago	
Grado 9	Consolidación de la fractura con hueso inmaduro	
Grado 10	Consolidación de la fractura con hueso maduro	

CLASIFICACIÓN DE PUENTE ÓSEO		Tabla 2 C
Grado de Consolidación	Características Histológicas	
Grado 0	No puentes óseos	
Grado 1	Puente óseo presente en una cortical	
Grado 2	Puentes óseos completos en las dos corticales	

Tabla 2 A-C. Clasificaciones histológicas de (A) Allen, (B) Huo y (C) puente óseo.

En la figura 27 se ilustra, a modo de ejemplo, una de las fracturas con la puntuación otorgada en las tres clasificaciones histológicas.

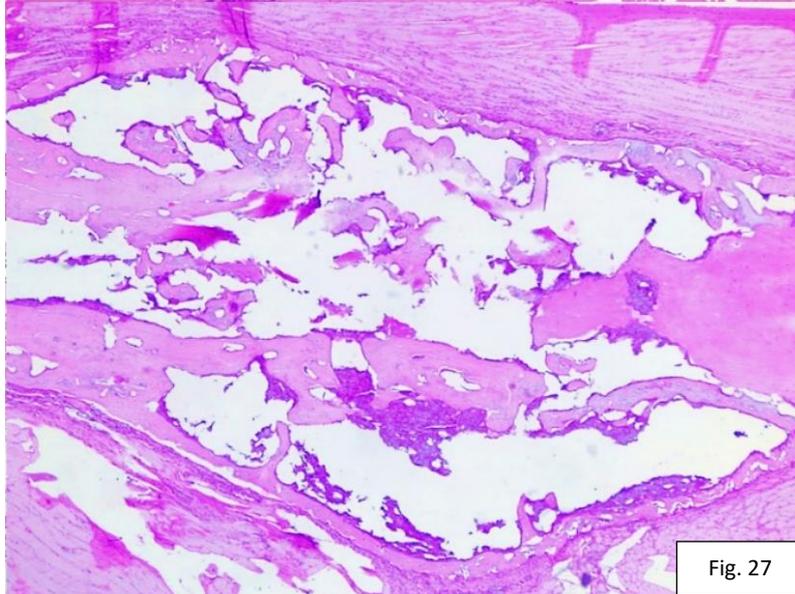


Figura 27. Preparación histológica que corresponde a la fractura 15, en la que se aprecia consolidación completa con hueso maduro y puentes óseos bilaterales. La puntuación asignada en las diferentes escalas fue: Allen 6, Huo 10, puente óseo 2.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos recogidos se utilizaron los programas Microsoft Excel® versión 16.0 e IBM SPSS Statistics® versión 29.0.

Se obtuvieron la media \pm desviación estándar y la mediana con rango intercuartílico de las variables obtenidas de las valoraciones radiológicas (BV/TV callo + cortical, BV/TV callo, consolidación, corticalización) e histológicas (Allen, Huo, puente óseo); tanto en los grupos de administración sistémica como en la local, para los tres subgrupos de tratamiento (control, fractura osteoporótica, artrosis).

Estas variables, al no conocer si la distribución era normal, se sometieron al análisis con los test no paramétricos de U de Mann-Whitney cuando las comparaciones fueron entre dos muestras o Kruskal-Wallis cuando se consideraron tres muestras. Es decir, se empleó U de Mann-Whitney para comparar los grupos: control / fractura osteoporótica, control / artrosis, fractura osteoporótica / artrosis; dentro de cada grupo de administración (sistémica y local). También para comparar las diferencias entre la vía de administración, es decir: control sistémica / control local, fractura osteoporótica sistémica / fractura osteoporótica local, artrosis sistémica / artrosis local. En cambio, se utilizó Kruskal-Wallis para comparar los tres grupos entre sí: control / fractura osteoporótica / artrosis, dentro de cada grupo de administración (sistémica y local). El nivel de significación estadística fue de 0.05.

Para valorar la correlación entre las variables radiológicas e histológicas estudiadas, se empleó el coeficiente de correlación de Spearman. El nivel de significación estadística fue del 0.05 y 0.01.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

En este apartado se valora la influencia que tuvo el tratamiento con MSCs en la consolidación ósea del ratón NOD/SCID. Para ello se evaluó, en primer lugar, el modelo experimental utilizado. Una vez analizados los detalles técnicos y las complicaciones del modelo de fractura, se estudiaron los resultados del tratamiento con MSCs desde el punto de vista radiológico e histológico. Se realizaron las siguientes comparaciones:

- Se compararon los **grupos control** en los que no se administraron células con los que se realizó la **administración de MSCs**:
 - **Grupo A1** (grupo control de administración sistémica) se comparó **con Grupo A2** (grupo fractura osteoporótica de administración sistémica). Y **Grupo A1** (grupo control de administración sistémica) se comparó **con Grupo A3** (grupo artrosis de administración sistémica).
 - **Grupo B1** (grupo control de administración local) se comparó **con Grupo B2** (grupo fractura osteoporótica de administración local). Y **Grupo B1** (grupo control de administración local) se comparó **con Grupo B3** (grupo artrosis de administración local).
- Se compararon los resultados **en función del origen** de las MSCs, si fueron obtenidas de pacientes con fractura osteoporótica o artrosis:
 - **Grupo A2** (grupo fractura osteoporótica de administración sistémica) se comparó **con grupo A3** (grupo artrosis de administración sistémica).
 - **Grupo B2** (grupo fractura osteoporótica de administración local) se comparó con **grupo B3** (grupo artrosis de administración local).
- Finalmente, se compararon los resultados **en función de la vía de administración**:
 - **Grupo A2** (grupo fractura osteoporótica de administración sistémica) se comparó **con Grupo B2** (grupo fractura osteoporótica de administración local).
 - **Grupo A3** (grupo artrosis de administración sistémica) se comparó **con Grupo B3** (grupo artrosis de administración local).

6.1 EL MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA

En total se intervinieron 124 ratones NOD/SCID. Los primeros (n = 18), formaron parte del estudio piloto para diseñar el modelo de fractura. Tuvimos 19 fallecimientos, con un pico en los meses de mayo a julio de 2020, coincidiendo con la pandemia de COVID-19. Además, se desestimaron 19 casos por complicaciones técnicas de la cirugía o complicaciones en el postoperatorio. También vimos que con la fucosilación de las células no se obtenían mejores resultados de consolidación, por lo que el Grupo C (n = 9) no formó parte de la investigación. Finalmente, el número de ratones incluidos en nuestro estudio fue de 59.

6.1.1 ESTUDIO PILOTO PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA

En este grupo inicial de 18 ratones ensayamos la técnica quirúrgica para su perfeccionamiento y corregir errores técnicos. Pudimos comprobar que, tanto la vía de abordaje, la ejecución de la osteotomía y el material de osteosíntesis empleado, eran los apropiados para nuestro animal de experimentación.

Se eligió siempre la misma extremidad, fémur trasero derecho del ratón NOD/SCID. Mediante un abordaje lateral directo y disección roma, se consiguió una correcta exposición de la diáfisis femoral.

La osteotomía se realizó mediante corte con bisturí del número 15. Esta técnica es laboriosa y exigente, puesto que nuestro objetivo era la creación de una fractura de trazo transversal simple y reproducible. Esto no siempre fue sencillo, pues en ocasiones se produjeron fracturas conminutas o multifragmentarias, que además dificultaban la osteosíntesis con la aguja intramedular. Los ratones que presentaron esta complicación fueron excluidos del estudio.

El material de osteosíntesis empleado fue una aguja 27 G, encontramos que este era el diámetro apropiado para las dimensiones del canal femoral. Un problema de esta osteosíntesis es que, en ocasiones, el implante protruye por la rodilla, por lo que se debe realizar el corte de la aguja lo más proximal posible. Otro inconveniente es que, al ser un implante no bloqueado, puede existir malrotación de la extremidad, esto se controló clínicamente y no fue considerado una complicación. En otras ocasiones puede existir movilización de la aguja, cuando esto ocurre pueden darse dos supuestos: que deje de estabilizar el fragmento proximal y la aguja se movilice protruyendo por la rodilla, o que se produzca la pérdida completa de la aguja. Ambos supuestos se consideraron complicaciones mayores y los casos se excluyeron del estudio.

En cuanto a la técnica quirúrgica, se realizó alguna modificación sobre lo inicialmente planificado. En un principio, la inserción de la aguja se había previsto realizar de forma retrógrada pura desde la región intercondílea de la rodilla, pero tuvimos algún caso de fractura condílea. El abordaje retrógrado puro ya había sido utilizado previamente por nuestro equipo en ratas, utilizando un tornillo intramedular (179). Al tener el foco expuesto, nos pareció más sencilla la introducción de la aguja desde la propia fractura en sentido distal y después de forma retrógrada en el fragmento proximal. Esta modificación tiene el inconveniente de que la aguja no siempre sale centrada en la rodilla, pudiendo desviarse hacia uno de los cóndilos. Generalmente fueron desviaciones leves que no afectaron a la estabilidad de la fractura.

El tiempo transcurrido entre la intervención quirúrgica y el sacrificio de los animales sufrió modificaciones. Inicialmente, la ejecución de los animales estaba prevista a las 8 semanas, para ello se emplearon los primeros 12 ratones (F-1 a F-12). Posteriormente, se acortó el tiempo de estudio a 6 semanas en 4 ratones (F-1/6 sem a F-4/6 sem) y, finalmente, se decidió acortar a 4 semanas en 2 ratones (F-1/4 sem y F-2/4 sem). En total, conformaron los 18 ratones del grupo piloto. El acortamiento del tiempo de estudio fue debido a que, en el tiempo inicialmente previsto, se observaba consolidación casi completa de la fractura incluso en los animales control, lo que impedía valorar el posible efecto positivo de las MSCs.

Se pretendió que la técnica quirúrgica en los grupos de administración local de MSCs fuera lo más homogénea posible, por ello se aplicó un parche de Lyostypt® y se administró suero salino en todos los grupos. También en el grupo control, aunque no se administraran células.

Los animales del grupo piloto no se incluyeron en la investigación. De esta forma, la curva de aprendizaje se alcanzó de manera previa al estudio, evitando posibles sesgos. Además, todos los animales fueron intervenidos por el mismo equipo quirúrgico (doctoranda, directora y un colaborador).

6.1.2 ANÁLISIS DE LAS COMPLICACIONES

Se valoraron las complicaciones en ambos grupos de administración, grupo A (administración sistémica) y B (administración local). Se dividieron en complicaciones menores, mayores y mortalidad. Las complicaciones mayores y la mortalidad obligaron a la exclusión de los animales del estudio.

1. Complicaciones menores

- **Protrusión de la aguja por la rodilla, sin movilización del implante:**

Esto fue debido a corte insuficiente de la aguja a nivel de la rodilla.

(n = 5) **Grupo A:** F-15, F-19, F-26, F-52; **Grupo B:** F-98.

- **La aguja no salió centrada por la región intercondílea de la rodilla, sino por el cóndilo externo o interno:**

No afectó a la estabilidad de la fractura (n = 10).

- La aguja salió por el cóndilo externo.
(n = 7) **Grupo A:** F-22, F-47, F-48; **Grupo B:** F-54, F-76, F-105, F-118.
- La aguja salió por el cóndilo interno.
(n = 3) **Grupo B:** F-84, F-103, F-117.

En la tabla 3 se detallan las complicaciones menores.

COMPLICACIONES MENORES			Tabla 3
Tipo de complicación	Grupo A (n = 29)	Grupo B (n = 30)	TOTAL (n = 59)
Protrusión de la aguja	F-15, F-19, F-26, F-52 n = 4 13.8 %	F-98 n = 1 3.3 %	n = 5 8.5 %
Aguja no centrada en la rodilla	Sale por cóndilo externo F-22, F-47, F-48 n = 3 10.3 %	Sale por cóndilo externo F-54, F-76, F-105, F-118 n = 4 13.3 %	n = 7 11.9 %
	Sale por cóndilo interno n = 0 0 %	Sale por cóndilo interno F-84, F-103, F-117 n = 3 10 %	
TOTAL	n = 7 24.1 %	n = 8 26.7 %	n = 15 25.4 %

Tabla 3. Relación de complicaciones menores.

El porcentaje global de complicaciones menores fue del 25.4 % (n = 15), del total de ratones incluidos en el estudio (n = 59). Estuvieron distribuidos de forma similar en ambos grupos, 24.1 % (n = 7) de los ratones del grupo A y 26.7 % (n = 8) del grupo B. De ellos, en el 8.5 % (n = 5) la aguja protruyó en la rodilla y en el 16.9 % (n = 10) la aguja no salió centrada en la región intercondílea.

En la figura 28 se documentan con imágenes algunas de las complicaciones menores.

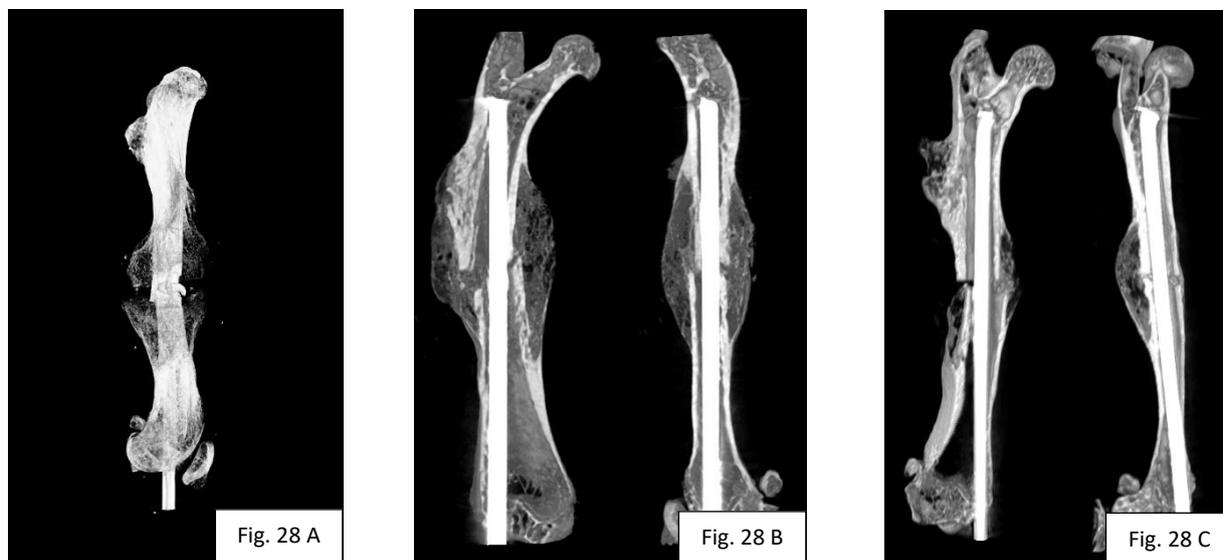


Figura 28 A-C. Diferentes ejemplos de complicaciones menores. **(A)** Protrusión de la aguja por la rodilla (F-19). **(B)** La aguja salió por el cóndilo externo (F-105). **(C)** La aguja salió por el cóndilo interno (F-77). Como se puede apreciar, ninguna de estas complicaciones inestabilizó el foco de fractura.

2. Complicaciones mayores

- Movilización de la aguja con inestabilidad de la fractura:

La aguja dejó de estabilizar el fragmento proximal y, secundariamente, protruyó por la rodilla.

(n = 5) **Grupo A:** F-39; **Grupo B:** F-81, F-85, F-95, F-114.

- Pérdida completa de la aguja:

(n = 6) **Grupo B:** F-91, F-92, F-93, F-96, F-110, F-111.

- Conminución del foco de fractura:

(n = 2) **Grupo A:** F-16, F-37.

- Falsa vía que condicionó reducción insuficiente y falta de estabilidad de la fractura:

(n = 1) **Grupo B:** F-102.

- Osteomielitis aguda:

(n = 1) **Grupo A:** F-37.

Hay que puntualizar que el ejemplar F-37 presentó dos complicaciones mayores, conminución del foco de fractura y osteomielitis aguda. Esta última se objetivó en las preparaciones histológicas.

Se detallan las complicaciones mayores en la tabla 4.

COMPLICACIONES MAYORES			Tabla 4
Tipo de complicación	Grupo A (n = 40)	Grupo B (n = 49)	TOTAL (n = 89)
Movilización de la aguja	F-39 n = 1 2.5 %	F-81, F-85, F-95, F-114 n = 4 8.2 %	n = 5 5.6 %
Pérdida de la aguja	n = 0 0 %	F-91, F-92, F-93, F-96, F-110, F-111 n = 6 12.2 %	n = 6 6.7 %
Conminución	F-16, F-37 n = 2 5 %	n = 0 0 %	n = 2 2.2 %
Falsa vía	n = 0 0 %	F-102 n = 1 2 %	n = 1 1.1 %
Osteomielitis aguda	F-37 n = 1 2.5 %	n = 0 0 %	n = 1 1.1 %
TOTAL	n = 4 10 %	n = 11 22.5 %	n = 15 16.9 %

Tabla 4. Relación de complicaciones mayores.

El porcentaje global de complicaciones mayores fue del 16.9 % (n = 15), del total de ratones operados (n = 89). Constituyeron el 10 % (n = 4) del grupo A y el 22.5 % (n = 11) del grupo B. Los porcentajes de las complicaciones fueron: movilización de la aguja 5.6 % (n = 5), pérdida de la aguja 6.7 % (n = 6), conminución 2.2 % (n = 2), falsa vía 1.1 % (n = 1) y osteomielitis aguda 1.1 % (n = 1).

En la figura 29 se documentan con imágenes algunas de las complicaciones mayores.

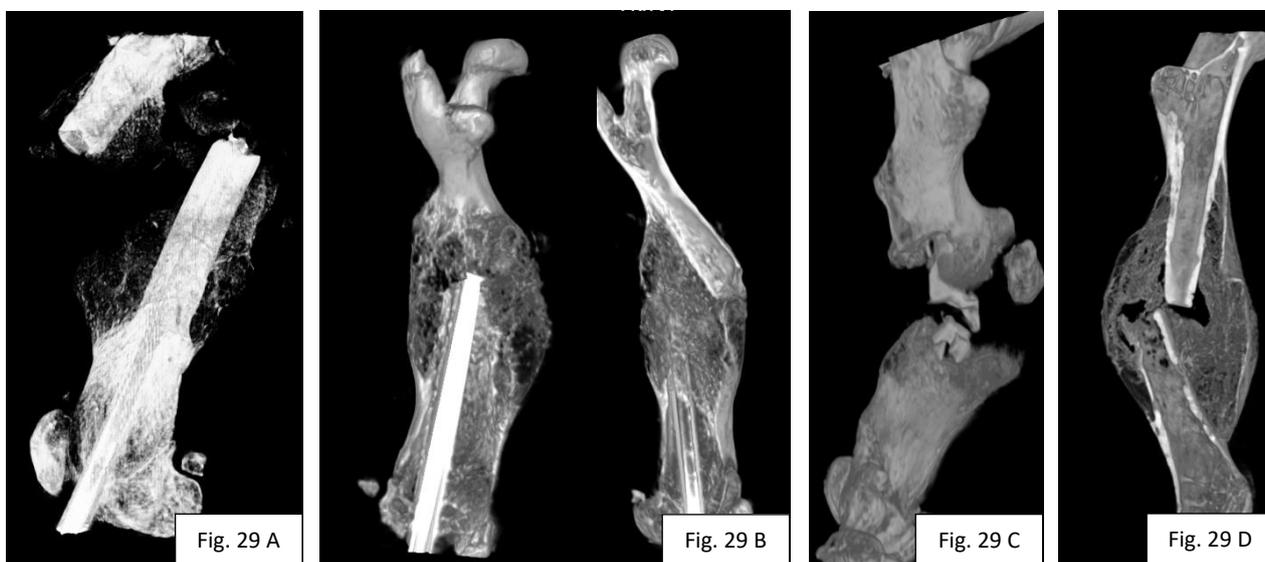


Figura 29 A-H. Diferentes ejemplos de complicaciones mayores que obligaron a la exclusión de los ejemplares del estudio. **(A)** Movilización de la aguja con inestabilidad de la fractura y ausencia de consolidación (F-39). **(B)** No siempre la movilización de la aguja e inestabilidad de la fractura conlleva la falta de consolidación, como se aprecia en F-81. **(C)** Pérdida completa de la aguja y ausencia de consolidación de la fractura (F-93). **(D)** La pérdida de la aguja no siempre asocia la falta de consolidación, como ocurre en F-111.

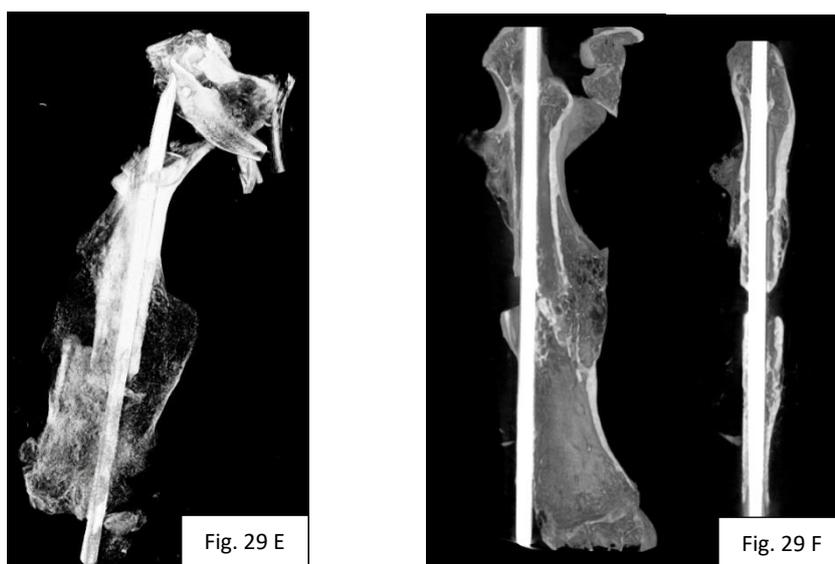


Figura 29 A-H. Diferentes ejemplos de complicaciones mayores que obligaron a la exclusión de los ejemplares del estudio. **(E)** Ejemplo de fractura conminuta (F-16). **(F)** Falsa vía del implante en el fragmento distal (F-102).

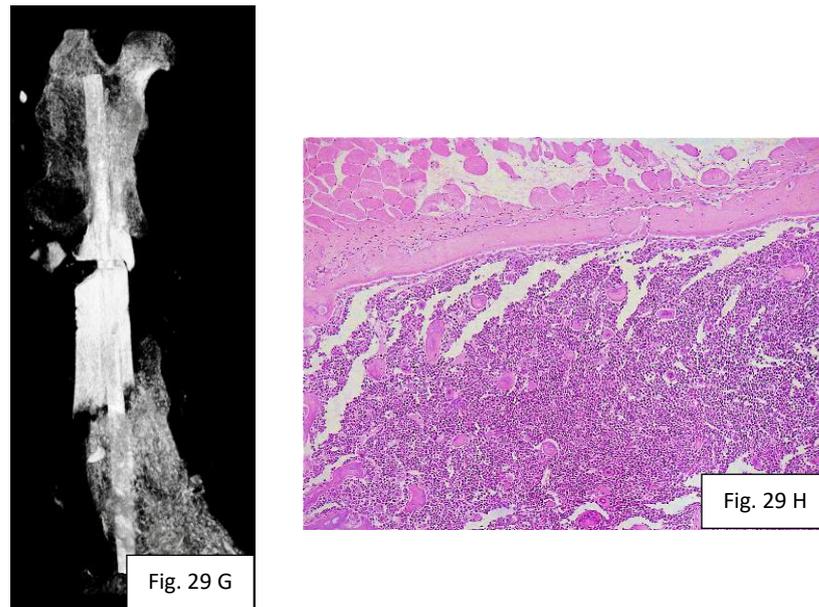


Figura 29 A-H. Diferentes ejemplos de complicaciones mayores que obligaron a la exclusión de los ejemplares del estudio. **(G)** Fractura bifocal. **(H)** Este mismo ratón presentó una osteomielitis aguda objetivada en el estudio histológico (tinción H.E., 10x) donde se aprecian abundantes infiltrados PMN. Ambas imágenes corresponden a F-37.

3. Mortalidad

(n = 16) **Grupo A:** F-17, F-18, F-21, F-24, F-27, F-31, F-32, F-45; **Grupo B:** F-55, F-78, F-88, F-89, F-101, F-104, F-108, F-121.

La mayor parte de casos fallecieron por complicaciones inmediatas a la cirugía: 1 caso falleció durante la cirugía debido al sangrado; 9 casos, al día siguiente de la cirugía. El resto fallecieron en los días posteriores (6 casos). Presentaron una distribución similar en ambos grupos de administración.

Se detalla la mortalidad en la tabla 5.

MORTALIDAD			Tabla 5
	Grupo A (n = 40)	Grupo B (n = 49)	TOTAL (n = 89)
Durante la cirugía	n = 0 0 %	F-88 n = 1 2 %	n = 1 1.1 %
Día siguiente de la cirugía	F-17, F-18, F-21, F-24, F45 n = 5 12.5 %	F-89, F-101, F-104, F-121 n = 4 8.2 %	n = 9 10.1 %
Días posteriores	F-27, F-31, F-32 n = 3 7.5 %	F-55, F-78, F-108 n = 3 6.1 %	n = 6 6.7 %
TOTAL	n = 8 20 %	n = 8 16.3 %	n = 16 18 %

Tabla 5. Relación de casos de mortalidad.

El porcentaje global de mortalidad fue del 18 % (n = 16), del total de ratones operados (n = 89). Constituyeron el 20 % (n = 8) del grupo A y el 16.3 % (n = 8) del grupo B. La mayor parte de los ratones fallecieron en relación con el procedimiento quirúrgico, bien durante, 1.1 % (n = 1), o al día siguiente de la cirugía, 10.1 % (n = 9). El resto fallecieron en los días posteriores, 6.7 % (n = 6).

4. Casos excluidos del estudio

Finalmente, en la tabla 6 se reflejan los ratones NOD/SCID que fueron excluidos del estudio. Éstos incluyen las complicaciones mayores y la mortalidad.

CASOS EXCLUÍDOS			Tabla 6
	Grupo A (n = 40)	Grupo B (n = 49)	TOTAL (n = 89)
Complicaciones mayores	n = 3 7.5 %	n = 11 22.4 %	n = 14 15.7 %
Mortalidad	n = 8 20 %	n = 8 16.3 %	n = 16 18 %
TOTAL	n = 11 27.5 %	n = 19 38.8 %	n = 30 33.7 %

Tabla 6. Total de casos excluidos debidos a complicaciones mayores y a mortalidad.

El porcentaje de casos excluidos fue del 33.7 % (n = 30), del total de ratones operados (n = 89). Constituyeron el 27.5 % (n = 11) del grupo A y el 18.8 % (n = 19) del grupo B. Fueron excluidos el 15.7 % (n = 14) debido a complicaciones mayores y el 18 % (n = 16) por mortalidad.

Exceptuando los animales retirados por complicaciones mayores, el resto tuvieron buena salud durante el seguimiento, siendo capaces de deambular por la jaula a las pocas horas de la intervención quirúrgica. Finalmente, los animales incluidos en el estudio fueron 59. Todos los animales no considerados óptimos fueron sustituidos por otros de características similares, de tal forma que el número previsto de animales incluidos en el estudio no se vio alterado.

6.1.3 CONCLUSIONES DEL MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA

- Establecer un modelo de fractura en el ratón NOD/SCID es un proceso complejo y no exento de complicaciones.
- Las dificultades técnicas fueron debidas a su pequeño tamaño, pero estábamos condicionados a la elección de la cepa NOD/SCID para poder albergar MSCs humanas sin experimentar rechazo inmunológico.
- Se registraron un 25.4 % (n = 15) de complicaciones menores, en relación con la técnica de colocación del implante. En ningún caso afectaron a la estabilidad de la fractura.
- Tuvimos un número elevado de complicaciones mayores y mortalidad, que obligaron a la exclusión de los animales del estudio. Esto no afectó al número previsto de animales, ya que fueron sustituidos por otros de características similares.
- Se logró establecer un modelo experimental de fractura femoral en el ratón NOD/SCID en el que la elección de la vía de abordaje, la ejecución de la osteotomía en el fémur mediante bisturí del número 15 y la osteosíntesis intramedular con aguja 27 G, fueron apropiados para la valoración del tratamiento con MSCs humanas.

6.2 RESULTADOS DEL GRUPO C O GRUPO DE ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE MSCs FUCOSILADAS

Se emplearon los ratones F-56 a F-72 para experimentar si con la fucosilación de las MSCs se objetivaba mejoría en la consolidación de las fracturas. Este grupo experimental se denominó **Grupo C** (n = 17). De este grupo, 3 ratones tuvieron que ser excluidos por fallecimiento, en 7 ratones se inyectaron MSCs sin fucosilación (**Grupo C1 o Grupo control**) y en otros 7 se inyectaron MSCs con fucosilación (**Grupo C2 o Grupo de MSCs fucosiladas**).

Se desestimaron, por pérdida de la aguja o conminución del foco, 3 casos del Grupo C1 (F-61, F-67, F-72) y 2 casos del Grupo C2 (F-62, F-63). Finalmente, el Grupo C1 estuvo formado por 4 ratones y el Grupo C2, por 5 ratones.

Se estudió la presencia de ADN humano en pulmón, hígado y hueso. De esta forma se quiso valorar la existencia de las MSCs humanas en el ratón NOD/SCID y su migración al tejido diana. Estos experimentos se realizaron mediante la detección de secuencias Alu, siguiendo el método descrito por Funakoshi (200). Para ello se emplearon 2 ratones del grupo C1 y 3 ratones del grupo C2, la detección se realizó a las 24 horas o a los 7 días. Posteriormente, para valorar la consolidación, se emplearon 2 ratones del grupo C1 (F-68, F-70) y 2 ratones del grupo C2 (F-69, F-71). Se inyectaron por vía sistémica MSCs de pacientes con fractura osteoporótica o coxartrosis.

La distribución de casos se resume en la tabla 7.

GRUPO C		Tabla 7	
Mortalidad (n = 3)			
Grupo C1 (n = 7) MSCs control	Desestimados (n = 3) F-61, F-67, F-72		
	Válidos (n = 4)	Detección ADN (n = 2)	24 h. F-56, F-59
		Consolidación (n = 2) F-68, F-70	
Grupo C2 (n = 7) MSCs fucosiladas	Desestimados (n = 2) F-62, F-63		
	Válidos (n = 5)	Detección ADN (n = 3)	24 h. F-58, F-60
		Consolidación (n = 2) F-69, F-71	

Tabla 7. Distribución de casos del Grupo C o Grupo de administración sistémica de MSCs fucosiladas.

En la tabla 8 se reflejan el tipo de células infundidas y las puntuaciones obtenidas en los parámetros radiológicos. En este grupo de ratones no se realizó estudio histológico.

GRUPO C				Tabla 8	
	MSCs	BV/TV C+C	BV/TV C	Consolidación	Corticalización
F-68	Artrosis	40.33	19.21	3	3
F-69	Artrosis fucosiladas	36.15	12.85	4	3
F-70	Fractura osteopor.	27.19	9.65	4	2
F-71	Fr. osteopor. fucosiladas	33.25	15.37	4	4

Tabla 8. Tipo de células infundidas en los ratones del Grupo C y puntuaciones de los parámetros radiológicos.

El análisis del ADN humano mostró su detección en los pulmones, al día siguiente y a los 7 días, después de las infusiones celulares en los ratones. Sin embargo, se detectó de manera inconsistente en el hígado y el hueso, lo que indica que las células inyectadas por vía intravenosa se quedaban atrapadas en el filtro pulmonar, como ya se había constatado previamente en la bibliografía (201-203). Con la fucosilación de las células no se observó mayor presencia de ADN humano en el hueso, por lo que, a pesar de la modificación celular no se logró aumentar la afinidad por el tejido diana. Tampoco los resultados radiológicos (parámetros BV/TV y consolidación-corticalización) entre el grupo control y el grupo de células fucosiladas reflejaron cambios significativos. Aunque el número de casos fue pequeño, decidimos no continuar la investigación por esta línea, por lo que el Grupo C fue excluido del estudio.

6.3 RESULTADOS RADIOLÓGICOS

6.3.1 RESULTADOS DEL PARÁMETRO BV/TV

6.3.1.1 Puntuaciones del parámetro BV/TV

	SISTÉMICO (A)			LOCAL (B)			Tabla 9
		BV/TV callo+cortical	BV/TV callo		BV/TV callo+cortical	BV/TV callo	
Control (1)	F-13	41.86	16.32	F-76	66.61	38.77	
	F-14	37.58	16.32	F-77	65.01	18.42	
	F-30	29.60	16.18	F-79	60.50	29.30	
	F-34	46.24	19.92	F-82	64.04	22.12	
	F-35	33.79	13.81	F-87	66.82	26.32	
	F-40	39.68	22.80	F-98	51.46	20.87	
	F-41	39.73	19.68	F-112	57.58	31.95	
	F-42	42.22	24.41	F-116	62.83	30.39	
	F-46	34.77	17.35	F-117	67.53	32.00	
	F-48	32.24	17.44	F-118	62.77	27.04	
	F-49	45.26	3.60	F-120	61.10	14.27	
	F-51	32.48	16.48				
	F-52	34.26	13.92				
FO (2)	F-15	42.39	14.78	F-83	62.68	19.99	
	F-23	37.29	14.28	F-86	68.32	23.21	
	F-25	40.91	20.36	F-94	46.89	20.69	
	F-26	42.46	17.68	F-105	61.17	16.44	
	F-29	42.24	21.68	F-106	61.79	30.62	
	F-36	43.24	14.67	F-107	65.14	21.45	
	F-43	31.18	17.75	F-113	61.72	29.76	
	F-50	38.37	16.56	F-115	67.55	25.34	
				F-119	59.90	25.64	
Artrosis (3)	F-19	36.21	16.68	F-54	46.00	22.02	
	F-20	40.39	12.61	F-73	70.76	27.03	
	F-22	34.25	15.68	F-80	75.37	10.59	
	F-28	43.42	20.64	F-84	66.62	42.84	
	F-33	38.86	18.37	F-90	63.37	25.80	
	F-38	43.72	21.70	F-97	56.89	15.49	
	F-47	32.90	19.18	F-99	57.40	18.68	
	F-53	36.73	15.46	F-100	55.04	16.63	
				F-103	65.65	36.17	
				F-109	57.66	32.45	

Tabla 9. Puntuaciones individuales del parámetro BV/TV, en ambos grupos de administración (sistémica = A, local = B), en los tres subgrupos (control = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = 3).

En la tabla que acabamos de ver se reflejan las puntuaciones obtenidas de cada fractura para los parámetros BV/TV callo + cortical y BV/TV callo (tabla 9).

6.3.1.2 Administración sistémica de MSCs: comparación entre subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica) y 3 (artrosis)

A continuación, se muestran los análisis de los parámetros BV/TV callo + cortical y BV/TV callo, para cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3) en el grupo de administración sistémica (grupo A) (tabla 10). Hemos de recordar que el subgrupo 1 (control) corresponde a los ratones que recibieron inyección de suero sin células; el subgrupo 2 (fractura osteoporótica), a los ratones que recibieron inyección de MSCs cultivadas de pacientes con fractura osteoporótica; y subgrupo 3 (artrosis), a los ratones que recibieron inyección de MSCs cultivadas de pacientes con artrosis.

SISTÉMICO (A)				Tabla 10
	BV/TV callo + cortical		BV/TV callo	
	Media \pm SD	Mediana (IQR)	Media \pm SD	Mediana (IQR)
Control (1)	37.67 \pm 5.28	37.58 (33.79-41.86)	16.79 \pm 5.04	16.48 (16.18-19.68)
Fractura osteoporótica (2)	39.76 \pm 4.06	41.56 (38.10-42.41)	17.22 \pm 2.72	17.12 (14.75-18.40)
Artrosis (3)	38.31 \pm 4.01	37.80 (35.72-41.15)	17.54 \pm 3.00	17.53 (15.63-19.55)

Tabla 10. Datos correspondientes a BV/TV callo + cortical y BV/TV callo (media \pm desviación estándar y mediana con rango intercuartílico) en el grupo de administración sistémica.

Se analizan estos resultados mediante comparación entre los diferentes subgrupos (control, fractura osteoporótica y artrosis). Cuando comparamos las medias entre los tres subgrupos, se emplea el test de Kruskal-Wallis; cuando comparamos dos subgrupos entre sí, se emplea U de Mann-Whitney. Como apreciamos en la tabla 11, no encontramos significación estadística en ninguna de las comparaciones ($p > 0.05$).

SISTÉMICO (A)		Tabla 11	
	BV/TV callo + cortical	BV/TV callo	
Subgrupos C (1) - FO (2) - A (3)	0.553	0.940	
Subgrupos C (1) - FO (2)	0.277	0.772	
Subgrupos C (1) - A (3)	0.717	0.885	
Subgrupos FO (2) - A (3)	0.529	0.600	

Tabla 11. *p* valores de las comparaciones entre subgrupos (control = C = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = A = 3) en el grupo de administración sistémica, para el parámetro BV/TV.

En la administración sistémica, al analizar los parámetros BV/TV no encontramos diferencias significativas entre los subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica), 3 (artrosis).

6.3.1.3 Administración local de MSCs: comparación entre subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica) y 3 (artrosis)

A continuación, se muestran los análisis de los parámetros BV/TV callo + cortical y BV/TV callo, para cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3) en el grupo de administración local (grupo B) (tabla 12).

LOCAL (B)		Tabla 12		
	BV/TV callo + cortical		BV/TV callo	
	Media \pm SD	Mediana (IQR)	Media \pm SD	Mediana (IQR)
Control (1)	62.39 \pm 4.71	62.83 (60.80-65.81)	26.50 \pm 7.07	27.04 (21.50-31.17)
Fractura osteoporótica (2)	61.68 \pm 6.26	61.79 (61.17-65.14)	23.68 \pm 4.64	23.21 (20.69-25.64)
Artrosis (3)	61.48 \pm 8.56	60.52 (57.02-66.38)	24.77 \pm 10.11	23.91 (17.14-31.10)

Tabla 12. Datos correspondientes a BV/TV callo + cortical y BV/TV callo (media \pm desviación estándar y mediana con rango intercuartílico) en el grupo de administración local.

Se analizan estos resultados mediante comparación entre los diferentes subgrupos (control, fractura osteoporótica y artrosis). Como apreciamos en la tabla 13, no encontramos significación estadística en ninguna de las comparaciones ($p > 0.05$).

LOCAL (B)	Tabla 13	
	BV/TV callo + cortical	BV/TV callo
Subgrupos C (1) - FO (2) - A (3)	0.935	0.597
Subgrupos C (1) - FO (2)	0.909	0.271
Subgrupos C (1) - A (3)	0.725	0.573
Subgrupos FO (2) - A (3)	0.806	0.870

Tabla 13. p valores de las comparaciones entre subgrupos (control = C = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = A = 3) en el grupo de administración local, para el parámetro BV/TV.

En la administración local, al analizar los parámetros BV/TV no encontramos diferencias significativas entre los subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica), 3 (artrosis).

Los datos correspondientes a ambas administraciones se expresan gráficamente en la figura 30.

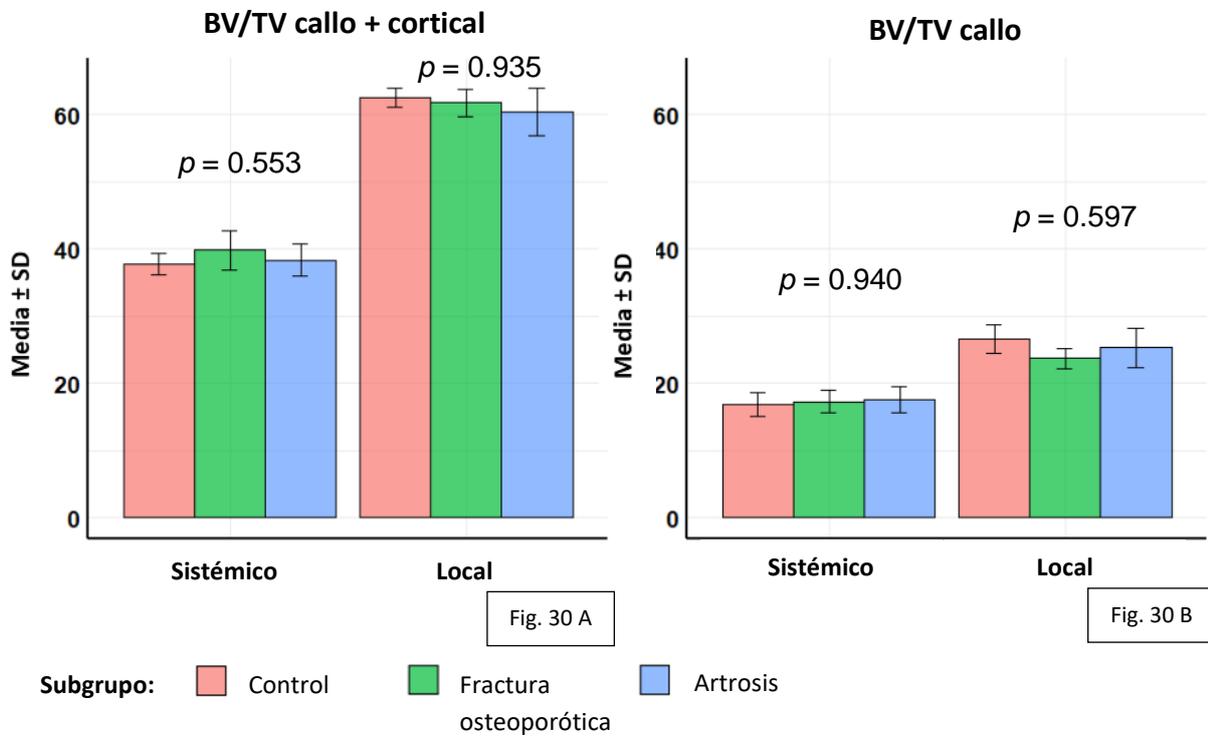


Figura 30 A-B. BV/TV de la región del callo de fractura. **(A)** BV/TV callo + cortical y **(B)** BV/TV callo, en ambas administraciones.

6.3.1.4 Comparación entre grupos A (administración sistémica de MSCs) y B (administración local de MSCs)

En la tabla 14 se muestran los resultados de la comparación entre la vía de administración (sistémica o local), para cada subgrupo (control, fractura osteoporótica, artrosis). Es decir, se compara el grupo A con el grupo B. Aquí apreciamos que **prácticamente todos los parámetros**, salvo BV/TV callo en los grupos de artrosis, **fueron superiores en el grupo de administración local** ($p < 0.05$).

	BV/TV callo + cortical	BV/TV callo
A1-B1	< 0.001	0.002
A2-B2	< 0.001	0.009
A3-B3	< 0.001	0.110

Tabla 14. p valores de las comparaciones entre los grupos A y B (administración sistémica y local), dentro de cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3).

6.3.1.5 Resumen de los resultados del parámetro BV/TV callo + cortical y BV/TV callo

- Cuando analizamos los parámetros **BV/TV no encontramos diferencias significativas entre los subgrupos** 1 (control o inyección de suero sin células), 2 (inyección de MSCs cultivadas de pacientes con fractura osteoporótica), 3 (inyección de MSCs cultivadas de pacientes con artrosis), **dentro de cada grupo de administración**, sistémica (grupo A) o local (grupo B).
- Sin embargo, **prácticamente todos los parámetros** (BV/TV callo + cortical y BV/TV callo) **fueron superiores en el grupo de administración local** ($p < 0.05$).

6.3.2 RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS CONSOLIDACIÓN Y CORTICALIZACIÓN

6.3.2.1 Puntuaciones de los parámetros consolidación y corticalización

	SISTÉMICO (A)		LOCAL (B)		Tabla 15	
		Consolidación	Corticalización	Consolidación	Corticalización	
Control (1)	F-13	3	1	F-76	2	0
	F-14	4	3	F-77	3	1
	F-30	1	0	F-79	4	2
	F-34	4	1	F-82	4	3
	F-35	4	3	F-87	4	3
	F-40	3	1	F-98	4	1
	F-41	3	2	F-112	3	2
	F-42	4	3	F-116	4	2
	F-46	4	3	F-117	1	1
	F-48	4	3	F-118	3	2
	F-49	4	4	F-120	4	2
	F-51	0	0			
	F-52	0	0			
FO (2)	F-15	4	3	F-83	3	2
	F-23	4	2	F-86	4	2
	F-25	4	2	F-94	3	1
	F-26	4	0	F-105	4	2
	F-29	0	0	F-106	4	2
	F-36	0	0	F-107	4	2
	F-43	3	1	F-113	4	1
	F-50	3	2	F-115	4	1
				F-119	3	1
Artrosis (3)	F-19	0	0	F-54	3	2
	F-20	3	1	F-73	3	1
	F-22	0	0	F-80	4	4
	F-28	2	0	F-84	3	1
	F-33	0	0	F-90	0	0
	F-38	3	1	F-97	2	1
	F-47	1	0	F-99	3	1
	F-53	0	0	F-100	4	2
				F-103	2	0
				F-109	4	0

Tabla 15. Puntuaciones individuales de los parámetros consolidación y corticalización, en ambos grupos de administración (sistémica = A, local = B), en los tres subgrupos (control = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = 3).

En la tabla que acabamos de ver se reflejan las puntuaciones obtenidas de cada fractura para los parámetros consolidación y corticalización (tabla 15).

6.3.2.2 Administración sistémica de MSCs: comparación entre subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica) y 3 (artrosis)

A continuación, se muestran los análisis de los parámetros consolidación y corticalización, para cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3) en el grupo de administración sistémica (grupo A) (tabla 16).

SISTÉMICO (A)		Tabla 16		
	Consolidación		Corticalización	
	Media \pm SD	Mediana (IQR)	Media \pm SD	Mediana (IQR)
Control (1)	2.92 \pm 1.55	4.0 (3.0-4.0)	1.85 \pm 1.41	2.0 (1.0-3.0)
Fractura osteoporótica (2)	2.75 \pm 1.75	3.5 (2.3-4.0)	1.25 \pm 1.16	1.5 (0-2.0)
Artrosis (3)	1.13 \pm 1.36	0.5 (0-2.3)	0.25 \pm 0.46	0 (0-0.3)

Tabla 16. Datos correspondientes a consolidación y corticalización (media \pm desviación estándar y mediana con rango intercuartílico) en el grupo de administración sistémica.

Se analizan estos resultados en la tabla 17 (*p* valores), mediante comparación entre los diferentes subgrupos (control, fractura osteoporótica y artrosis).

SISTÉMICO (A)		Tabla 17	
	Consolidación	Corticalización	
Subgrupos C (1) - FO (2) - A (3)	0.030	0.024	
Subgrupos C (1) - FO (2)	0.812	0.296	
Subgrupos C (1) - A (3)	0.012	0.009	
Subgrupos FO (2) - A (3)	0.049	0.062	

Tabla 17. *p* valores de las comparaciones entre subgrupos (control = C = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = A = 3), para el parámetro consolidación y corticalización, en el grupo de administración sistémica.

En el siguiente gráfico de puntos se representan los valores individuales y las medianas de cada subgrupo (figura 31).

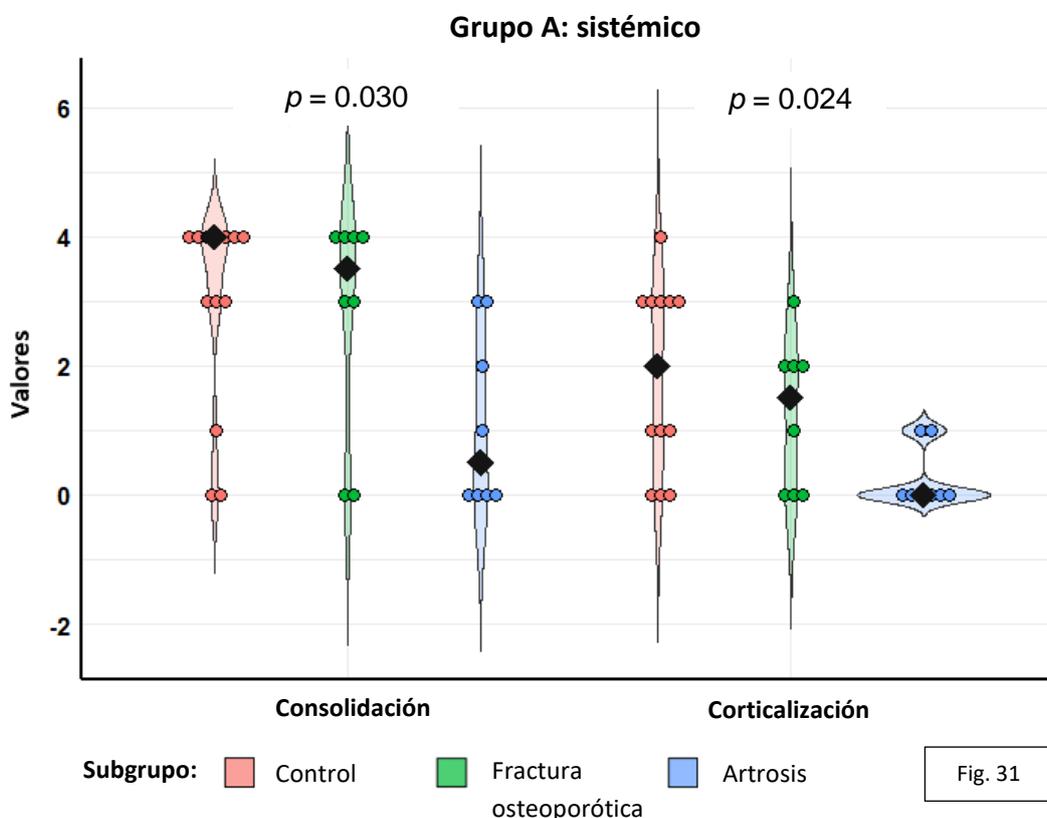


Figura 31. Puntuaciones de consolidación y corticalización en el Grupo A (administración sistémica). Puntos con valores individuales y medianas (rombos).

En el grupo de administración sistémica (Grupo A), cuando se comparan los tres subgrupos entre sí con el test de Kruskal-Wallis, **las diferencias son significativas para las puntuaciones de consolidación y corticalización** ($p = 0.030$, $p = 0.024$). **Ello es debido a que las MSCs que provienen de pacientes con artrosis presentan peores puntuaciones.** Cuando se realiza la comparación por pares con U de Mann-Whitney, las MSCs de artrosis se comparan desfavorablemente con el grupo control (consolidación $p = 0.012$, corticalización $p = 0.009$). Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre las MSCs de fracturas osteoporóticas y el grupo control (consolidación $p = 0.812$, corticalización $p = 0.296$). Así mismo, nuestros resultados indican que las MSCs de pacientes con artrosis son peores que las MSCs pacientes con fractura osteoporótica en el parámetro consolidación ($p = 0.049$), pero no en el de corticalización ($p = 0.062$).

6.3.2.3 Administración local de MSCs: comparación entre subgrupos 1 (control), 2 (fractura osteoporótica) y 3 (artrosis)

A continuación, se muestran los análisis de los parámetros consolidación y corticalización, para cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3) en el grupo de administración local (grupo B) (tabla 18).

LOCAL (B)		Tabla 18		
	Consolidación		Corticalización	
	Media \pm SD	Mediana (IQR)	Media \pm SD	Mediana (IQR)
Control (1)	3.27 \pm 1.01	4.0 (3.0-4.0)	1.73 \pm 0.90	2.0 (1.0-2.0)
Fractura osteoporótica (2)	3.67 \pm 0.50	4.0 (3.0-4.0)	1.56 \pm 0.53	2.0 (1.0-2.0)
Artrosis (3)	2.80 \pm 1.23	3.0 (2.3-3.8)	1.20 \pm 1.23	1.0 (0.3-1.8)

Tabla 18. Datos correspondientes a los parámetros consolidación y corticalización (media \pm desviación estándar y mediana con rango intercuartílico) en el grupo de administración local.

Se analizan estos resultados en la tabla 19 (*p* valores), mediante comparación entre los diferentes subgrupos (control, fractura osteoporótica y artrosis).

LOCAL (B)		Tabla 19	
	Consolidación	Corticalización	
Subgrupos C (1) - FO (2) - A (3)	0.177	0.250	
Subgrupos C (1) - FO (2)	0.432	0.560	
Subgrupos C (1) - A (3)	0.294	0.152	
Subgrupos FO (2) - A (3)	0.062	0.190	

Tabla 19. *p* valores de las comparaciones entre subgrupos (control = C = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = A = 3), para el parámetro consolidación y corticalización, en el grupo de administración local.

En el siguiente gráfico de puntos se representan los valores individuales y las medianas de cada subgrupo (figura 32).

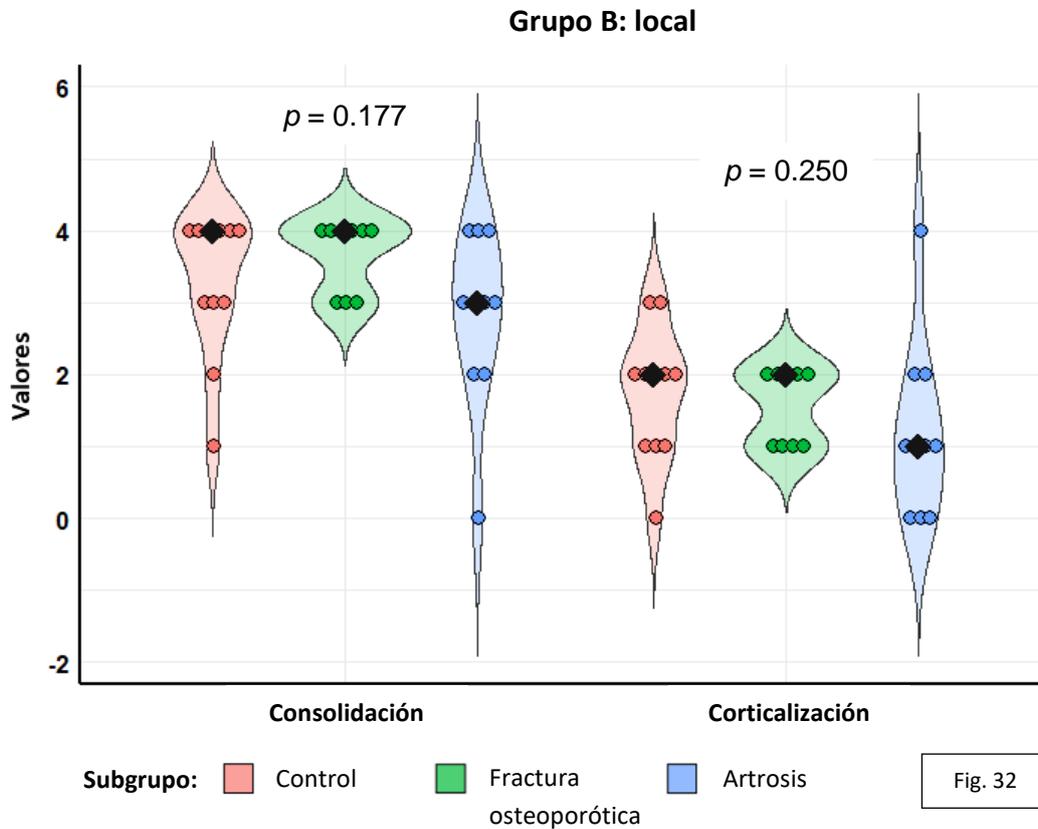


Figura 32. Puntuaciones de consolidación y corticalización en el Grupo B (administración local). Puntos con valores individuales y medianas (rombos).

En el grupo de administración local (Grupo B), no hemos encontrado diferencias en las comparaciones entre ninguno de los subgrupos. A pesar de que las puntuaciones tendieron a ser peores con las MSCs de artrosis cuando se las compara con el grupo control o con el grupo de fractura osteoporótica, las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p = 0.062-0.294$). Tampoco hubo diferencias significativas entre el grupo de fractura osteoporótica y el grupo control (consolidación $p = 0.432$, corticalización $p = 0.560$).

6.3.2.4 Comparación entre grupos A (administración sistémica de MSCs) y B (administración local de MSCs)

En la tabla 20 se muestran los resultados de la comparación entre la vía de administración (sistémica o local), para cada subgrupo (control, fractura osteoporótica, artrosis). Es decir, se compara el grupo A con el grupo B.

	Consolidación	Corticalización
A1-B1	0.774	0.765
A2-B2	0.324	0.570
A3-B3	0.022	0.042

Tabla 20. p valores de las comparaciones entre los grupos A y B (administración sistémica y local), dentro de cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3), para el parámetro consolidación y corticalización.

Como se esperaba, la comparación global entre los Grupos A y B, no mostró diferencias significativas entre la vía de administración de los subgrupos control (consolidación $p = 0.774$, corticalización $p = 0.765$). Sin embargo, **los animales a los que se implantaron MSCs de pacientes con artrosis por administración sistémica tuvieron puntuaciones significativamente más bajas que aquellos que las recibieron localmente** (consolidación $p = 0.022$, corticalización $p = 0.042$). **No se apreciaron diferencias en la vía de administración entre los grupos de MSCs de pacientes con fractura osteoporótica** (consolidación $p = 0.324$, corticalización $p = 0.570$).

6.3.2.5 Resumen de los resultados de consolidación y corticalización

- No hemos visto diferencias significativas de consolidación radiológica (parámetros consolidación y corticalización) entre los grupos control y los grupos a los que se administran MSCs de pacientes con fractura osteoporótica, independientemente de la vía de administración.
- En la administración sistémica, los datos de consolidación radiológica (parámetros consolidación y corticalización) son peores en el grupo de MSCs cultivadas de pacientes con artrosis cuando se comparan con el grupo control.

- En la administración sistémica, los datos de consolidación radiológica para el parámetro consolidación, son peores en el grupo de MSCs cultivadas de pacientes con artrosis cuando se comparan con el grupo de fractura osteoporótica.
- En la administración local, no hemos encontrado diferencias de consolidación radiológica (parámetros consolidación y corticalización) en las comparaciones entre los diferentes subgrupos.
- No hay diferencias de consolidación radiológica (parámetros consolidación y corticalización) en función de la vía de administración, entre los grupos a los que se administran MSCs de pacientes con fractura osteoporótica. Sin embargo, cuando las MSCs cultivadas de pacientes con artrosis se administran de forma sistémica, se obtienen peores resultados que cuando se administran de forma local.
- De forma global podemos decir que, aunque no hemos apreciado mejor consolidación radiológica en los grupos en los que se administran MSCs respecto al grupo control, de forma inesperada hemos visto que **las MSCs cultivadas de pacientes con artrosis obtienen peores resultados de consolidación radiológica (parámetros consolidación y corticalización), particularmente cuando se administran de forma sistémica.**

6.4 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

6.4.1 PUNTUACIONES DE LAS ESCALAS HISTOLÓGICAS

Las puntuaciones obtenidas de cada fractura en las escalas histológicas de Allen, Huo y puente óseo, se reflejan en la tabla 21.

	SISTÉMICO (A)			LOCAL (B)			Tabla 21	
	Allen	Huo	P. óseo	Allen	Huo	P. óseo		
Control (1)	F-13	6	9	2	F-76	6	9	2
	F-14	6	9	2	F-77	6	9	1
	F-30	4	7	0	F-79	6	9	2
	F-34	6	9	2	F-82	6	10	2
	F-35	6	10	2	F-87	6	9	2
	F-40	6	9	1	F-98	5	8	0
	F-41	6	9	1	F-112	6	10	1
	F-42	6	9	2	F-116	6	9	2
	F-46	6	10	2	F-117	6	9	1
	F-48	6	9	2	F-118	6	9	2
	F-49	6	10	2	F-120	6	10	2
	F-51	5	8	0				
	F-52	5	9	1				
FO (2)	F-15	6	10	2	F-83	6	9	2
	F-23	6	9	1	F-86	6	10	2
	F-25	5	9	2	F-94	5	8	0
	F-26	5	7	1	F-105	6	10	2
	F-29	2	4	0	F-106	6	9	2
	F-36	6	9	1	F-107	6	9	2
	F-43	6	9	1	F-113	6	9	2
	F-50	6	10	2	F-115	6	10	2
				F-119	6	9	2	
Artrosis (3)	F-19	1	1	0	F-54	6	9	1
	F-20	6	9	1	F-73	1	1	0
	F-22	1	1	0	F-80	4	6	1
	F-28	6	9	1	F-84	1	1	0
	F-33	1	1	0	F-90	1	1	0
	F-38	4	7	1	F-97	6	9	1
	F-47	1	1	0	F-99	5	8	0
	F-53	1	1	0	F-100	6	9	1
					F-103	6	9	1
					F-109	6	9	1

Tabla 21. Puntuaciones individuales de las escalas de Allen, Huo y puente óseo, en ambos grupos de administración, en los tres subgrupos (control = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = 3).

6.4.2 ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE MSCs: COMPARACIÓN ENTRE SUBGRUPOS 1 (CONTROL), 2 (FRACTURA OSTEOPORÓTICA) Y 3 (ARTROSIS)

A continuación, se muestran los análisis de las puntuaciones en las tres escalas histológicas, para cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3) en el grupo de administración sistémica (grupo A) (tabla 22).

SISTÉMICO (A)						Tabla 22
	Allen		Huo		Puente óseo	
	Media \pm SD	Mediana (IQR)	Media \pm SD	Mediana (IQR)	Media \pm SD	Mediana (IQR)
Control (1)	5.69 \pm 0.63	6.0 (6.0-6.0)	9 \pm 0.82	9.0 (9.0-9.0)	1.46 \pm 0.78	2.0 (1.0-2.0))
Fractura osteop. (2)	5.25 \pm 1.39	6.0 (5.0-6.0)	8.38 \pm 1.99	9.0 (8.5-9.3)	1.25 \pm 0.71	1.0 (1.0-2.0)
Artrosis (3)	2.63 \pm 2.33	1.0 (1.0-4.5)	3.75 \pm 3.85	1.0 (1.0-7.5)	0.38 \pm 0.52	0.0 (0.0-1.0)

Tabla 22. Datos correspondientes a las escalas histológicas de Allen, Huo y puente óseo (media \pm desviación estándar y mediana con rango intercuartílico) en el grupo de administración sistémica.

El análisis de estos resultados (p valores) mediante comparación entre los diferentes subgrupos (control, fractura osteoporótica y artrosis), se refleja en la tabla 23.

SISTÉMICO (A)				Tabla 23
	Allen	Huo	Puente óseo	
Subgrupos C (1) - FO (2) - A (3)	0.008	0.005	0.010	
Subgrupos C (1) - FO (2)	0.465	0.716	0.423	
Subgrupos C (1) - A (3)	0.004	0.002	0.005	
Subgrupos FO (2) - A (3)	0.026	0.014	0.020	

Tabla 23. p valores de las comparaciones entre subgrupos (control = C = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = A = 3), de los resultados de las tres clasificaciones histológicas, en el grupo de administración sistémica.

En el siguiente gráfico de puntos se representan los valores individuales y las medianas de cada subgrupo (figura 33).

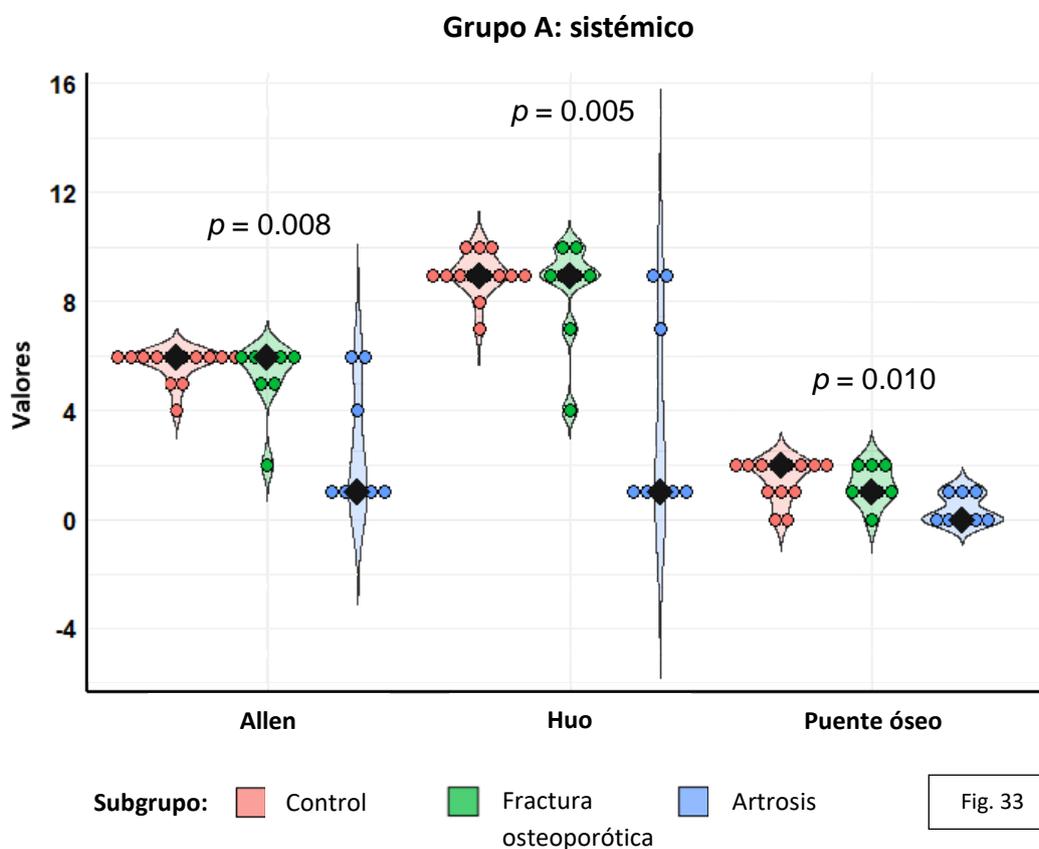


Figura 33. Puntuaciones histológicas según las escalas de Allen, Huo y puente óseo para el Grupo A (administración sistémica). Puntos con valores individuales y medianas (rombos).

En el grupo de administración sistémica (Grupo A), cuando se comparan los tres subgrupos entre sí con el test de Kruskal-Wallis, las diferencias son significativas en las tres escalas histológicas (Allen $p = 0.008$, Huo $p = 0.005$, puente óseo $p = 0.010$). Ello es debido a que las MSCs cultivadas de pacientes con artrosis presentan peores puntuaciones. Cuando se realiza la comparación por pares con U de Mann-Whitney, las MSCs de artrosis se comparan desfavorablemente con el grupo control (Allen $p = 0.004$, Huo $p = 0.002$, puente óseo $p = 0.005$) y con el grupo de fracturas osteoporóticas (Allen $p = 0.026$, Huo $p = 0.014$, puente óseo $p = 0.020$). Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre las MSCs de fracturas osteoporóticas y el grupo control (Allen $p = 0.465$, Huo $p = 0.716$, puente óseo $p = 0.423$).

6.4.3 ADMINISTRACIÓN LOCAL DE MSCs: COMPARACIÓN ENTRE SUBGRUPOS 1 (CONTROL), 2 (FRACTURA OSTEOPORÓTICA) Y 3 (ARTROSIS)

Se muestran los análisis de las puntuaciones en las tres escalas histológicas, para cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3) en el grupo de administración local (grupo B) (tabla 24).

LOCAL (B)							Tabla 24
	Allen		Huo		Puente óseo		
	Media \pm SD	Mediana (IQR)	Media \pm SD	Mediana (IQR)	Media \pm SD	Mediana (IQR)	
Control (1)	5.91 \pm 0.30	6.0 (6.0-6.0)	9.18 \pm 0.60	9.0 (9.0-9.5)	1.55 \pm 0.69	2.0 (1.0-2.0)	
Fractura osteop. (2)	5.89 \pm 0.33	6.0 (6.0-6.0)	9.22 \pm 0.67	9.0 (9.0-10.0)	1.78 \pm 0.67	2.0 (2.0-2.0)	
Artrosis (3)	4.2 \pm 2.30	5.5 (1.75-6.0)	6.2 \pm 3.71	8.5 (2.25-9.0)	0.6 \pm 0.52	1.0 (0.0-1.0)	

Tabla 24. Datos correspondientes a las escalas histológicas de Allen, Huo y puente óseo (media \pm desviación estándar y mediana con rango intercuartílico) en el grupo de administración local.

El análisis de estos resultados (p valores) mediante comparación entre los diferentes subgrupos (control, fractura osteoporótica y artrosis), se refleja en la tabla 25.

LOCAL (B)				Tabla 25
	Allen	Huo	Puente óseo	
Subgrupos C (1) - FO (2) - A (3)	0.033	0.015	0.001	
Subgrupos C (1) - FO (2)	0.884	0.861	0.270	
Subgrupos C (1) - A (3)	0.030	0.012	0.004	
Subgrupos FO (2) - A (3)	0.053	0.017	0.001	

Tabla 25. p valores de las comparaciones entre subgrupos (control = C = 1, fractura osteoporótica = FO = 2, artrosis = A = 3), de los resultados de las tres clasificaciones histológicas, en el grupo de administración local.

En el siguiente gráfico de puntos se representan los valores individuales y las medianas de cada subgrupo (figura 34).

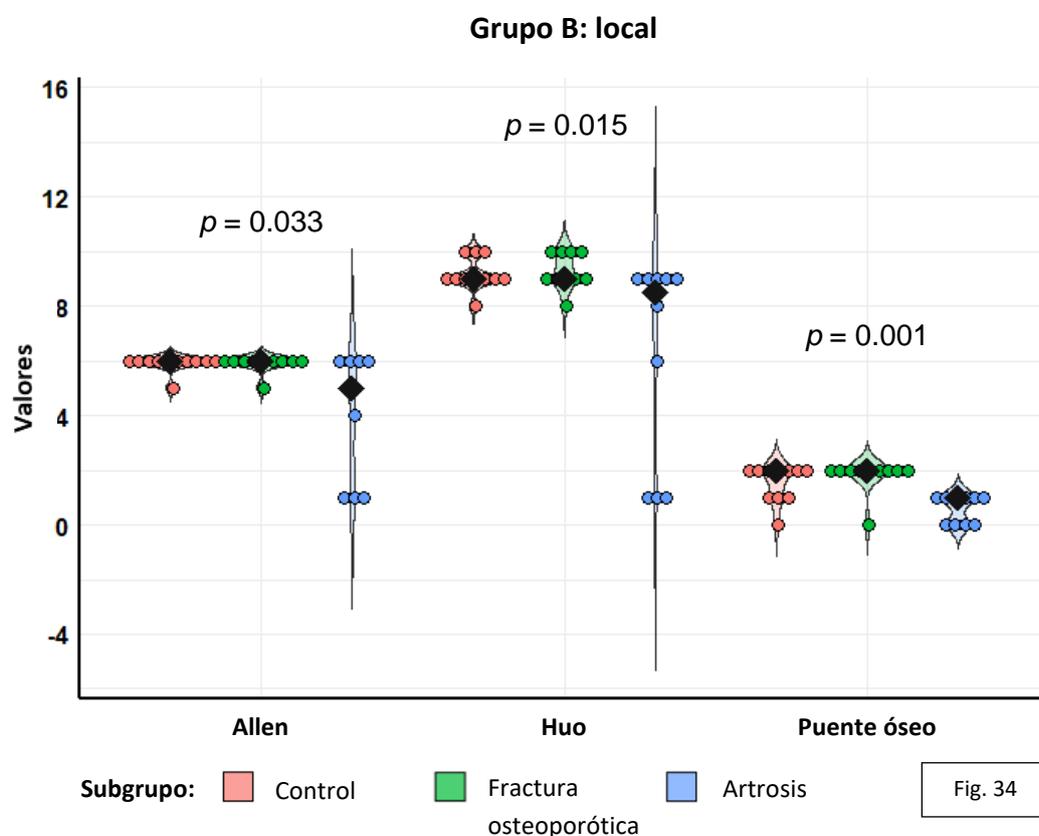


Figura 34. Puntuaciones histológicas según las escalas de Allen, Huo y puente óseo para el Grupo B (administración local). Puntos con valores individuales y medianas (rombos).

En el grupo de administración local (Grupo B), cuando se comparan los tres subgrupos entre sí, las diferencias son significativas en las tres escalas (Allen $p = 0.033$, Huo $p = 0.015$, puente óseo $p = 0.001$). Al igual que en la administración sistémica, es debido a que las MSCs cultivadas de pacientes con artrosis presentan peores puntuaciones. Cuando se realiza la comparación por pares, las MSCs de artrosis se comparan desfavorablemente con el grupo control (Allen $p = 0.030$, Huo $p = 0.012$, puente óseo $p = 0.004$) y con el grupo de fracturas osteoporóticas (siendo significativo en Huo $p = 0.017$ y puente óseo $p = 0.001$, pero no en Allen $p = 0.053$). Al igual que en la administración sistémica, no se han encontrado diferencias entre las MSCs de fracturas osteoporóticas y el grupo control (Allen $p = 0.884$, Huo $p = 0.861$, puente óseo $p = 0.270$).

6.4.4 COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS A (ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE MSCs) Y B (ADMINISTRACIÓN LOCAL DE MSCs)

En la tabla 26 se muestran los resultados de la comparación entre la vía de administración (sistémica o local), para cada subgrupo (control, fractura osteoporótica, artrosis). Es decir, se compara el grupo A con el grupo B.

	Allen	Huo	Puente óseo
A1-B1	0.348	0.662	0.840
A2-B2	0.194	0.459	0.061
A3-B3	0.178	0.195	0.357

Tabla 26. *p* valores de las comparaciones entre los grupos A y B (administración sistémica y local), dentro de cada subgrupo (control = 1, fractura osteoporótica = 2, artrosis = 3), para las puntuaciones en las escalas histológicas de Allen, Huo y puente óseo.

En el análisis por pares **comparando la administración sistémica y local de MSCs, no encontramos diferencias en ningún subgrupo** (control, fractura osteoporótica, artrosis), **en ninguna de las tres escalas histológicas** ($p = 0.061-0.840$).

6.4.5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS HISTOLÓGICOS

- Al comparar los tres subgrupos entre sí, las diferencias son significativas en las tres escalas histológicas (Allen, Huo y puente óseo), en ambos grupos de administración. Ello es debido a que **las MSCs cultivadas de pacientes con artrosis presentan peores puntuaciones en la consolidación ósea histológica.**
- Cuando se realiza la comparación por pares, las MSCs cultivadas de pacientes con artrosis se comparan desfavorablemente con el grupo control y con el grupo de fracturas osteoporóticas, en ambos grupos de administración (sistémica o local).
- Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre las MSCs de pacientes con fractura osteoporótica y el grupo control, independientemente de la vía de administración.
- **Desde el punto de vista histológico, no existe diferencia entre la vía de administración sistémica o local, en ninguno de los tres subgrupos** (control, fractura osteoporótica, artrosis).

6.5 CORRELACIÓN ENTRE EL ESTUDIO RADIOLÓGICO Y EL ESTUDIO HISTOLÓGICO

En conjunto, las puntuaciones de consolidación, corticalización y los tres índices histológicos (Allen, Huo y puente óseo) estuvieron fuertemente correlacionados entre sí, lo que demuestra la solidez del estudio. Para ello se ha utilizado el coeficiente de correlación de Spearman. Las puntuaciones BV/TV callo + cortical y BV/TV callo, presentan una baja correlación con el resto de los índices. Esto se representa en la figura 35.

	BV/TV C+C	BV/TV C	CONSOLIDACIÓN	CORTICALIZACIÓN	ALLEN	HUO	P. ÓSEO
BV/TV C+C	1	0.591**	0,261*	0.166	0.202	0.139	0.235
BV/TV C		1	0.048	-0.099	0.101	-0.055	0.078
CONSOLIDACIÓN			1	0.749**	0.496**	0.540**	0.672**
CORTICALIZACIÓN				1	0.516**	0.601**	0.667**
ALLEN					1	0.847**	0.757**
HUO						1	0.781**
P. ÓSEO							1

Figura 35. Matriz con los coeficientes de correlación de Spearman entre los índices radiológicos e histológicos. ** La correlación es significativa en el nivel 0.01. * La correlación es significativa en el nivel 0.05.

6.6 CASOS DE RATONES NOD/SCID POR GRUPO DE TRATAMIENTO

En las figuras 36 a 39 se muestran ejemplos de fracturas por cada grupo de tratamiento, con el estudio radiológico e histológico realizado, y las puntuaciones otorgadas en las distintas clasificaciones.

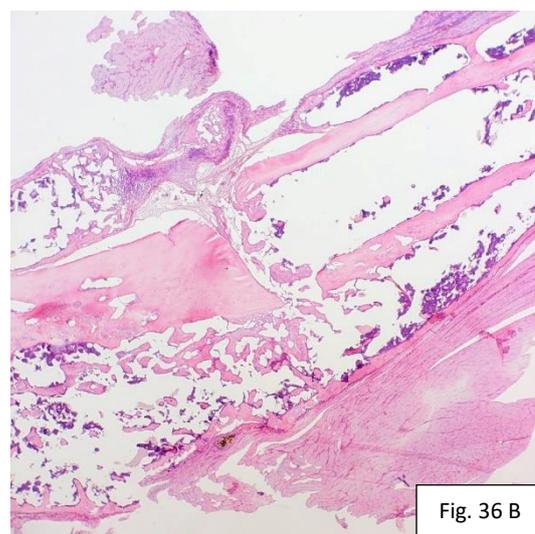
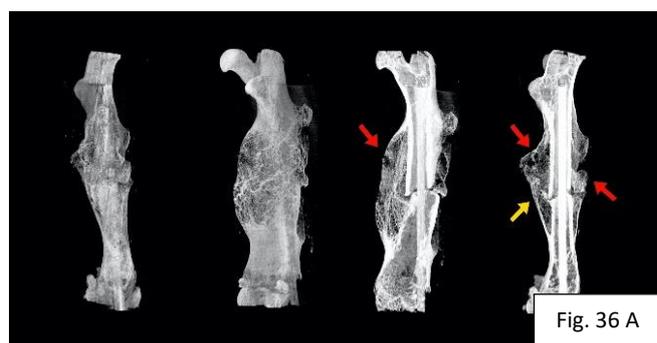


Figura 36 A-B. Estudio radiológico e histológico correspondiente a F-43 del grupo A2 (administración sistémica de MSCs cultivadas de paciente con fractura osteoporótica). **(A)** Micro-TC con puntuación 3-1. Se aprecian 3 corticales consolidadas (flechas rojas) y 1 corticalizada (flecha amarilla). **(B)** Preparación histológica H.E. (4x) con puntuación Allen 6, Huo 9, puente óseo 1. Se aprecia consolidación ósea completa con hueso inmaduro en una de las corticales y tejido cartilaginoso en la otra.

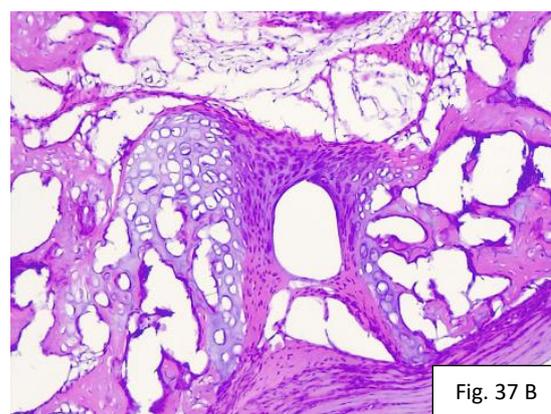
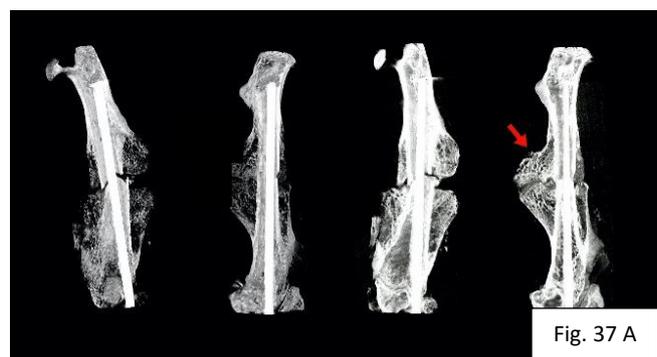


Figura 37 A-B. Estudio radiológico e histológico correspondiente a F-47 del grupo A3 (administración sistémica de MSCs cultivadas de paciente con artrosis). **(A)** Micro-TC con puntuación 1-0. Se aprecia 1 cortical consolidada (flecha roja) y ninguna corticalizada. **(B)** Preparación histológica H.E. (20x) con puntuación Allen 1, Huo 1, puente óseo 0. Se aprecia tejido fibroso y ausencia de consolidación en ambas corticales.

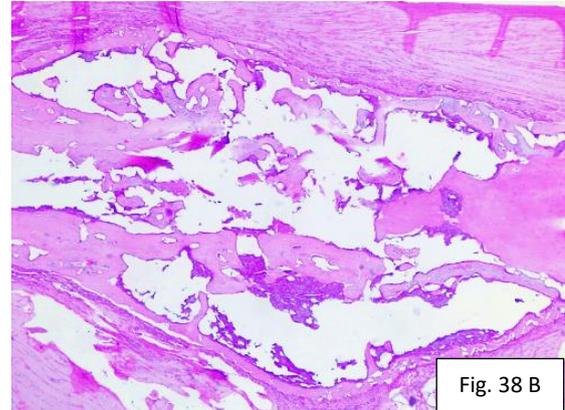
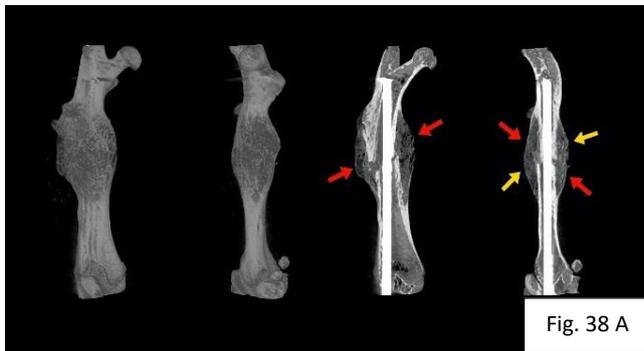


Figura 38 A-B. Estudio radiológico e histológico correspondiente a F105 del grupo B2 (administración local de MSCs cultivadas de paciente con fractura osteoporótica). **(A)** Micro-TC con puntuación 4-2. Se aprecian 4 corticales consolidadas (flechas rojas) y 2 corticalizadas (flechas amarillas). **(B)** Preparación histológica H.E. (4x) con puntuación Allen 6, Huo 10, puente óseo 2. Se aprecia consolidación ósea completa con hueso maduro en ambas corticales.

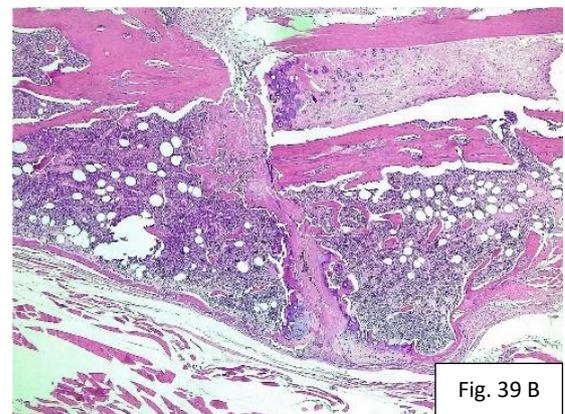


Figura 39 A-B. Estudio radiológico e histológico correspondiente a F99 del grupo B3 (administración local de MSCs cultivadas de paciente con artrosis). **(A)** Micro-TC con puntuación 3-1. Se aprecian 3 corticales consolidadas (flechas rojas) y 1 corticalizada (flecha amarilla). **(B)** Preparación histológica H.E. (4x) con puntuación Allen 5, Huo 8, puente óseo 0. Se aprecia unión ósea incompleta con hueso inmaduro y menos proporción de cartilago.

7 DISCUSIÓN

7 DISCUSIÓN

La importancia de las terapias regeneradoras con MSCs se pone de manifiesto con el auge creciente de estudios experimentales y ensayos clínicos en los últimos años. Esto está llevando a su uso en la práctica clínica, proporcionando una alternativa de tratamiento para promover la consolidación cuando ésta se encuentra alterada o ante la existencia de factores de riesgo, entre los que podemos incluir la edad avanzada o la osteoporosis (204).

En la discusión analizaremos el tratamiento con MSCs en nuestro modelo de experimentación y lo compararemos con los modelos existentes hasta la fecha. Estudiaremos el origen de las MSCs en función de su obtención de pacientes con fractura osteoporótica de cadera o coxartrosis, y cómo esto puede afectar en los resultados. Además, valoraremos si existen diferencias según la vía de administración, sistémica o local en el foco de fractura. Tanto el origen de las células como la vía de administración, los compararemos con lo reflejado en la literatura científica. Finalmente, se revisará la bibliografía actual valorando la efectividad de las terapias con MSCs para el tratamiento de la consolidación ósea en humanos.

7.1 EL MODELO EXPERIMENTAL

7.1.1 SELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

La correcta elección del modelo experimental es de vital importancia para poder extrapolar los resultados de cualquier investigación al ser humano. Existen unos criterios lógicos para esta elección que están basados en la homología, semejanza evolutiva, anatomía y procesos fisiológicos (154).

Aunque sería lógico pensar en mamíferos grandes por estar más próximos en la escala filogenética, lo cierto es que la mayor parte de los estudios eligen roedores (ratones y ratas), seguidos de conejos, mientras que otros mamíferos como ovejas, perros o primates, suponen un pequeño porcentaje. La razón para la elección de mamíferos inferiores la podemos encontrar en cuanto a su coste y manejo más asequible, lo mismo por parte del personal encargado de los animales que de los investigadores. Mientras que el empleo de grandes mamíferos es más difícil de asumir para la mayoría de los proyectos de investigación (159).

Las características anatómicas, fisiológicas y biomecánicas del tejido óseo humano hacen que no exista un modelo experimental perfecto. El animal que más se parece desde el punto de vista histológico es el perro, puesto que también presenta canales haversianos. Sin embargo, presenta una combinación de hueso lamelar y plexiforme que lo hacen diferente a nosotros. Además, el remodelado óseo y el comportamiento biomecánico también difieren (159, 205).

Si lo comparamos con los roedores, la ventaja que tiene es el tamaño, esto hace que sea técnicamente más fácil el procedimiento quirúrgico y la colocación de los implantes.

Los roedores presentan una histología ósea muy rudimentaria que ha hecho que se cuestionara la validez del modelo. Pero estos pequeños animales consiguen el remodelado óseo a través de un sistema de cavidades de reabsorción parecidos a los canales de Havers, que finalmente consiguen la consolidación (163). Con lo cual, son modelos válidos y ampliamente utilizados. La desventaja del tamaño es que se requiere instrumental quirúrgico más preciso y cualificado. Además de las ventajas económicas de los roedores, los experimentos se pueden realizar en espacios de tiempo reducido debido a su corto ciclo reproductivo. Como otras ventajas tenemos que el manejo y manutención de los animales son sencillos y existe gran experiencia (206).

De los roedores, los animales tradicionalmente empleados para valorar la consolidación ósea han sido las ratas, de hecho, en la década de los años 40 se publicaron los primeros estudios. El mayor tamaño de las ratas comparado con los ratones facilitaría los experimentos (157), aunque el desarrollo de la industria biomédica ha permitido la aparición de nuevos implantes e instrumental adecuados, lo que simplifica el trabajo en ambas especies.

El número de estudios realizados con ratones ha aumentado en las últimas décadas. También influye el hecho de que el conocimiento de su genética está muy avanzado. Así, los modelos genéticos de ratón son indispensables para conocer el papel de los factores celulares, moleculares y mecánicos, implicados en la regeneración ósea. También pueden ayudar a definir las predisposiciones genéticas para el retardo de consolidación y pseudoartrosis, ya que muchos fenotipos de ratón imitan las condiciones humanas (207).

Con las ventajas expuestas, el número de estudios de consolidación en ratones ha igualado, o incluso superado, al número de estudios en ratas (157).

Nosotros hemos elegido el ratón por el amplio conocimiento y experiencia en estudios de consolidación, además de por su facilidad en el manejo. La razón de la elección de la cepa NOD/SCID, como ya se ha comentado en apartados previos de esta tesis, fue para evitar problemas de compatibilidad al implantar células humanas, debido a que inyectamos MSCs que provienen de cultivos de cabezas femorales de pacientes.

7.1.2 CREACIÓN DEL MODELO DE FRACTURA

7.1.2.1 Elección de la región anatómica a intervenir

En la amplia bibliografía que existe al respecto, casi siempre se escogen las extremidades inferiores para los estudios. Esto es debido al mayor tamaño respecto a la extremidad superior. También porque se ve sometida a mayor carga, pese a que son animales cuadrúpedos.

Dentro de la extremidad inferior, se prefiere el fémur respecto a la tibia. De nuevo, no solo por su mayor tamaño, sino por su configuración diafisaria tubular, siendo más recto y de mayor diámetro (191, 194, 206, 208, 209). Esto reduce considerablemente la complejidad de los procedimientos y aumenta la reproducibilidad del modelo (169). Además, tiene una amplia cobertura de tejidos blandos. Normalmente se emplea el área diafisaria del hueso para realizar estudios de consolidación de fracturas, puesto que es la más sencilla de manejar quirúrgicamente y es un área común de asiento de pseudoartrosis en la clínica. Por el contrario, la tibia tiene una configuración triangular del eje trasverso y su eje longitudinal curvado, lo que dificulta la colocación de los implantes (163). Si se eligiera esta localización, habría que tener en cuenta la influencia del peroné en la evolución de la fractura.

En nuestro estudio se eligió el fémur derecho del ratón, puesto que por dimensiones y anatomía admitía la implantación de un dispositivo intramedular. El sistema de osteosíntesis elegido fue una aguja de 27 G. En humanos, es habitual el implante de un clavo intramedular como tratamiento de las fracturas de fémur, con lo que el estudio de la consolidación permite su extrapolación.

7.1.2.2 Tipo de osteotomía

Para la creación de la osteotomía se han tenido en cuenta dos variables, si se realiza de forma abierta o cerrada, y la herramienta con la que se ejecuta.

La fractura se puede realizar mediante **métodos cerrados o abiertos**. Se han publicado artículos empleando uno u otro método, con resultados similares. La realización de una fractura por **métodos cerrados** tiene la ventaja fundamental de que es similar a la situación clínica habitual, es decir, una fuerza que actúa sobre el hueso hasta vencer su resistencia. El desarrollo de una infección después de la realización de la fractura por este método es menos probable, pero tiene el inconveniente de que, si se decide fijar la fractura, será necesario un nuevo procedimiento quirúrgico. En segundo lugar, estos modelos son menos reproducibles, al ser más difícil realizar con precisión la fractura siempre en la misma localización segmentaria y con trazos fracturarios reproducibles. Los primeros autores en publicar un sistema para provocar una fractura cerrada en un modelo experimental en rata

fueron Einhorn y Bonnarens en 1948 (172), quienes idearon una guillotina de tres apoyos. Este sistema lo han empleado diferentes autores con éxito (159, 191, 210) y la mayor parte de las veces utilizan un dispositivo intramedular o la fijación externa, para la osteosíntesis. El procedimiento es menos reproducible que los modelos abiertos, ya que el fémur no está expuesto y se deben usar puntos de referencia externos para colocar la guillotina sobre la diáfisis.

La ventaja a la hora de la elección de **métodos abiertos** para la realización de la osteotomía es que, mediante el mismo abordaje se puede implantar el dispositivo de osteosíntesis o realizar una resección ósea. Las desventajas son el daño de la cobertura muscular, el riesgo de infección o la pérdida del hematoma fracturario.

Según lo expuesto, podemos afirmar que la utilización de métodos cerrados es más aconsejable para el estudio de fracturas, dado que no lesionamos las partes blandas ni alteramos el proceso de consolidación. Por otra parte, en modelos en los que pretendamos estudiar patología de la consolidación, nos decantaremos por métodos abiertos al permitir alterar el componente biológico. Estos últimos tienen la semejanza de que, al ser común la realización de abordajes quirúrgicos para el tratamiento de fracturas, estamos simulando lo que ocurre en la clínica.

En nuestro trabajo, como se pretendió crear un modelo de fractura con retardo de consolidación, realizamos la osteotomía femoral en los ratones NOD/SCID por un método abierto. Por esta razón, no solo perdimos el hematoma fracturario y la estabilidad de las partes blandas, sino que nos permitió lesionar el periostio. De esta forma, nuestro modelo es más parecido a lo que ocurre en el ser humano cuando existen problemas en la consolidación de las fracturas. En el abordaje empleado se respetó la cobertura cutánea y muscular, tal como se realizan los abordajes en los humanos. Para ello, se practicó un abordaje lateral a la diáfisis femoral, disecando de forma roma el plano muscular hasta llegar al plano óseo. Este mismo abordaje ha sido empleado por diferentes autores en sus estudios (179, 186, 206, 209, 211, 212).

La **herramienta** empleada para realizar la fractura varía en función del modelo experimental. Ya se ha comentado que en **técnicas cerradas** se utiliza una **guillotina o sistema de flexión de tres puntos** (Figura 9), mientras que para las **técnicas abiertas** existen distintas alternativas entre las que están las **sierras manuales, sierras oscilantes o fresas**. Las sierras manuales, como la sierra de Gigli, son más imprecisas, pero generan menor daño térmico (211). Mientras que sierras oscilantes o fresas generan más temperatura, lo que se traduce en una lesión de los tejidos circundantes (186, 190, 194, 213).

En un principio, nuestra idea fue la de utilizar una sierra oscilante de pequeño tamaño, pero debido a las dimensiones reducidas de nuestro modelo experimental, no disponíamos de un equipo lo suficientemente sensible para la realización de una osteotomía de manera

estandarizada. Por este motivo optamos por un método manual, ejecutando la osteotomía mediante corte con un bisturí del número 15. Esta técnica es laboriosa, y aunque parezca más imprecisa, consiguió la realización de fracturas homogéneas. Nos permitió la realización de la osteotomía siempre al mismo nivel y con trazos fracturarios transversos, si bien es un método que no está descrito previamente en la bibliografía.

7.1.2.3 Método de fijación de la fractura

Existe una amplia variedad de métodos de fijación una vez establecida la fractura. Al igual que en el humano, en el modelo experimental se han probado desde fijadores externos a placas de osteosíntesis o fijación intramedular. Cada método puede presentar ventajas o inconvenientes, por lo que los diferentes autores seleccionarán el que esté más indicado para cada estudio.

Los sistemas de **fijación externa** en los animales de experimentación han sido durante mucho tiempo los sistemas más utilizados (172, 209, 211, 214). La ventaja, quizá más importante, es que no se ve afectada la fisiología de la consolidación al no existir ningún material de osteosíntesis en el foco de fractura, también facilita el estudio radiológico. Se puede conseguir una estabilidad capaz de mantener un defecto óseo de forma mantenida, pero la infección en el trayecto de las fichas o pines con el exterior, es una realidad frecuente (194, 215). Otro problema es la tendencia a la destrucción del montaje por parte de los roedores, sobre todo, si tienen partes no metálicas. Por ello, las casas comerciales han diseñado fijadores más resistentes, pero que a la vez son ligeros y versátiles. El problema de estos implantes es el mayor coste económico.

En la **fijación interna** vamos a diferenciar las placas y los dispositivos para la fijación intramedular. Existen diversos tipos de **placas de osteosíntesis**, las empleadas para humanos en pequeñas localizaciones como manos o pies, o bien las diseñadas específicamente para los animales de experimentación (163, 176, 192, 216-218). A la hora de la implantación de las placas, es necesaria una vía de abordaje más agresiva, lo que implica una alteración del hematoma fracturario (159). Además, si está previsto la realización de estudios biomecánicos, es necesaria su retirada y eso implica dejar zonas de debilidad cortical. Técnicamente es más compleja su implantación y la valoración radiológica está dificultada al interferir con la región de la osteotomía. Sin embargo, están indicadas en modelos con grandes defectos óseos, puesto que la estabilidad proporcionada es mayor que con otros sistemas (159, 176). Los resultados descritos en los experimentos son muy dispares, se trata del implante que teóricamente aportaría más estabilidad, pero biomecánicamente puede fracasar antes de finalizar el estudio, sobre todo en las placas no diseñadas específicamente.

Dentro de la **fijación intramedular** incluimos agujas o clavos, el sistema *pin-clip* y tornillos intramedulares. La primera fijación empleada para estos modelos fue con **agujas de Kirschner**

intramedulares, éste es un método sencillo que aporta una estabilidad relativa, aunque no es capaz de proporcionar estabilidad rotacional al foco (195, 219). Autores como Hietaniemi y Kokubu publicaron modelos experimentales con agujas intramedulares, empleando modelos de pseudoartrosis basados en la inestabilidad del foco de fractura, por lo que la utilización de agujas intramedulares es un método válido para su modelo experimental (186, 191). No obstante, su uso no se recomienda cuando se realiza una resección de tejido óseo que se deba mantener, ya que no evita que el defecto se colapse (206, 216, 218). Las agujas de Kirschner presentan una clara ventaja frente a otras alternativas, debido a que es el implante más económico. Para solventar el inconveniente de la falta de estabilidad que proporcionan las agujas, han aparecido otros dispositivos creados específicamente para ser bloqueados a través de agujas o clavos modificados, de esta forma imitan los **clavos intramedulares** que se utilizan en humanos (213).

Otro dispositivo es el denominado **pin-clip**, desarrollado en 2008 por Menger y colaboradores (181, 182). La fijación del **pin-clip** para defectos femorales en ratones es una combinación de una aguja intramedular convencional con un clip transcortical personalizado, que se asemeja a una grapa para agregar estabilidad. El clip generalmente está hecho de una aguja hipodérmica roma o un pasador de acero sólido que se dobla en forma de U. Se requiere una pequeña broca para crear los orificios corticales a través de los cuales pasará el clip. La principal ventaja del **pin-clip** es la rigidez axial y rotacional mejorada, en comparación con otros dispositivos intramedulares. El inconveniente es que no es un dispositivo empleado en la práctica clínica (195).

Diferentes tipos de osteosíntesis se representan esquemáticamente en la figura 40 A.

La evolución de estos sistemas lleva al diseño de **dispositivos específicos** para pequeños roedores, como el LockingMouseNail® o el LockingRatNail®. Los dispositivos permiten realizar varios bloqueos, lo que confiere mayor estabilidad, además de asegurar el mantenimiento del defecto deseado. Como contrapartida, presentan un elevado coste económico en comparación con otros sistemas (195, 206).

Otro implante empleado para la fijación intramedular es el **tornillo intramedular roscado**. Mediante este método también se evitan problemas de colapso del defecto óseo o alteraciones rotacionales, puesto que la rosca del tornillo se bloquea en las corticales al rellenar el diámetro transversal de la diáfisis (179) (figura 40 B).

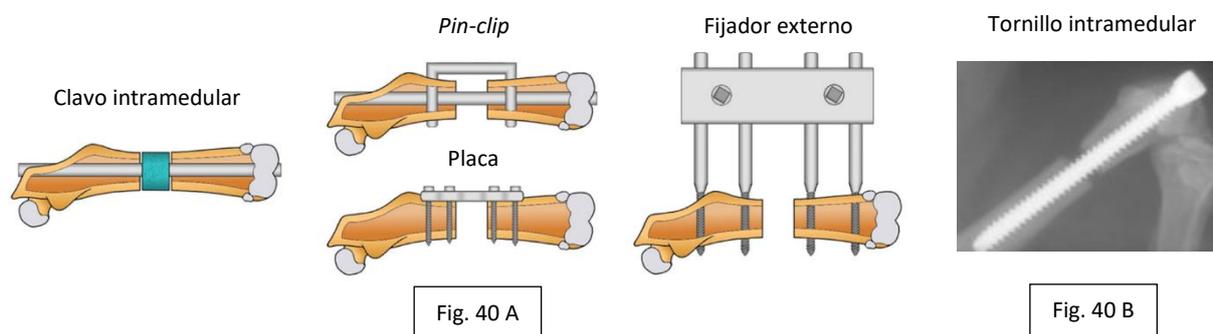


Figura 40 A-B. (A) Diversos tipos de osteosíntesis empleados en modelos murinos como el clavo intramedular, el sistema *pin-clip*, la placa o el fijador externo. Imagen adaptada de Gunderson 2020 (169). (B) Tornillo intramedular que mantiene el defecto creado. Imagen tomada de Pérez Núñez 2015 (179).

En nuestro modelo, decidimos emplear como método de osteosíntesis la fijación intramedular (figura 41). El estándar oro del tratamiento de las fracturas femorales en el humano es el enclavado intramedular, por lo que la similitud de síntesis con nuestro modelo y su posterior valoración, permiten extrapolar los resultados al ser una práctica habitual en la clínica. Debido a las dimensiones de la cavidad medular del ratón NOD/SCID, solo podía albergar un implante de tamaño reducido, por lo que se eligió una aguja de 27 G. Otros dispositivos de mayor diámetro, como clavos bloqueados o tornillos intramedulares, quedaban descartados por el pequeño calibre de la cavidad femoral. Al no tratarse de un sistema bloqueado, no se planteó la creación de un defecto óseo, dado que no impediría su colapso. Tal como se ha comentado, la aguja intramedular permite la compresión de la fractura con la carga, pero no controla la estabilidad rotacional. Para minimizar este inconveniente, la aguja se avanzó en la región trocantérea todo lo posible para evitar su migración y conferir cierta estabilidad. En este sentido, autores como Holstein realizan pequeñas modificaciones en la aguja como el aplanamiento de la punta y de la base, para simular un sistema bloqueado (219). En nuestro modelo experimental, conseguimos una osteosíntesis con estabilidad relativa en la que la inestabilidad rotacional no tuvo trascendencia clínica.

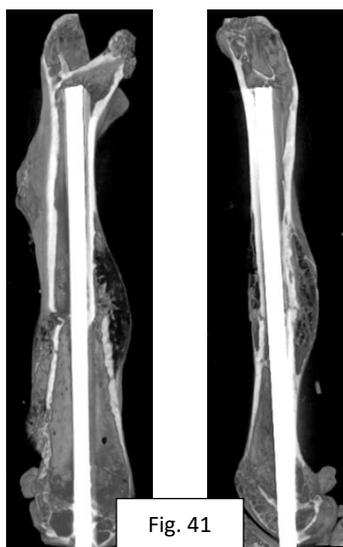


Figura 41. Ejemplo representativo de la estabilización intramedular con aguja 27 G realizada en nuestro modelo. Se trata de una fijación elástica y permite compresión de la fractura con la carga. Aunque la aguja se profundiza hasta la región trocantérea a modo de bloqueo, el foco es inestable rotacionalmente.

7.1.2.4 Métodos para alterar la consolidación

Debido a la elevada capacidad de consolidación que tiene este modelo murino, generalmente es preciso añadir a la osteotomía un gesto técnico que pueda ralentizar o impedir la consolidación. De esta forma podremos estudiar la influencia de los diversos tratamientos.

En la bibliografía se describen distintos métodos, el primero es la **creación de un defecto óseo segmentario** de tamaño variable, pero que básicamente se agrupan en dos tipos. Un defecto óseo menor (inferior a 3 mm) (220-224) y lo que se denomina un defecto óseo crítico, que varía de 3 a 8 mm (212, 225-227). El defecto óseo crítico puede definirse como la resección ósea mínima que impide que el hueso consolide de forma espontánea durante toda la vida del animal (228). De forma genérica, la bibliografía considera que el defecto debe ser de 1.5 a 3 veces el diámetro del hueso (225), oscilando de los 3 a los 8 mm en el caso de modelos murinos (157). Como se aprecia, este rango es amplio y los diversos autores no se ponen de acuerdo en dar una medida más precisa.

Como las osteotomías aisladas o las resecciones menores de 3 mm, no suelen impedir la consolidación ósea, es necesario asociar un efecto agresor que la dificulte. Se han publicado todo tipo de técnicas, entre las que incluimos la **interposición en el foco de fractura** de tejidos blandos como músculo (189), o diversos materiales extraños como silicona (183) o cemento acrílico (208, 229). También se puede **alterar el periostio**, mediante una desperiostización de los márgenes de la fractura (181, 196, 228) o con la ayuda de electrocauterio (176, 185, 191, 194, 230). Otra lesión consiste en el **daño endóstico** con una fresa medular (178, 231) o con otros instrumentos (209, 232). Finalmente, se puede realizar

una **eliminación del foco de fractura**, que puede conseguirse con la irrigación continua del hematoma fracturario (157, 192) o reintervención quirúrgica para eliminar el tejido reparativo (159, 193).

El elegir una técnica combinada de resección y daño del foco de fractura, o bien un defecto óseo crítico, es igualmente válido en función del efecto que se quiera conseguir. Por ejemplo, para establecer una pseudoartrosis atrófica con un gran defecto óseo, estaría indicado el modelo de defecto óseo crítico, en cambio, si pretendemos simular una pseudoartrosis postquirúrgica, estaría indicado un defecto de menor tamaño con lesión asociada del foco de fractura. El sistema de fijación adecuado se asocia al tipo de defecto, así, cuando se emplea un defecto óseo crítico, se elige un sistema de fijación más estable como son las placas. En el caso de los métodos combinados, la mayor parte de las veces se emplean sistemas intramedulares.

Pérez Núñez y colaboradores realizaron un defecto de 2 mm en el fémur de ratas Sprague Dawley que fue estabilizado con un tornillo intramedular de 2 x 24 mm. Si bien no se podría considerar estrictamente un defecto óseo crítico por el tamaño de la osteotomía de sustracción, según Poser (228), lograron reproducir una pseudoartrosis atrófica porque se impide el colapso del defecto debido al sistema de fijación. Al ser un tornillo roscado de diámetro lo suficientemente ancho para bloquear el canal medular, el defecto de 2 mm se mantuvo hasta la conclusión del estudio, a pesar de la carga del animal (179).

En nuestro modelo, la osteotomía se asoció a lesión del periostio mediante daño térmico por electrocauterización a 800º C. De esta manera, se pretendió retardar la consolidación para estudiar el efecto de la terapia con MSCs en la reparación de la fractura.

7.1.3 DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

Otro tema para debatir es la duración del experimento, dado que la capacidad de curación del ratón es innata y difícil de cambiar experimentalmente. La consolidación en estos animales suele adquirirse antes de la semana 12, por lo que para el estudio de los problemas de consolidación, se debería tomar como punto de referencia las semanas 12 a la 15 (157, 163). Revisando la bibliografía, podemos analizar que la duración de los estudios es muy variable, oscilando entre las 4 y 16 semanas (181, 182, 192, 209, 214, 233). Una vez sobrepasado el límite de un mes de evolución, la decisión de mantener el estudio más o menos tiempo depende del autor, en función de si se prefiere evaluar el efecto del tratamiento a corto o largo plazo.

Nosotros decidimos acortar el tiempo de estudio de 8 semanas, que era la previsión inicial, a 4 semanas. Observamos la rápida capacidad de consolidación del modelo, del mismo modo que queda reflejado previamente en diferentes estudios (157, 161).

7.2 TERAPIA CON MSCS Y CONSOLIDACIÓN EN MODELO EXPERIMENTAL

La capacidad de reparación de las MSCs se estudia con frecuencia en trasplantes realizados a animales. En una primera fase, se ha demostrado que estas células son capaces de formar hueso en vivo mediante su implantación en el tejido subcutáneo de ratones (23-236). Posteriormente, se ha estudiado el potencial regenerativo en diversos defectos óseos practicados a los animales de experimentación, como son los defectos craneales. A este respecto, son numerosos los trabajos que podemos encontrar, si bien es cierto que es un hueso que no está sometido a carga y en el que no se suele realizar una fijación ósea (143). Por estos dos motivos, son menos apropiados para el objeto de estudio presente en este trabajo.

Se ha revisado la bibliografía actual, seleccionando estudios experimentales similares al nuestro. Así, se han escogido animales murinos (ratón o rata) en los que se practicó un defecto óseo en la extremidad inferior, bien mediante una osteotomía completa de tamaño variable o un defecto óseo parcial. Posteriormente, se realizó una osteosíntesis o método de inmovilización variable. Elegimos los trabajos en los que se administró una terapia con MSCs, en algunos casos añadiendo una matriz osteoconductora, y se analizan las características y resultados.

En total se han registrado 32 estudios que cumplen con estas premisas. Encontramos más frecuentemente el empleo de ratas que de ratones (22 estudios frente a 10), en el que la rata predominante fue de la cepa Wistar o Sprague Dawley, mientras que en los ratones encontramos cepas variables. Solo hay un estudio que, al igual que el nuestro, empleó el ratón NOD/SCID. En ocasiones se pretendió realizar un modelo de osteoporosis, para ello se utilizaron hembras ovariectomizadas (237, 238). Otras veces, un modelo de diabetes mediante inducción con estreptozotocina (221, 239-241). O bien, otros modelos de fractura con alteración en la consolidación mediante la administración de nicotina, alcohol, quimioterapia o la realización de una sección medular (242-245).

Como en nuestro estudio se han empleado MSCs humanas, nos ha parecido interesante incluir el origen de las células. Solo en 4 de los 32 trabajos se emplearon MSCs humanas, 2 de ellos recolectadas tras cirugía de recambio protésico (220, 226), 1 de cresta ilíaca (241) y 1 con adquisición externa (246). Hay que puntualizar que la extracción de MSCs procedentes de la cresta ilíaca asocia una morbilidad del donante humano, que en el caso de la obtención durante la cirugía protésica de cadera (por fractura o coxartrosis) no ocurre. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los donantes. Cuando las MSCs se obtuvieron de los propios animales utilizados en la experimentación (25 trabajos), éstas se extrajeron de los fémures, o de fémures y tibias. En 3 casos se realizó una adquisición externa de las MSCs de origen murino.

Generalmente, previo a su administración, las MSCs requieren un procesamiento en el laboratorio, donde se expanden en cultivo y se suele realizar una diferenciación osteogénica. Lo habitual es utilizar las MSCs provenientes de la médula ósea, sin embargo, Zhu y col. realizaron un co-cultivo de las MSCs de la médula ósea con las obtenidas del hueso cortical, para lo que este último se cortó en gránulos de 3 x 3 mm, previo a su procesamiento (247).

A veces, se llevaron a cabo caracterizaciones celulares para expresar determinados factores que eran interesantes para el estudio en cuestión, como IL-10 (239), IGF-1 (223, 248), CXCL13 (221), Runx2 (246) o mir-21 (249).

Este cultivo celular se puede administrar de forma aislada, pero en otras ocasiones se asocia a una matriz osteoconductora o *scaffold*. Este soporte tiene la función de retener las células, a la vez que pueden aportar diversos factores que estimulen la capacidad fisiológica de las MSCs y ayuden a la consolidación.

En 19 de los estudios, las MSCs se administraron de forma aislada sin matriz osteoconductora. Generalmente se añadió suero salino fisiológico, debido a que facilita su inyección. En 2 de estos trabajos, el cultivo celular se realizó en forma de hoja celular bidimensional. Esto permitió su aplicación local en el foco de fractura de forma circunferencial a modo de envoltura (222, 250). En otro caso se emplearon esferoides celulares tridimensionales (220).

Son 13 los estudios en los que se utilizó una matriz osteoconductora, siendo la más empleada el gel de fibrina (220, 237, 244, 251, 252). Otros productos son el colágeno (242, 253), gránulos de mineral óseo esponjoso (226), PLGA (227), chitosán (254), DBM (223) u otros compuestos diseñados específicamente (238, 255).

En otras ocasiones, se emplearon tratamientos añadidos para estimular la consolidación como BMP-7 (226), cordicepina (256), nanopartículas de plata (253) o terapia con ultrasonidos tipo LIPUS (257).

La vía de administración de las células también es otro apartado para analizar con detalle, sobre todo, porque uno de los objetivos de nuestro trabajo era comparar dos vías de administración. La administración local en el foco de fractura fue elegida mayoritariamente en los trabajos valorados, utilizándose en 23 de ellos como única vía de administración, mientras que la administración sistémica se empleó en 6 trabajos. Esta última, se puede realizar en forma de inyección intravenosa a través de la vena de la cola (243, 246, 248, 258), inyección intracardiaca (257) e inyección intraperitoneal (255). Únicamente 3 trabajos realizaron el diseño experimental con grupos en los que se compararon diferentes vías de administración. Son los estudios de Huang y col., con dos trabajos en los que compararon la administración local con la inyección intracardiaca (224, 259); y Tanriverdi y col., que compararon la inyección intravenosa con la inyección intraperitoneal (260).

Con relación al momento de administración de la terapia celular, observamos que, en la administración local, lo habitual fue la aplicación de las células en el momento de la creación de la fractura (17 estudios de 25). Cuando se realizó con posterioridad, el tiempo de administración varió de 6 horas a 4 días, según los diferentes autores. Incluso encontramos un caso extremo en el que Mir y col. las administraron a las 8 semanas, una vez establecida la pseudoartrosis (261).

Los tiempos de administración son variables en la administración sistémica y no siguen una tendencia. Varían desde la inyección en el mismo día de la fractura hasta el día 14. Nos parece interesante comentar que Wang y col. estudiaron el momento óptimo de la inyección intravenosa comparando diferentes momentos de administración (día 1, día 7, día 14) (258). La inyección intracardiaca se practicó al tercer (257) o cuarto día (224, 259), mientras que la inyección intraperitoneal se administró el mismo día (255), o a las 36 horas y 5 días (260).

En cuanto al método de realización de la fractura o defecto óseo, encontramos que se ejecutó de forma abierta en 22 trabajos y de forma cerrada en 10. El segmento óseo preferido fue el fémur frente a la tibia. 18 trabajos eligieron el fémur frente a 4 que eligieron la tibia, si el método era abierto; y 7 trabajos eligieron el fémur frente a 3 que eligieron la tibia, si el método era cerrado. En general, se escogió la lateralidad derecha frente a la izquierda y existen 4 trabajos en los que el estudio se realizó de forma bilateral (223, 237, 250, 260).

En las formas abiertas, el defecto óseo para estudiar el beneficio de las MSCs puede ser parcial o completo. Cuando era parcial, la herramienta preferida fue una pequeña fresa y el defecto osciló de 2 a 5 mm (5 trabajos), pero generalmente se realizaron osteotomías completas del segmento óseo (17 trabajos). Éstas últimas podían ser de tamaño variable, predominando defectos óseos menores, de 0 a 2 mm (15 trabajos); frente a defectos óseos críticos, de 6 a 15 mm (2 trabajos).

En algunos casos se añadió algún tipo de lesión para alterar la consolidación, como la agresión del periostio mediante su extirpación (227, 250) o cauterización (249); en otras ocasiones se lesionó tanto el periostio como el endostio (222, 252). Como se aprecia, son proporcionalmente pocos los trabajos donde se añadió este gesto adicional (5 de 32 trabajos).

El instrumento empleado para la ejecución de la fractura o defecto óseo fue también variable. En los métodos abiertos se prefirió la sierra motorizada o la fresa, frente a la sierra manual u otras herramientas; mientras que, en los métodos cerrados, casi siempre se empleó una herramienta de flexión de tres puntos similar a la ideada por Einhorn.

En 6 estudios no se realizó inmovilización de la fractura, bien es cierto que 5 de ellos corresponden con la realización de defectos parciales, por lo que no sería estrictamente necesario. En 3 trabajos se empleó la férula o escayola.

Cuando el tratamiento fue la osteosíntesis, el dispositivo mayormente utilizado fue la aguja intramedular (16 estudios), seguido de fijador externo (4 estudios) y placa (3 estudios).

Encontramos gran variabilidad en el tiempo de estudio, con un rango que osciló entre las 2 y las 16 semanas, aunque parece existir cierta preferencia por concluir los estudios entre las 4 y 8 semanas.

La evaluación de la consolidación se realizó mediante estudio radiológico, histológico y, en algunos casos, biomecánico. El estudio radiológico casi siempre se realizó mediante micro-TC y/o radiología simple. Para el estudio histológico, la tinción más utilizada fue la hematoxilina-eosina. Las escalas empleadas para la valoración del estudio radiológico o histológico no son homogéneas. En ciertos trabajos, la consolidación también se evaluó mediante estudio biomecánico (11 de 32 trabajos).

En general, los resultados son positivos a la hora de evaluar la eficacia del tratamiento con MSCs. No obstante, encontramos gran heterogeneidad en los estudios experimentales, lo que hace muy complicada su comparación. Algunos emplean la adición de una matriz osteoconductora que podría influir en la consolidación, otros realizan modificaciones celulares para la sobreexpresión de determinados factores, otros autores realizan cultivos bi o tridimensionales, o se añaden otras terapias. Además, el modelo animal puede variar y, en ciertas ocasiones, se escogen modelos de osteoporosis, diabetes u otros modelos con retardo de consolidación. Generalmente, en todos los estudios se realiza la comparación entre grupos de experimentación probando diferentes terapias, pero no siempre incluyen un grupo control en el que no se realice ningún tratamiento. Por todo lo anteriormente expuesto, resulta difícil encontrar estudios homogéneos para poder estandarizar y comparar los resultados, tanto de los estudios analizados entre sí como con nuestros resultados.

De los trabajos seleccionados, únicamente dos autores no encontraron mejoría después del tratamiento con MSCs. Son los trabajos de Findeisen (220), que empleó MSCs humanas en gel de fibrina; y Watson (262), que empleó MSCs humanas sin la asociación de matriz osteoconductora. Este último autor, además, objetivó que el implante de MSCs humanas no alteraba la respuesta inmunitaria, pero habría que continuar en la investigación para ver cómo los fenómenos inmunitarios influyen en el trasplante de células heterólogas. Independientemente de estos factores, el número de trabajos que utilizaron MSCs humanas es muy pequeño para poder establecer conclusiones, solo 4 (220, 226, 241, 246) de los 32 revisados.

En la tabla 27 se resumen los 32 estudios analizados que cumplen con las características seleccionadas.

Discusión

Estudio	Modelo animal	Origen MSCs	Matriz osteo-conductora	Otros tratamientos	Vía de administración	Modelo de fractura	Tipo de osteosíntesis	Tiempo de estudio	Análisis de la consolidación	Resultado de la consolidación
Burastero y col. (2010) (226)	20 ratas atímicas macho	Humano cirugía PTC (acetábulo)	Gránulos de mineral óseo esponjoso (ORTHOS®)	BMP-7	Local mismo día	Abierta Fémur D Osteotomía de 6 mm	Placa PMMA con cerclajes de alambre	16 sem	Rx Micro-TC AP (azul de toluidina)	Mejor consolidación MSCs + BMP-7 que MSCs o BPM-7 solas
Cassaró y col. (2019) (251)	80 ratas Wistar macho	Rata fémur y tibia	Biopolímero de fibrina (CEVAP®)	NO	Local mismo día	Abierta Fémur D Defecto parcial de 5 mm Fresa dental	NO	60 días	Micro-TC AP (H.E.)	Mejor consolidación MSCs + fibrina que MSCs + fibrina + fosfato cálcico, fibrina + fosfato cálcico, fosfato cálcico, control
Cheung y col. (2013) (257)	60 ratas Sprague Dawley hembra	Rata adquiridas	NO	LIPUS	Intracardiaca a los 3 días	Cerrada Fémur D Flex. 3 puntos	Aguja i.m. 18 G	4 sem	Rx Micro-TC AP (H.E.)	Mejor consolidación MSCs + LIPUS que MSCs o control
Cui y col. (2020) (239)	Ratones Balb/c con diabetes inducida macho	Ratón fémur y tibia	NO	Sobreexpresión IL-10	Local mismo día	Cerrada Fémur Flex. 3 puntos	Aguja i.m. 30 G	3 sem	AP (azul alcían, naranja G) Biomecánico	MSCs con sobreexpresión de IL-10 acelera la consolidación
Findeisen y col. (2021) (220)	26 ratones NOD/SCID <i>nude</i> macho	Humano cirugía PTC	Gel de fibrina (TISSEL®)	Esferoides celulares o suspensiones celulares simples	Local mismo día	Abierta Fémur D Osteotomía de 2 mm Sierra de Gigli	Fijador externo	6 sem	Micro-TC AP (H.E., fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida tartrato resistente)	Esferoides son comparables a suspensiones celulares (salvo mayor densidad mineral en esferoides). Ninguno de los dos es capaz de consolidar el defecto
Granero-Moltó y col. (2011) (248)	Ratón <i>knockout</i> <i>Irs^{-/-}</i> hembra	Ratón fémur y tibia	NO	MSCs que expresan IGF-1	Intravenosa vena de la cola el mismo día	Cerrada Tibia Flex. 3 puntos	Aguja i.m.	2 sem	Micro-TC AP (safranina O / verde rápido) Biomecánico	MSCs con expresión IGF-1 mejora todos los parámetros de consolidación

Discusión

Estudio	Modelo animal	Origen MSCs	Matriz osteo-conductora	Otros tratamientos	Vía de administración	Modelo de fractura	Tipo de osteosíntesis	Tiempo de estudio	Análisis de la consolidación	Resultado de la consolidación
Hao y col. (2016) (252)	36 ratas Lewis macho	Rata fémur y tibia	Fibrina (LICANGRUI BIOTECH*)	NO	Local mismo día	Abierta Fémur D Osteotomía Cauterización periostio y lesión endostio Sierra manual	Fijador externo	8 sem	Rx AP (H.E.) Biomecánico	MSCs + fibrina promueven la consolidación
Harada y col. (2014) (227)	122 ratas Fischer macho	Rata fémur y tibia	PLGA (TAKI CHEMICAL*)	NO	Local mismo día	Abierta Fémur I Osteotomía de 5 mm / 15 mm Extirpación periostio Fresa dental	Fijador externo	16 sem	Rx Micro-TC AP (H.E., azul alcian, fosfatasa ácida tartrato resistente) Biomecánico	Consolidación completa en todos los animales
Hejazi y col. (2021) (238)	24 ratas Wistar ovariectomizadas hembra	Rata fémur	3D elastina / policaprolactona / hidroxiapatita	NO	Local mismo día	Abierta Fémur D Defecto parcial Fresa dental	NO	4 sem	Micro-TC AP (H.E. y tricrómico Masson)	MSCs + matriz mejoran la regeneración de la fractura y aceleran la consolidación ósea
Huang y col. (2015) (224)	30 ratones FVB macho	Ratón fémur y tibia	NO	NO	Local a los 4 días / Intracardiaca a los 4 días	Abierta Fémur I Osteotomía Sierra manual	Aguja i.m. 23 G	5 sem	Micro-TC Biomecánico	MSCs promueven la consolidación ósea, sin diferencias en la vía de administración
Huang y col. (2015) (259)	48 ratas Sprague Dawley macho	Ratón fémur	NO	NO	Local a los 4 días / Intracardiaca a los 4 días	Cerrada Fémur D Flex. 3 puntos	Aguja i.m. 18 G	5 sem	Rx Micro-TC AP (H.E.) Biomecánico	MSCs promueven la consolidación ósea, sin diferencias en la vía de administración
Jiang y col. (2018) (221)	72 ratas Wistar con diabetes inducida macho	Rata fémur	NO	Sobreexpresión CXCL13	Local a los 3 días	Abierta Tibia I Osteotomía Sierra	Férula	6 sem	Micro-TC AP (H.E.)	MSCs con sobreexpresión CXCL13 promueve la diferenciación y mejora la consolidación

Discusión

Estudio	Modelo animal	Origen MSCs	Matriz osteo-conductora	Otros tratamientos	Vía de administración	Modelo de fractura	Tipo de osteosíntesis	Tiempo de estudio	Análisis de la consolidación	Resultado de la consolidación
Kang y col. (2013) (246)	48 ratones Balb/c/nu/nu macho	Humano adquiridas	NO	MSCs transducidas con Runx2	Intravenosa vena de la cola a las 24 horas	Abierta Fémur I Osteotomía Tijera	Aguja i.m. 23 G	4 sem	AP (H.E. y tricrómico de Masson)	Tanto MSCs control como MSCs transducidas con Runx2 llegan a la fractura, pero las MSCs transducidas con Runx2 forman mejor callo
Lee y col. (2005) (244)	36 ratas Wistar tratadas con quimioterapia macho	Rata fémur	Gel de fibrina (TISSEL®)	NO	Local mismo día	Abierta Fémur I Osteotomía de 1.5 mm	Fijador externo	5 sem	Rx DEXA AP (azul de toluidina)	Ratas tratadas con quimioterapia consolidan similar a ratas controles si se administra MSCs + fibrina
Lei y col. (2013) (245)	48 ratas Sprague Dawley con sección medular macho	Rata fémur	NO	NO	Local a los 2 días	Abierta Tibia I Osteotomía Fórceps	Aguja i.m. + escayola Descarga	4 sem	Rx Micro-TC AP (H.E. y fosfatasa alcalina)	MSCs tienen un efecto positivo en la consolidación de ratas con sección medular
Li y col. (2019) (255)	20 ratas Sprague Dawley macho	Rata fémur y tibia	Nanocompuesto poroso Se@SiO ₂	NO	Intraperitoneal el mismo día	Abierta Fémur Osteotomía Sierra	Aguja i.m. 1.1 mm	6 sem	Rx Micro-TC	MSCs + Se@SiO ₂ mejora la consolidación
Li y col. (2020) (256)	Ratas Sprague Dawley macho	Rata fémur	NO	MSCs tratadas con cordicepina	Local a los 4 días	Cerrada Fémur D Flex. 3 puntos	Aguja i.m. 1.2 mm	4 sem	DEXA Micro-TC AP (H.E.) Biomecánico	Cordicepina promueve la osteogénesis y acelera la consolidación
Mir y col. (2015) (261)	20 ratas Sprague Dawley macho	Rata fémur	NO	NO	Local a las 8 sem	Abierta Fémur Osteotomía Cauterización periostio	Aguja i.m. 1 mm	8 sem	Rx AP (H.E.)	Consolidación completa

Discusión

Estudio	Modelo animal	Origen MSCs	Matriz osteo-conductora	Otros tratamientos	Vía de administración	Modelo de fractura	Tipo de osteosíntesis	Tiempo de estudio	Análisis de la consolidación	Resultado de la consolidación
Nakamura y col. (2010) (250)	28 ratas Fischer macho	Rata fémur	NO	Hoja celular bidimensional	Local mismo día	Abierta Fémur bilateral Osteotomía Extirpación periostio Sierra oscilante	Aguja i.m. 21 G	8 sem	Rx Ecografía AP (H.E.) Biomecánico	Consolidación 96 %
Obermeyer y col. (2012) (243)	Ratones C57BL/6 con exposición al alcohol macho	Ratón fémur	NO	NO	Intravenosa vena de la cola a las 24 horas	Cerrada Tibia Flex. 3 puntos	Aguja i.m. 0.2 mm	2 sem	Micro-TC AP (H.E.) Biomecánico	MSCs mejoran la consolidación
Orsi y col. (2017) (237)	80 ratas Wistar ovariectomizadas hembra	Rata fémur	Fibrina heteróloga derivada de serpiente	NO	Local mismo día	Abierta Fémur distal bilateral Defecto parcial de 5 mm Micromotor	NO	4 sem	Rx Micro-TC AP (H.E.)	MSCs + fibrina mejoran la consolidación respecto a grupo de no tratamiento. Consolidación similar en ratas osteoporóticas y no osteoporóticas
Rady y col. (2018) (254)	36 ratas Wistar macho	Rata fémur	Chitosán	NO	Local mismo día	Abierta Tibia Defecto parcial de 3 mm Fresa	NO	3 sem	SEM/EDX	MSCs + chitosán mejor consolidación que fibrina rica en plaquetas
Riahi y col. (2019) (242)	24 ratas Wistar con administración de nicotina macho	Rata fémur y tibia	Colágeno tipo I de la cola de la rata	NO	Local mismo día	Abierta Fémur D Defecto parcial de 2 mm Trefina	NO	4 sem	Rx AP (H.E.)	La consolidación con MSCs es peor en las ratas con administración de nicotina
Shimizu y col. (2015) (222)	60 ratas <i>inbred</i> Fischer 344 macho	Rata fémur	NO	Hoja celular bidimensional	Local a las 6 horas	Abierta Fémur Osteotomía Extirpación periostio y lesión endostio Sierra oscilante	Aguja i.m. 0.8 mm	12 sem	Rx Micro-TC AP (H.E. y azul de toluidina) Biomecánico	MSCs mejoran la regeneración ósea

Discusión

Estudio	Modelo animal	Origen MSCs	Matriz osteo-conductora	Otros tratamientos	Vía de administración	Modelo de fractura	Tipo de osteosíntesis	Tiempo de estudio	Análisis de la consolidación	Resultado de la consolidación
Sun y col. (2015) (249)	18 ratas Sprague Dawley macho	Rata fémur	NO	Sobreexpresión mir-21	Local mismo día	Cerrada Fémur D Flex. 3 puntos	Aguja i.m. 18 G	5 sem	Micro-TC AP (H.E. y safranina) Biomecánico	MSCs con sobreexpresión mir-21 promueve la osteogénesis y acelera la consolidación ósea
Tanriverdi y col. (2019) (260)	56 ratas Wistar politraumatizadas (extirpación lóbulo hepático ± fracturas tibiales)	Rata fémur y tibia	NO	NO	Intravenosa / Intraperitoneal a las 36 horas y 5 días	Cerrada Tibia y peroné bilateral	NO	3 sem	AP (H.E.)	Grupos tratados con MSCs tienen mejor consolidación ósea y la inflamación del hígado y hueso es menor
Wang y col. (2018) (258)	126 ratones C57BL/6 macho	Ratón adquiridas	NO	NO	Intravenosa vena de la cola a los 1, 7, 14 días	Cerrada Fémur D Flex. 3 puntos	Aguja i.m. 0.5 mm	6 sem	Micro-TC AP (H.E. y tricrómico de Masson) Biomecánico	La inyección al 7 día es la óptima. Llegan más células a la fractura y permanecen más tiempo, mejor consolidación
Watson y col. (2020) (241)	27 ratones C57BL/6 con diabetes inducida macho	Humano cresta ilíaca	NO	NO	Local a los 2 días	Cerrada Fémur Flex. 3 puntos	Aguja i.m. 27 G	8 sem	Micro-TC Biomecánico	El tratamiento con MSCs no aumenta la consolidación. El implante de MSCs humanas no altera la respuesta inmunitaria
Xing y col. (2014) (223)	36 ratones FVB hembra	Ratón fémur	DBM	NO	Local mismo día	Abierta Fémur bilateral Osteotomía de 2 mm Fresa dental	Placa con cerclajes de alambre	8 sem	Rx Micro-TC AP (H.E.)	MSCs + DBM aceleran la reparación ósea
Xing y col. (2015) (240)	60 ratas Wistar con diabetes inducida macho	Rata fémur y tibia	NO	MSCs que expresan IGF-1	Local mismo día	Abierta Tibia D Osteotomía Sierra	Escayola	7 sem	AP (H.E.)	MSCs con expresión IGF-1 promueven la consolidación

Discusión

Estudio	Modelo animal	Origen MSCs	Matriz osteo-conductora	Otros tratamientos	Vía de administración	Modelo de fractura	Tipo de osteosíntesis	Tiempo de estudio	Análisis de la consolidación	Resultado de la consolidación
Zhang y col. (2015) (253)	Ratones C57BL/6	Ratón adquiridas	Colágeno con nanopartículas de plata encapsuladas	NO	Local mismo día	Abierta Fémur Osteotomía de 1.2 mm Sierra de Gigli	Placa	3 sem	Rx AP (H.E.)	Nanopartículas de plata inducen la diferenciación osteogénica de las MSCs y promueven la consolidación
Zhu y col. (2019) (247)	18 ratas Sprague Dawley macho	Rata fémur y tibia	NO	Co-cultivo de hueso cortical y médula ósea	Local mismo día	Abierta Tibia Osteotomía Abrazadera de alambre	Escayola	6 sem	Micro-TC AP (H.E.)	Co-cultivo de hueso y médula ósea mejoran la proliferación, diferenciación osteogénica y consolidación de la fractura, comparado con MSCs únicamente de médula ósea

Tabla 27. Relación de estudios experimentales en modelos murinos en los que se emplea terapia con MSCs para el tratamiento de la consolidación ósea.

PTC prótesis total de cadera, **BMP-7** proteína morfogenética ósea-7, **PMMA** polimetilmetacrilato, **micro-TC** microtomografía computarizada, **AP** anatomía patológica, **H.E.** hematoxilina-eosina, **LIPUS** ultrasonido pulsado de baja intensidad, **i.m.** intramedular, **Balb/c** cepa de ratón, **IL-10** interleuquina-10, **NOD/SCID nude** cepa de ratón, **Knock out Irs^{-/-}** ratón con modificación génica del sustrato del receptor de insulina, **IGF-1** factor de crecimiento similar a la insulina-1, **PLGA** ácido poliláctico poliglicólico, ratón FVB cepa de ratón albino endogámico que lleva el nombre de su susceptibilidad al virus de la leucemia B de Friend, **CXCL13** ligando 13 de la quimioquina CXC que es quimiotáctica para linfocitos B, **Runx2** gen regulador de la formación ósea, **DEXA** absorciometría de rayos X de energía dual, **C57BL/6** cepa endogámica de ratón, **SEM/EDX** microscopio óptico de barrido / rayos X de energía dispersiva, **inbred** endogámico, **mir-21** oncomicro-ARN, **DBM** matriz ósea desmineralizada.

7.3 TERAPIA CON MSCs EN NUESTRO MODELO EXPERIMENTAL

7.3.1 GENERALIDADES DEL TRATAMIENTO CON MSCs PARA LA CONSOLIDACIÓN

Las células madre mesenquimales exhiben una alta capacidad de autorrenovación, potencial de diferenciación multilineaje y propiedades inmunomoduladoras. Este conjunto de características excepcionales las convierte en una herramienta atractiva para la investigación y la aplicación clínica. Sin embargo, las MSCs están lejos de ser un tipo de célula uniforme, lo que dificulta la estandarización de los tratamientos. Las propiedades exactas de estas células pueden variar mucho dependiendo de múltiples parámetros, incluida la fuente de tejido, el método de aislamiento o la composición del medio de cultivo. Todo ello va a influir en la expansión y diferenciación de las MSCs (263).

Son varios los tejidos que pueden ser fuente de células madre mesenquimales. Aunque el tejido por excelencia continúa siendo la médula ósea, la morbilidad de su recolección junto con el bajo rendimiento de aislamiento celular de esta localización, ha fomentado la búsqueda de fuentes de tejido adicionales. De hecho, han ganado popularidad las células madre derivadas de tejido adiposo (114, 115, 264), que se pueden aislar fácilmente de la fracción vascular estromal del tejido hipodérmico obtenido mediante liposucción (265). Aquí, el rendimiento es mayor que en el aislamiento óseo, porque el porcentaje de MSCs en la fracción estromal es del 2 %, mientras que en la médula ósea es del 0.3 % (266).

La diferenciación celular está regulada por diversos factores químicos, biológicos, físicos y ambientales. Hay unos factores de transcripción críticos para la diferenciación de adipocitos (267), mientras que las señales Runx2 y Osx son los reguladores maestros de la osteogénesis (268). Parece ser que las MSCs derivadas de médula ósea están relativamente predisuestas a diferenciarse hacia el fenotipo osteoblástico, de modo que la osteogénesis implica la activación de potenciadores preestablecidos, mientras que la adipogénesis es impulsada por otros cambios (269). Esto está en línea con observaciones previas sobre la tendencia de las MSCs cultivadas *in vitro* a diferenciarse espontáneamente hacia un fenotipo osteoblástico (270), lo que indica que, *a priori*, las MSCs derivadas de tejido óseo son las más adecuadas para la terapia de regeneración ósea.

Es difícil comparar la efectividad de las MSCs según la fuente de obtención, ósea u otras, entre las que se encuentra la adiposa. En estudios de revisión, como el realizado por Fu y col. en 2021, no se encuentra una diferencia significativa entre las diferentes fuentes, pero este resultado debe tomarse con precaución debido a la alta heterogeneidad y a que el número de estudios es pequeño (271).

Se ha estudiado el potencial regenerativo de las MSCs en diversos campos como la diabetes, enfermedad de Crohn, cicatrización de heridas, cirrosis hepática y otras enfermedades (264).

En lo que respecta a la regeneración ósea, se ha probado su eficacia en modelos preclínicos, más frecuentemente en defectos craneales y craneofaciales de tamaño crítico (272). Pero el estudio de la regeneración ósea en pseudoartrosis o retardo de consolidación sigue siendo más limitado e inconsistente, por lo que todavía existen algunos pasos críticos que dificultan su traslación a la clínica.

En nuestro caso, las MSCs son de origen óseo humano, obtenidas de las cabezas femorales de pacientes sometidos a cirugía protésica de cadera, tanto de fracturas osteoporóticas como de coxartrosis. Esto no supone morbilidad añadida para el donante, como sí podría ser su recolección mediante aspirado de cresta ilíaca. Independientemente de ello, se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los donantes. No nos planteamos un trasplante autólogo de los animales, es decir, recolección de MSCs del propio tejido óseo del ratón. Es una práctica habitual en nuestro grupo investigador, el empleo de las cabezas y cuellos femorales extirpados de estas cirugías para diversos estudios con células mesenquimales, ya sea para temas relacionados con la osteoporosis o de regeneración ósea, por lo que se dispone de gran experiencia (146, 234, 273-275).

Debido a que las MSCs en la médula ósea se encuentran en escasa proporción, la expansión *ex vivo* es necesaria para obtener dosis clínicamente trasplantables. El número de pases de cultivo requiere una estandarización (236, 271) y, aunque este número es variable cuando se revisa la bibliografía, es recomendable utilizar las células de los primeros pases. Está demostrado que las MSCs con un alto número de pases entran en senescencia y comienzan a perder sus características de células madre, como las capacidades de proliferación y diferenciación (92, 276).

En cuanto a la suplementación en medios de cultivo, se suele usar suero bovino fetal (SBF), aunque los suplementos de origen humano podrían superar algunas desventajas generales. Por una parte, superan la eficiencia de expansión de MSCs, aunque los resultados son contradictorios con respecto a la diferenciación celular. En otros casos se usan medios de cultivo libres definidos, con formulaciones que se modifican para mejorar la expresión de genes específicos y poder lograr un perfil óptimo (263).

Las MSCs son consideradas un medicamento de terapia avanzada por la Comisión Europea (277), por tanto, deben producirse de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (GMP o *good manufacture practices*). Es por esta razón por la que se han desarrollado protocolos seguros, robustos y compatibles con estas directrices para el aislamiento y la expansión a gran escala de MSCs (278).

En nuestro caso, el aislamiento de MSCs se realizó por medio de centrifugación por gradiente de densidad; la selección, mediante adherencia a la superficie de cultivo. Los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo establecido y optimizado de trabajos previos del

grupo (146, 234). El rendimiento de las MSCs obtenidas por este sistema fue similar a los trabajos publicados.

También se puede emplear el trasplante alogénico de MSCs. Las células criopreservadas, ciertamente se pueden usar, ya que la preservación y la descongelación no influyen en el crecimiento y la diferenciación osteogénica (220). No obstante, se han revelado desventajas, como la dificultad de mantener las funciones celulares o la unión a las células huésped, su baja tasa de supervivencia durante el trasplante, aparte de los posibles efectos adversos de los crioprotectores (236).

La dosis celular óptima aún no está clara. La mayor parte de estudios en animales utilizan concentraciones de 6.25×10^4 /kg a 4×10^8 /kg. Sin embargo, no en todos los trabajos queda reflejado el peso corporal del animal de experimentación, muchas veces solo se registra el número total de células trasplantadas (271). Consideramos que es necesario mostrar el peso de los animales para proporcionar referencias para la aplicación clínica. Si bien se podría esperar que un mayor número de células condujera a una mayor formación ósea, esto no se ha demostrado (279). La implantación de un número pequeño de células produciría una consolidación ósea inadecuada, mientras que la implantación de más células de las requeridas resultaría en un desperdicio celular y tiempos de expansión *in vitro* más prolongados. Por el momento, la dosificación celular en estudios clínicos se basa en el peso de los pacientes, generalmente 1×10^5 /kg y no más de 1.2×10^6 /kg (271).

En nuestro caso, la dosis, independientemente de la vía de administración, fue de 10^6 células en 0.1 ml de suero salino. Es decir, como el peso de cada ratón NOD/SCID osciló de 24 a 28 gramos, corresponde aproximadamente a $3.8 \text{ células} \times 10^7$ /kg del animal. No se realizó un ajuste más exhaustivo por peso. Observamos que la dosis se encuentra dentro del rango óptimo que refleja la bibliografía.

Todavía hay pocos estudios clínicos hasta la fecha y esto es llamativo a pesar de los esperanzadores resultados obtenidos en los estudios preclínicos. En todo esto influyen las limitaciones impuestas por los marcos regulatorios de cada país.

Las células madre mesenquimales tienen un modo de acción que implica un fuerte componente paracrino, dado que son capaces de secretar altos niveles de factores de crecimiento y citoquinas, este conjunto de factores secretados se denomina secretoma. De esta manera, se podría usar el secretoma en vez de las MSCs, lo que conllevaría varias ventajas para el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa (143).

El secretoma incluye las vesículas extracelulares liberadas por las MSCs. Con base en su biogénesis, diámetro y marcadores moleculares, las partículas liberadas por las células se han clasificado en: exosomas derivados de endosomas (30-150 nm), microvesículas derivadas de la membrana plasmática (100-1,000 nm) (también conocidas como micropartículas o ectosomas) y cuerpos apoptóticos (1,000-3,000 nm) (263, 280). En general, el término de

“vesículas extracelulares” incluye tanto a las microvesículas como a los exosomas, aunque muchas veces se emplea indistintamente el término “vesículas extracelulares” o “exosomas”.

Las vesículas extracelulares contienen diferentes tipos de biomoléculas, como microARN (miRNA), ARN interferente corto (siRNA), ARN largo no codificante (lnRNA), proteínas, lípidos y otras moléculas biológicamente activas como citoquinas (280, 281). Estas nanopartículas estimulan la reparación ósea a través de la inducción de la diferenciación y la proliferación de osteoblastos, la inhibición de la apoptosis, la promoción de la angiogénesis y la regulación inmune (272, 282).

Estas sustancias secretadas por las MSCs presentan ciertas ventajas y es que no precisan tan alta inversión de capital como las terapias celulares, con costosas técnicas de cultivo celular, ni tienen los complicados problemas de seguridad y gestión de calidad (118, 272, 281). Además, como las proteínas principales del complejo de histocompatibilidad no se expresan en la superficie, los exosomas se pueden usar con seguridad para la terapia de trasplante, al no mostrar problemas de rechazo (204, 283, 284). Una ventaja del secretoma producido por las MSCs del tejido adiposo, es que no se ve afectado por la edad del donante, contrariamente a lo que ocurre con las MSCs óseas (285).

Yi en 2022 y Tan en 2020, realizaron sendas revisiones sistemáticas de los estudios preclínicos existentes en animales, demostrando la efectividad de los exosomas para la regeneración ósea. Los hallazgos obtenidos apoyan la base para la traducción clínica y se espera que la investigación generalizada de estas vesículas extracelulares, así como las regulaciones menos estrictas que precisarían estas terapias libres de células, impulsen su uso clínico en el futuro (286, 287).

Aunque la terapia celular con MSCs o bien mediante su secretoma, tiene un futuro prometedor, los mecanismos exactos de acción siguen sin estar claros. Se han obtenido resultados clínicos alentadores, aunque el número de estudios es todavía limitado. La dosis exacta y la vía de aplicación aún no se han optimizado, adicionalmente, el destino de las células trasplantadas y sus mecanismos de acción deben controlarse mejor en ensayos clínicos más grandes. Sobre esta base, todavía hay que superar diversos obstáculos, como las preocupaciones éticas en el caso de trasplante celular, la evaluación fenotípica y molecular adecuada de los productos de células madre, la expansión *ex vivo* laboriosa y costosa, el posible rechazo inmunológico, aparte de otras dificultades traslacionales (116).

7.3.2 ORIGEN DE LAS MSCs

En este trabajo se emplearon células mesenquimales humanas para estudiar la consolidación en modelo de ratón NOD/SCID, es decir, se realizó un trasplante alogénico. La recolección de células humanas se realizó a partir de las cabezas y cuellos femorales extirpados de pacientes

sometidos a cirugía protésica de cadera, diferenciando dos patologías, fractura osteoporótica y artrosis de cadera. Se comparó la eficacia de la consolidación en función de este origen y si la osteoporosis, como enfermedad metabólica ósea, influyó negativamente en la efectividad de las MSCs. Se compararon con MSCs cultivadas de pacientes con artrosis, puesto que por cuestiones éticas no dispusimos de MSCs de individuos sanos. Constituyeron nuestro grupo control. En la bibliografía existen estudios experimentales en los que el origen de las MSCs también es humano procedente de las cabezas femorales artrósicas tras las sustitución protésica, reportando que tienen sus propiedades conservadas (220, 226).

7.3.2.1 MSCs humanas de pacientes con fractura osteoporótica

Se estudia la influencia de la osteoporosis en la funcionalidad de las MSCs, pero también la edad, como factor aislado, afecta a la cantidad y efectividad de los precursores mesenquimales. Generalmente, la osteoporosis y la edad avanzada o el envejecimiento del individuo van de la mano, aunque no siempre la edad conlleva la aparición de osteoporosis. Debido a esta asociación, sería difícil asignar qué papel independiente tiene cada uno de estos factores. Efectivamente, en nuestro trabajo, el grupo de donantes de MSCs de fractura osteoporótica de cadera era de mayor edad media que el grupo de donantes de MSCs de artrosis de cadera. También se valora la influencia que tiene el acontecimiento de la fractura en el inicio de la cascada de la consolidación y, por tanto, en la estimulación de las MSCs.

Influencia de la osteoporosis en las MSCs

La osteoporosis es un trastorno óseo prevalente que se caracteriza por una baja densidad mineral ósea. Esto es debido a un desequilibrio en el proceso de remodelación ósea, en el que predomina la actividad osteoclástica sobre la osteoblástica, lo que conduce a la pérdida de masa ósea. La osteoporosis es muy común en personas mayores, con mayor frecuencia en mujeres posmenopáusicas que en mujeres premenopáusicas o en hombres. Las células madre mesenquimales de la médula ósea son células preosteogénicas y tienen capacidad para diferenciarse en osteoblastos, como estas células están alojadas en un tejido óseo alterado por la osteoporosis, es de suponer que puedan verse afectadas.

Varios investigadores han estudiado el efecto de esta enfermedad metabólica en la función de las MSCs. En primer lugar, la reducción de la diferenciación osteogénica es el núcleo principal de esta enfermedad (204, 288-291). Esto ocurriría ya en etapas tempranas de la reparación ósea. Por el contrario, hay una la preferencia hacia la diferenciación adipogénica, que concuerda con el aumento de la grasa medular frecuentemente observado con el envejecimiento y la osteoporosis (288, 290, 292, 293). Para revertir esta tendencia, se deberían trasplantar MSCs con una mejor capacidad de diferenciación osteogénica.

Otra alteración que ocurre en la osteoporosis es la reducción del número de MSCs en el tejido óseo, también disminuye la capacidad proliferativa (288, 290) y está alterada la respuesta a los estímulos mecánicos (294). Además, hay una producción de matriz deficiente en colágeno I (204, 288, 290) y menor expresión de la fosfatasa alcalina, al menos, en estudios *in vitro* (292, 295, 296). Sin embargo, no ha sido confirmado por otros autores (297).

La migración de las células madre mesenquimales es un paso esencial para la consolidación de fracturas o defectos óseos localizados. Pero también para trastornos óseos difusos como la osteoporosis, aunque este papel es menos claro. La orientación de estas células hacia los tejidos diana es fundamental para la formación ósea adecuada. Esta capacidad de reclutamiento y migración fue estudiada por Haasters, apreciando que estaba disminuida significativamente en MSCs osteoporóticas en comparación con controles sanos (290). Esto puede deberse a una expresión diferencial de integrinas de unión a la matriz extracelular, en concreto, se encuentra reducida la integrina $\alpha 2$ de unión al colágeno (298).

En la osteoporosis existe un aumento del estado de senescencia y apoptosis celular (299). Los mecanismos involucrados pueden ser múltiples, entre los que se incluyen el acortamiento en la longitud de los telómeros, daño en el ADN o un mayor estrés oxidativo (300). Aunque estos mecanismos no están aclarados por completo (301).

La mayor parte de estudios de funcionalidad de MSCs osteoporóticas son realizados *in vitro*, apreciándose una capacidad osteogénica disminuida, pero no ha sido investigado suficientemente *in vivo* (234). Experimentos previos en nuestro laboratorio mostraron que las MSCs de pacientes con fractura osteoporótica de cadera mantuvieron la capacidad de proliferación, pero mostraron una capacidad de diferenciación disminuida *in vitro* (273). Por este motivo, era difícil predecir las consecuencias *in vivo* de esas características contrapuestas. Posteriormente, se estudió el potencial regenerativo en el tejido subcutáneo de ratones confirmando que, tanto los marcadores de senescencia como la capacidad osteogénica *in vivo* de las MSCs de pacientes con osteoporosis, no era inferiores a MSCs controles de edad similar (234). Por esta razón, consideramos que clarificar esta cuestión es de especial importancia antes de planificar el uso del trasplante autólogo de MSCs con fines regenerativos.

Se ha visto que el deterioro de la funcionalidad de las MSCs osteoporóticas puede verse mejorado con el estímulo de BMPs. Estos agentes mejoran la diferenciación osteogénica de las MSCs, por lo que pueden ser un agente terapéutico prometedor para el tratamiento de fracturas en pacientes osteoporóticos (288, 290).

Aparte de para la regeneración ósea, existe un interés creciente en el tratamiento de la osteoporosis mediante estas terapias regenerativas. Como el mal funcionamiento de las MSCs puede estar implicado en la patogénesis de la osteoporosis, la infusión de MSCs podría mejorar la formación ósea sistémica. Hu en 2018 y Jiang en 2021, realizaron estudios de

revisión sistemática de estudios preclínicos, mostrando efectos positivos y mecanismos reconocidos, donde las MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo eran eficaces en el tratamiento de la osteoporosis (204, 302).

Influencia del envejecimiento en las MSCs

La capacidad funcional de las células madre mesenquimales puede verse comprometida en individuos ancianos en relación con cambios debidos a la edad avanzada y el envejecimiento. Esto lleva, finalmente, a una deficiencia en la formación ósea. Con la edad, se ve afectado el número y el tamaño de los precursores osteoblásticos en la médula ósea, así como su funcionamiento (303, 304). También disminuye la capacidad de migración y proliferación celular, a la vez que se ve alterado su secretoma. Finalmente, la alteración de la capacidad de diferenciación hace que disminuya la diferenciación osteogénica y aumente la diferenciación adipogénica (73, 305).

Debemos tener en cuenta que las MSCs están presentes en la médula ósea, aunque también pueden estar presentes en la circulación sanguínea, al menos en algunas circunstancias. Aunque es difícil demostrar la presencia de estas MSCs circulantes en condiciones normales, se ha puesto de manifiesto su movilización en el contexto de fracturas o lesión tisular extensa (306, 307). Este número de precursores circulantes osteogénicos disminuye con el envejecimiento, particularmente en pacientes frágiles (308).

No siempre el comportamiento *in vitro* de estas células es semejante al comportamiento *in vivo*. Hay autores que encontraron que las MSCs tenían un envejecimiento acelerado cuando se cultivaban *in vitro*, pero mantenían una capacidad normal de proliferación y formación ósea *in vivo* (297, 309, 310). Esto sugiere que los cambios asociados a la edad pueden depender no solo de los cambios intrínsecos celulares, sino de los cambios en el ambiente donde se desarrollan (301, 311, 312). En este aspecto, pueden verse influidas por cambios epigenéticos (73, 313). Uno de estos modificadores se ha atribuido a la metilación genómica del ADN, que de tener efectos funcionales asociados, sugiere que la edad de los donantes debería tenerse en cuenta en entornos clínicos (11, 314). Por otra parte, las estrategias terapéuticas basadas en la corrección de esta regulación epigenética serían muy interesantes para controlar el envejecimiento de las MSCs y restaurar la homeostasis, especialmente entre los ancianos o las personas con enfermedades óseas (315).

El papel de la senescencia celular en los trastornos óseos relacionados con la edad está recibiendo gran atención en las últimas décadas. La senescencia celular es un estado en el que la célula permanece metabólicamente activa mientras sufre una detención irreversible del ciclo celular. También desarrolla diversas alteraciones que incluyen cambios en la expresión génica, cambios en el metabolismo y la inducción de un secretoma proinflamatorio o fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Esto, a su vez, impacta negativamente en las células vecinas (316-318). De hecho, aunque el número absoluto de células

senescentes sea pequeño, puede afectar a la homeostasis ósea por este mecanismo. La senescencia está emergiendo, recientemente, como un mecanismo importante en la patogénesis de varios trastornos relacionados con la edad, entre los que está incluida la osteoporosis (234).

En resumen, la bibliografía actual es controvertida en cuanto a la capacidad osteogénica de las MSCs de pacientes con osteoporosis y de individuos con edad avanzada. Por tanto, no está claro que pudieran ser adecuadas como terapia regenerativa eficaz. Algunos estudios encontraron una disminución del número de precursores osteogénicos circulantes y una disminución de la actividad de las MSCs en estos pacientes, sin embargo, otros han señalado que la movilización y la actividad de las MSCs está preservada (319).

Influencia de la fractura en las MSCs

Se ha documentado que después de una lesión tisular como es una fractura, las MSCs se activan y se produce un reclutamiento a nivel sistémico (270, 307). Esto implica una potenciación de la capacidad osteogénica, en efecto, se ha encontrado una sobreexpresión de los factores de transcripción Runx2 y osterix que dirigen esta diferenciación (273, 320, 321).

Nosotros estamos estudiando el potencial regenerativo de las MSCs aisladas de pacientes con fractura osteoporótica de cadera. Hemos revisado la influencia potencialmente negativa que podría tener la osteoporosis o la edad avanzada, pero también nos planteamos que, en el contexto de la fractura, se pueda estimular la capacidad reparativa de las MSCs donantes. La cirugía después de una fractura de cadera se realiza en nuestro hospital en las primeras 48 horas tras el traumatismo. Además, sistemáticamente, se desechan los bordes óseos fracturados, pero no se puede evitar un efecto regional o incluso sistémico. Con todo, pensamos que el estímulo hipotéticamente positivo en las MSCs trasplantadas, por el hecho del acontecimiento de la fractura, sea mínimo.

7.3.2.2 MSCs humanas de pacientes con fractura osteoporótica comparadas con MSCs humanas de pacientes con artrosis

Debido a razones prácticas y éticas, como controles se utilizaron las MSCs aisladas de la médula ósea de cabezas femorales de pacientes con coxartrosis, en lugar de médula ósea sana. Se ha sugerido que las MSCs de pacientes con artrosis tienen una capacidad de proliferación y diferenciación osteogénica similar a las MSCs de donantes sanos (322). Aunque, teóricamente, la artrosis podría inducir alguna anomalía en las MSCs. Es un tema controvertido, algunos investigadores encontraron que las células tendrían reducido el potencial osteogénico y condrogénico *in vitro* (323, 324), mientras que otros constataron una proliferación y capacidades osteogénicas conservadas (325, 326).

En el momento de la extracción de la médula ósea de las cabezas femorales artrósicas, también eliminamos el hueso subcondral. El objetivo fue desechar las áreas dañadas, ya que pueden ser más propensas a contener MSCs anómalas (324).

Como se ha comentado previamente, no es difícil encontrar artículos en los que se estudie el comportamiento de las MSCs osteoporóticas *in vitro*, existiendo menos trabajos *in vivo*. Pero apenas hallamos estudios comparativos con poblaciones celulares sanas, por eso consideramos interesante nuestro trabajo, donde pretendemos evaluar la idoneidad de las MSCs de pacientes osteoporóticos cuando las comparamos con pacientes no osteoporóticos. Cabe destacar, como era de esperar por su diferente epidemiología, que hubo cierto desequilibrio entre la edad de los pacientes con fractura osteoporótica y los controles con coxartrosis. No obstante, no vimos cambios significativos relacionados con el envejecimiento en el comportamiento de las MSCs, posiblemente por el rango de edad relativamente estrecho de los sujetos incluidos en el estudio. Es poco probable que haya influido en las diferencias observadas.

En estudios previos *in vitro* realizados por nuestro grupo se confirmó que, la capacidad de proliferación de las MSCs obtenidas de pacientes con fractura osteoporótica de cadera, estaba conservada en comparación con las MSCs obtenidas de pacientes con artrosis (273). Las células tendían a mostrar una regulación positiva de los genes relacionados con las vías de proliferación celular, en paralelo con una disminución de la metilación de sus regiones potenciadoras. En este estudio se refleja que, a pesar de un teórico envejecimiento epigenético acelerado, las MSCs de pacientes con fracturas por fragilidad, se activan y mantienen una buena capacidad de proliferación, lo que las hace potencialmente útiles para trasplantes autólogos. Las MSCs de pacientes osteoporóticos también expresaron altos niveles de colágeno y otros constituyentes de la matriz, aunque la actividad de la fosfatasa alcalina y la deposición de calcio se encontraban disminuidas. Por esta razón, su capacidad para formar una matriz mineralizada podría verse afectada, lo que demostraba resultados contradictorios.

Con posterioridad, se comprobó *in vivo* que las células mesenquimales tenían una capacidad similar para formar hueso nuevo cuando se trasplantaban por vía subcutánea en un modelo de ratón inmunodeficiente (234). Cuando se estudiaron los marcadores de senescencia, muchos de los genes SASP se expresaron en niveles bajos y no hubo diferencias entre las MSCs de pacientes osteoporóticos y pacientes con artrosis. En resumen, los datos reflejaron que las MSCs de pacientes con fractura osteoporótica tienen un estado de senescencia y capacidad de formación ósea *in vivo* similar a las MSCs de pacientes con artrosis, que no suelen tener osteoporosis o baja masa ósea (327, 328).

En nuestro trabajo experimental, hemos observado que los ratones a los que se administraron MSCs cultivadas de pacientes con osteoporosis, obtuvieron mejores resultados en la consolidación que cuando se administraron MSCs cultivadas de pacientes con artrosis.

En línea con los dos trabajos comentados, podemos confirmar que las MSCs obtenidas de pacientes con fractura osteoporótica de cadera conservan su capacidad osteogénica, siendo capaces de lograr la consolidación en un modelo de fractura femoral. Esto apoya el interés de futuros estudios para evaluar el uso potencial de MSCs autólogas de pacientes con osteoporosis en procedimientos de regeneración ósea, puesto que es probable que sean igualmente válidas cuando las comparamos con MSCs de individuos no osteoporóticos de edad similar.

Lo que nos llama la atención es que, de manera sorprendente, las MSCs cultivadas de pacientes con artrosis consiguen una consolidación más deficiente. Es independiente de la vía de administración, pero más llamativa si se realiza por vía sistémica.

7.3.2.3 El papel de la inmunidad en el trasplante de MSCs

Los mecanismos que explican el deterioro de la consolidación de fracturas inducida por las MSCs de pacientes con artrosis no están claros. Sin embargo, dado que el efecto fue más marcado después de la infusión intravenosa que cuando se realizó la administración local en el foco de fractura, es probable que estén implicados efectos secundarios mediados por la liberación de factores circulantes. Posteriormente, se va a analizar el papel que tienen las diferentes vías de administración en la efectividad de las MSCs, pero lo que vamos a revisar en este apartado, es la posible influencia de los fenómenos inmunitarios en el trasplante de las células.

Inicialmente, se pensó que el papel de las MSCs implantadas era su diferenciación hacia células osteoblásticas formadoras de hueso. No obstante, al observar al microscopio las lagunas de osteocitos del hueso recién formado, se aprecia que el número de células supervivientes del injerto es muy bajo o están completamente ausentes (236, 329, 330). Esto se contrapone con los resultados exitosos de los ensayos preclínicos y clínicos, lo que plantea que el beneficio terapéutico de las MSCs trasplantadas es, en gran medida, a través de un mecanismo paracrino (331). Estas observaciones contradictorias del destino de las MSCs trasplantadas están presentes en toda la bibliografía. Podría depender de múltiples causas como la dosis celular inicial, la matriz de biomaterial empleado, el sitio de implantación y la respuesta inmune del huésped.

El comportamiento de las MSCs ha ganado atención debido a su inmenso potencial para la inmunosupresión y su papel terapéutico en los trastornos inmunes. Las funciones inmunológicas de las células madre resumidas en cuatro grandes apartados son las siguientes: la inmunomodulación, desempeñando funciones proinflamatorias o antiinflamatorias; el papel autocrino y paracrino, por medio de la secreción de biomoléculas; el mecanismo de escape del sistema inmune innato, mediante interacciones célula a célula; y

la protección contra la acción del sistema del complemento, previniendo su muerte celular (124).

Existe una red de interacciones complejas entre las células inmunes y las MSCs, de forma que las respuestas inmunes juegan un papel importante en la regeneración ósea. Esto fue revisado recientemente por Chen y colaboradores (123). Las respuestas inmunes innatas proporcionan un microambiente inflamatorio adecuado para la regeneración ósea, iniciándose ya en la etapa temprana de la reparación de fracturas, mientras que las respuestas inmunes adaptativas mantienen tanto la regeneración como la remodelación ósea. Las MSCs y las células inmunes se regulan entre sí. Todos los tipos de células inmunes y citoquinas secretadas pueden regular la migración, proliferación y diferenciación osteogénica de las MSCs (332, 333), a su vez, las MSCs tienen una fuerte capacidad inmunomoduladora sobre las células inmunes. Por lo tanto, una comprensión profunda de estos principios de la inmunología ósea, puede proporcionar nuevos conocimientos para el desarrollo de la ingeniería de tejidos, además de poder aplicar estrategias de modulación.

Vamos a explicar cómo se desarrolla esta interacción entre ambos tipos celulares. Las células inmunes presentan efectos osteoinductivos en las MSCs, ya que crean un microambiente inmune adecuado para la regeneración ósea a través de fagocitosis, degranulación y secreción de citoquinas, también aceleran la curación ósea. La estimulación inflamatoria puede reclutar MSCs, regular su proliferación y apoptosis, y promover la diferenciación osteogénica. Por otra parte, las MSCs tienen funciones inmunomoduladoras sobre las propias células inmunes y capacidades antiinflamatorias. La sintonía entre las MSCs y las células inmunes tiene un efecto positivo similar a la retroalimentación en la regulación de la regeneración ósea.

En resumen, el papel beneficioso de las MSCs trasplantadas podría depender de su fuerte efecto inmunomodulador, debido a que tienen la capacidad de alterar la respuesta inmune innata y adaptativa, que es fundamental para facilitar la formación de hueso nuevo. A su vez, las células inmunes pueden promover el reclutamiento, la proliferación y la diferenciación osteogénica de las MSCs.

Teniendo en cuenta la interacción entre las MSCs y las células inmunes, y aunque los mecanismos subyacentes involucrados aún no se han perfilado por completo, se pueden llevar a cabo diferentes estrategias de modulación en las terapias que administran células inmunes o MSCs (334, 335). Los estímulos bioquímicos y los estímulos biofísicos se pueden utilizar para regular las células inmunes y así promover la osteogénesis de MSCs. Por otro lado, las terapias con MSCs se pueden utilizar para regular a las células inmunes y que sean más efectivas en la regeneración ósea. Actualmente, las modulaciones de las células inmunes se basan, principalmente, en estimular el cambio de la polarización de macrófagos M1 (que son fenotipos proinflamatorios) a la polarización de macrófagos M2 (que son fenotipos antiinflamatorios) (122, 294, 336).

Parece más fácil comprender el efecto inmunomodulador de las MSCs cuando se administran sistémicamente, estando mejor documentado. Pero cuando se administran localmente, el papel en la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas, es más difícil de alcanzar (331).

La supuesta capacidad para evitar el rechazo al administrar células alogénicas, sigue siendo controvertida. Algunos estudios muestran rechazo en entornos alogénicos y otros muestran tolerancia, también una pequeña selección muestra rechazo cuando las MSCs comienzan a diferenciarse (337, 338).

Wu y colaboradores estudiaron el trasplante de MSCs alogénicas en un modelo animal de defecto mandibular crítico en perros *beagle* (339). Durante las primeras 2 semanas después de la implantación, se detectó una respuesta inmune transitoria con un aumento de las citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en alcanzar la consolidación ósea, la densidad mineral ósea y las propiedades biomecánicas con respecto al grupo control. Estos hallazgos indican que las MSCs alogénicas pueden inducir una inmunorreacción transitoria, que puede retrasar temporalmente la osteogénesis en la etapa temprana de la implantación *in vivo*, mientras que la formación ósea a largo plazo no se vio afectada. También habría que tener en cuenta el modelo animal antes de aclarar las reacciones inmunes, puesto que éstas parecen ser más violentas en animales grandes (340).

Otros autores como Berner, refieren que las MSCs alogénicas se pueden usar de forma segura, debido a que en sus estudios no encontraron rechazo o reacción a cuerpo extraño. Los resultados de formación ósea y estudio biomecánico son comparables entre las MSCs autólogas y las alogénicas (341).

Algunos investigadores buscan estrategias para atenuar la respuesta inflamatoria. En relación con esto, Kim propone el trasplante de MSCs en forma de esferoides, lo que aumenta la tasa de supervivencia y disminuye la respuesta inflamatoria en su modelo animal (342).

Independientemente de la vía de administración, las MSCs trasplantadas tienen una capacidad de migración limitada, además, desaparecen casi completamente a los 7 días del trasplante. Al día siguiente de su implantación, las células activan las vías de señalización de la hipoxia, a lo que sigue la apoptosis. Después, se continúa con el reclutamiento local de células inmunes y la absorción de las MSCs apoptóticas por macrófagos. A este efecto se le ha denominado "mecanismo de golpear y morir" de las MSCs trasplantadas (343). La apoptosis de las MSCs modula las respuestas inmunes innatas y adaptativas, que impactan finalmente en sus efectos terapéuticos. En general, la muerte celular necrótica se asocia con inflamación y respuestas inmunes exacerbadas, mientras que la apoptosis evita una respuesta inflamatoria y contribuye, más bien, a su resolución (331). La "hipótesis de las células madre moribundas", por la cual la apoptosis de las MSCs trasplantadas modula la

respuesta inmune, fue formulada por primera vez en 2005 (344) y luego reforzada experimentalmente por varios grupos (345-348).

Preda y colaboradores enfatizan que la apoptosis *in vivo* y la activación de las respuestas inmunes después del trasplante de MSCs, deben considerarse en referencia a la capacidad de la MSCs alogénica para defenderse del rechazo, es decir, el supuesto privilegio inmune (343). Las MSCs alogénicas son, efectivamente, rechazadas después de la infusión (346, 349). No obstante, la MSC apoptótica aún conserva la actividad inmunomoduladora (345-349), lo que podría ser el principal mecanismo de acción. Esto también explica la gran dificultad en el seguimiento de estas células *in vivo*.

En general, aunque tanto el trasplante autólogo como el alogénico de MSCs son teóricamente factibles, el rechazo inmunitario es un riesgo inevitable y debe tenerse en cuenta en los ensayos clínicos, por eso se suele optar por el trasplante autólogo (204).

En nuestro trabajo investigamos la regeneración ósea en ratones NOD/SCID, que exhiben defectos severos en la inmunidad innata y adaptativa. Rapp y col. estudiaron cómo esta alteración podía influir en la consolidación de las fracturas. Constataron que el callo óseo no se ve afectado en los ratones durante las etapas iniciales de consolidación, mientras que se reduce significativamente en etapas posteriores. Además, aumenta la formación de cartílago, lo que indica un retraso en la osificación endondral, muy probablemente debido a la disminución de la actividad osteoclástica. La conclusión del estudio fue que la respuesta inmune inmediata, después de la fractura, no es esencial para el inicio de la formación ósea. No obstante, un sistema inmune intacto es importante, porque la osificación endondral se ve retrasada en esta cepa de ratón inmunodeficiente (162).

Efectivamente, la razón de la elección del ratón NOD/SCID fue la de evitar el rechazo inmune, sin embargo, no obtuvimos problemas de consolidación. Se alcanzaron buenas puntuaciones de consolidación radiológica e histológica, incluso en los grupos en los que no se administraron MSCs. Lo que no sabemos es, si por el hecho de emplear ratones inmunodeficientes, nuestros resultados se puedan extrapolar a organismos con respuestas inmunes preservadas. Lo más sorprendente de los resultados obtenidos es que, los ratones a los que se inyectaron MSCs obtenidas de pacientes con coxartrosis presentaron peores tasas de consolidación, además, este efecto fue más acusado cuando las células se administraban de manera sistémica. Esto nos lleva a pensar en la posible influencia de los fenómenos inmunitarios en el trasplante de MSCs de pacientes con artrosis, aunque faltarían más investigaciones para poder confirmarlo. Tampoco lo hemos visto descrito en la bibliografía existente.

7.3.3 VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE LAS MSCs

Existen dos vías principales para implantar las MSCs en el organismo, mediante la administración sistémica o la administración local en el sitio diana. El mecanismo de acción de las MSCs es complejo y podría diferir en ambas administraciones. Posiblemente, la elección de una u otra repercutirá en el método óptimo de entrega, por este motivo valoramos la influencia de la vía de administración en la efectividad de las MSCs para la regeneración ósea.

7.3.3.1 Administración sistémica de MSCs

La administración sistémica puede realizarse mediante inyección intraarterial, intravenosa, intraperitoneal o intracardiaca. Esta última es un método más invasivo, pero podría administrar un número mayor de MSCs en el sitio de interés (271).

El abordaje de elección es el acceso intravenoso, en concreto, en el caso de roedores suele realizarse a través de la vena de la cola. En nuestro trabajo, optamos por la inyección en el seno retroorbitario, porque debido al tamaño de los animales, los vasos de la cola eran muy pequeños y la posibilidad de extravasación de la infiltración, elevada.

No obstante, las células administradas por esta vía tienen que pasar primero a través de los pulmones, para después distribuirse por todo el organismo. Esta detección es bastante precoz, pues las MSCs ya las encontramos en el pulmón a las 24 horas de su administración (338). Este paso presenta un problema importante que se ha denominado el "primer paso pulmonar", que resulta en un atrapamiento significativo de las células (350, 351). Ocurre porque las MSCs tienen un diámetro estimado de 20 a 30 μm , mientras que los capilares pulmonares miden de 5 a 10 μm (338). Los datos experimentales respaldan que una gran proporción de MSCs quedan atrapadas en el pulmón después de la administración intravenosa (201-203). La discrepancia de tamaño ejerce un factor limitante en la transmigración endotelial, por el contrario, la capacidad de adhesión a las células endoteliales y la deformación de las MSCs facilitarían su paso a través de los capilares (350).

La persistencia de MSCs en los pulmones es variable según autores, pudiendo llegar hasta los 8 o 9 días después del trasplante (259, 343). Esto excede la vida previamente reportada (352, 354).

Las MSCs atrapadas inicialmente en la microvasculatura pulmonar, rápidamente son fagocitadas por macrófagos del tejido circundante. Las MSCs supervivientes pueden volver a recircular y albergar diferentes órganos, principalmente el hígado, debido al alto volumen de flujo sanguíneo; pero también los riñones, ganglios linfáticos y el bazo. Por último, un pequeño subconjunto celular puede redistribuirse al sitio de la lesión (271). Esto hace que el

número de células detectadas después del trasplante sea mucho menor que el número de células administradas, lo que se ha comprobado en numerosos estudios (204). Además, la tasa de apoptosis de las células que finalmente alcanzan el tejido diana es elevada y menos del 3 % permanecen en la fractura después de 5 semanas (259). Es difícil determinar en qué grado el atrapamiento pulmonar o la apoptosis celular son causa de la baja eficiencia del injerto.

Nosotros pudimos constatarlo en los ratones NOD/SCID a los que infundimos las MSCs de forma sistémica, fundamentalmente se apreció en los grupos de artrosis. Este grupo obtuvo peor consolidación que cuando las células eran administradas localmente. Como se ha constatado en estudios previos del grupo, el atrapamiento pulmonar juega un papel importante que limita que las células puedan alcanzar el lugar de la lesión (146), si bien, puede que no sea la única causa y estén implicados más factores.

La inyección intravenosa de MSCs en animales pequeños, aunque también la intraarterial, produce atelectasia pulmonar y trombosis. Esto es dependiente de la dosis. Al mismo tiempo, la mayoría de los estudios clínicos en humanos no registran efectos adversos graves en este aspecto. Esta contradicción es el resultado del número diferente de MSCs inyectadas en animales y humanos (355). Además, el efecto protrombótico en humanos es significativamente menor y puede ser manejado por el sistema fibrinolítico. La dosis promedio de MSCs en ensayos clínicos es de hasta 10^7 /kg de peso, mientras que se inyectan más de 10^8 /kg en experimentos con animales, lo que es necesario para una identificación fiable de las células o valorar sus efectos terapéuticos. Este problema de dosificación celular tiene una significación clínica importante, ya que en los ensayos clínicos en humanos prima la seguridad, con la eficacia como criterio de valoración secundario (338).

Otras vías de administración sistémica, como la administración arterial y la intracardiaca, tendrían el potencial de mejorar algunas de estas limitaciones de dosificación. En teoría, permiten que las células eviten los pulmones, al menos una vez, por lo que evaden el efecto pulmonar de primer paso. Esta administración permite disminuir la dosis necesaria, administra un flujo más alto causando una mayor dilución y, por tanto, disminuye el riesgo potencial de embolia celular (338). Aunque esto último es proporcional a la dosis y a la velocidad de infusión (356).

Hasta la fecha, el mecanismo de la terapia de trasplante de células madre se basa en un triple abordaje, el primero de ellos directo y otros dos indirectos: 1. Las MSCs todavía tienen la capacidad de dirigirse al sitio de la lesión, pudiendo diferenciarse en osteoblastos y condrocitos directamente, aunque el número de estas MSCs es limitado (357, 358); 2. Las MSCs ejercen efectos paracinos secretando citoquinas, factores de crecimiento óseo, quimiocinas y reclutan células a los sitios diana (359, 360); 3. Por último, las MSCs modulan el sistema inmune (333, 361, 362).

Las células que alcanzan la fractura en el grupo de inyección sistémica provienen de la red vascular y, debido a esto, sobrevivirán y funcionarán bien. Además, posiblemente pueden contribuir más a la curación de la fractura por los mecanismos indirectos, es decir, los dos últimos. Sin embargo, la diferenciación directa de las MSCs en células progenitoras esqueléticas, probablemente tiene poca importancia cuando las MSCs se infunden por esta vía. Por lo tanto, una ventaja sobre la administración local, es debida a su papel en la estimulación de las MSCs autólogas y las regulaciones inmunes (259).

Pang y col. en 2021, estudiaron que la apoptosis de las MSCs en el pulmón después de la administración intravenosa, tiene un papel de vital importancia (125). Ésta ocurre incluso en ausencia de células citotóxicas o alorreactivas del huésped. Los amplios efectos inmunosupresores de las MSCs administradas por esta vía podrían estar mediados por la respuesta del huésped a la apoptosis de las MSCs y su esferocitosis posterior, más que por una propiedad intrínseca de las MSCs viables. Estos datos revelan que la respuesta del huésped a las MSCs moribundas es clave para sus efectos terapéuticos, reforzando la teoría de que estos efectos persisten más allá de su supervivencia.

Otra cuestión es el momento óptimo para la infusión de las MSCs, hecho que fue estudiado por Dreger. Este autor observó que las MSCs se acumulaban significativamente en el lugar de la fractura cuando se administraban en el día 1, pero no en el día 3. Después, las células se mantenían en el sitio de la lesión, al menos, 7 días. De esta investigación concluyó que, en ratones, una ventana óptima para la inyección intravenosa de MSCs era alrededor de 24 horas después de la fractura (352). De esta forma se han administrado en nuestro estudio.

Como la efectividad del trasplante en la administración sistémica es pequeña, se trata de mejorar el reclutamiento y la migración celular, por ello se están elaborando varias metodologías para dirigir las MSCs a órganos específicos. Entre estas estrategias se encuentra el cebado pretrasplante con hipoxia, lo que mejora la tasa de supervivencia, el reclutamiento y la osteogénesis de las MSCs trasplantadas (363). En otras ocasiones, se modifican moléculas de la superficie celular a través de técnicas químicas o genéticas *in vitro*, también se pueden encapsular MSCs con biomateriales (338, 343). La administración sistémica se puede combinar con otros tratamientos para promover la eficiencia de las células mesenquimales. Tienen efecto sobre la angiogénesis terapias como la eritropoyetina, LIPUS y PTH1-34. En otros casos, se estimula con IGF-I y BMP-2, que tendría efecto sobre la osteogénesis (271). Se espera que, en el futuro, las nuevas metodologías de focalización y administración mejoren el efecto terapéutico de las MSCs.

En general, los estudios preclínicos reflejan buenos resultados con la aplicación sistémica de MSCs en la regeneración ósea (271).

7.3.3.2 Administración local de MSCs

Tal como acabamos de ver, la administración sistémica tiene dos inconvenientes, el filtro pulmonar y la dosificación celular. Es por este motivo por el que se estudia la inyección directa de las MSCs en el mismo foco de fractura o defecto óseo, de forma que las células alcancen con facilidad el tejido diana. Las MSCs se han ensayado en diversos modelos experimentales a nivel de la lesión, con resultados variables. Sin embargo, la eficacia de la terapia local no aumenta demasiado, por lo que su rentabilidad continúa siendo baja. La razón del fracaso local de la terapia con MSCs es, probablemente, la incapacidad de las células para sobrevivir en el lugar de la lesión, pues se inyectan pasivamente en un entorno local comprometido, con pH bajo, pobre aporte sanguíneo, hipoxia o inflamación (259). Esto lleva a la necrosis celular y a la actividad local de las células de inmunidad innata residentes, como las células *natural killer*, que inducen la apoptosis en las células trasplantadas. Esto parece ser cierto, no solo para las MSCs alogénicas, sino también para las MSCs autólogas. Se debe a que las células inyectadas interrumpen la arquitectura normal del tejido, lo que resulta en estrés celular y síntesis de alarminas o también llamados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs o *danger associated molecular patterns*) (355).

Huang es uno de los pocos autores que realiza un estudio experimental en el que compara la eficacia del tratamiento local con el sistémico (259). El trabajo refleja que ambos grupos con administración de MSCs funcionan igualmente bien en la curación de un modelo de fractura en ratas. Una de las críticas podría ser el tamaño limitado de la muestra, que no permitiría verificar la diferencia entre las vías de administración. Además, una dosis alta de células inyectadas sistémicamente aseguró que suficientes células migraran al sitio de la fractura, lo que acortaría la diferencia entre los grupos. También, en el grupo de células inyectadas sistémicamente, los mecanismos indirectos como la modulación inmune, pudieron contribuir a la curación de la fractura. Los resultados de este estudio mostraron que las MSCs inyectadas local y sistémicamente estaban presentes en el callo, lo que sugiere que algunas MSCs alogénicas podrían sobrevivir y mantener su fenotipo, al menos, durante 5 semanas *in vivo*.

Con los datos que tenemos a favor y en contra de la administración sistémica y la local, todavía nos quedan cuestiones sin resolver. En primer lugar, nos preguntamos si las distintas vías promueven la consolidación a través de diferentes mecanismos o ambos, directo e indirecto, están imbricados. Tampoco sabemos con exactitud cuáles son los procesos celulares y moleculares detrás de los efectos terapéuticos. Por último, no está claro si el número de células inyectadas a nivel sistémico debería ser mayor para contrarrestar el filtro pulmonar. Para resolver estas incógnitas se necesita una mayor investigación.

La administración sistémica sería más apropiada en el contexto de una enfermedad sistémica ósea, entre la que podemos incluir la osteoporosis, también cuando se requiera la reparación

de fracturas múltiples, eliminando la necesidad del abordaje quirúrgico. Mientras que la administración local estaría indicada en fracturas o defectos óseos únicos (143, 259, 271).

En nuestro trabajo, hemos comprobado que la consolidación radiológica tiende a ser mejor en la administración local de MSCs, pero solo llega a ser significativa en el grupo de MSCs obtenidas de artrosis. Esto es debido a que las MSCs cultivadas de pacientes con artrosis consolidan peor si se administran de forma sistémica. Sin embargo, no existe diferencia desde el punto de vista histológico entre ambas vías de administración. Con ello, y de forma global, no apreciamos una clara diferencia entre las vías de administración.

En la bibliografía estudiada hasta la fecha, existen más trabajos en los que se utiliza la administración local frente a la sistémica en los estudios de consolidación (364-366). Sí que es cierto que muchos de ellos asocian una matriz osteoconductora, hecho que dificulta la comparación directa de la efectividad de las MSCs aisladas y, dado que con la administración sistémica no se emplean, es aún más complicado establecer conclusiones. Debido al efecto beneficioso que aportan las matrices osteoconductoras, nos parece interesante desarrollarlo en el siguiente apartado.

7.3.3.3 El papel de las matrices osteoconductoras o *scaffolds*

En condiciones naturales las células no se encuentran aisladas, sino que están albergadas en tejidos. Así, forman una estructura tridimensional que confiere una estructura de sostén en el que las células se encuentran adheridas. Para remedar este tejido fisiológico, se propone la administración de MSCs junto con el empleo de matrices osteoconductoras o *scaffolds*. De esta forma, se pretende estimular el efecto de las MSCs cuando se administran de forma local. Estos materiales ejercen de portadores de las células hasta las regiones deseables y permiten mejorar sus propiedades (367). Las técnicas basadas en biomateriales pueden imitar mejor la estructura nativa de tejidos y órganos, e influir en la biocompatibilidad con el organismo huésped. Un biomaterial ideal debe ser capaz de aumentar la tasa de supervivencia de las MSCs y estimular el crecimiento funcional del tejido *in situ*, al mismo tiempo de promover su propia degeneración con la finalización del tratamiento (266). Estos elementos son estructuras tridimensionales que proporcionan una arquitectura y entorno para que el tejido óseo se desarrolle y crezca, guiando el proceso espacial y temporalmente complejo de reparación de las fracturas (143, 349).

La matriz osteoconductora debe cumplir ciertos requisitos biológicos, mecánicos y estructurales (349, 368). Desde el punto de vista biológico ha de ser biocompatible, biodegradable a medida que avanza el proceso de regeneración ósea y no tóxico (369). Además, ha de cumplir ciertos requisitos mecánicos, siendo lo más semejante a las propiedades mecánicas del hueso esponjoso humano, con el fin de reducir complicaciones. En cuanto a las características estructurales, debe presentar un grado de porosidad

adecuado, que es esencial para el crecimiento, migración celular y flujo de nutrientes (370-372). Fundamentalmente tienen propiedades osteoconductoras y, en algunos casos, también osteoinductoras, que ayudan a la expresión de proteínas osteogénicas y a la calcificación. Esto resulta útil para reparar defectos óseos amplios (368, 373).

Con el fin de cumplir con los requisitos anteriormente citados, se han explorado diferentes materiales. Los podemos clasificar en cerámicas, polímeros naturales, polímeros sintéticos y metales. A continuación, se exponen sus principales ventajas y limitaciones.

Los **biomateriales cerámicos** están compuestos generalmente por fosfato de calcio (CaP). Tienen la ventaja de ser biocompatibles, osteoconductores, también resistentes a la compresión y corrosión. El hueso humano está formado por un 70 % de este mineral, por lo que, en principio, serían los biomateriales de elección para curar el hueso lesionado (331). Las matrices osteoconductoras basadas en fosfato cálcico más comunes son hidroxiapatita (HA), beta-fosfato tricálcico (β -TCP) y una combinación de éstos, el fosfato de calcio bifásico (BCP). Los inconvenientes de los biomateriales basados en fosfato cálcico es que son altamente frágiles y presentan una baja osteoinductividad (143, 349).

Otras cerámicas bioactivas disponibles incluyen cerámica de silicato de calcio, cerámica de sulfato de calcio y vidrios bioactivos. La cerámica de silicato de calcio ha demostrado una mayor resistencia mecánica y a la flexión, cuando se la compara con la cerámica de fosfato cálcico. Los vidrios bioactivos están compuestos por óxido de calcio, pentóxido de fósforo, dióxido de silicio y óxido de sodio (374). Tienen propiedades que los hace únicos entre todas las biocerámicas. En poco tiempo, pueden hacer fuertes enlaces químicos con el tejido óseo que los rodea y tienen propiedades antibacterianas debida a la liberación de iones que alcalinizan el medio, actuando sobre las colonias bacterianas (368).

Los **biomateriales poliméricos** pueden ser de origen natural o sintético, cada tipo proporciona propiedades únicas. Los **polímeros naturales** ofrecen la capacidad de imitar la estructura y propiedades bioquímicas de la matriz ósea natural. Los polímeros biodegradables naturales son el colágeno, la celulosa, el alginato, el ácido hialurónico y el quitosán, entre otros. Se derivan directamente de tejidos vegetales o animales. Por lo general, no son tóxicos, están ampliamente disponibles, tienen un bajo potencial inmunogénico y proporcionan un alto grado de afinidad celular (143). Sus productos de degradación son moléculas naturales como los aminoácidos y, por lo tanto, son fácilmente absorbidos por los mecanismos naturales del cuerpo humano (368). Tienen la desventaja de poseer poca estabilidad térmica y procesabilidad (375), además de baja resistencia mecánica (349).

Los **polímeros sintéticos**, generalmente ofrecen un mayor grado de control sobre las características fisicoquímicas de la estructura, como el tamaño del poro, solubilidad, biocompatibilidad y respuesta inmune. Éstos incluyen los poliésteres alifáticos como el ácido

poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), policaprolactona (PCL) y sus copolímeros (272). La policaprolactona es, con mucho, el polímero más estudiado, debido a su alta permeabilidad, estabilidad térmica y alta biocompatibilidad (376, 377). Es importante destacar que los polímeros sintéticos también presentan desventajas, principalmente porque sus productos de degradación pueden cambiar el pH local, lo que resulta en la inhibición del crecimiento celular y la inflamación (143). Esto puede neutralizarse mediante la adición de materiales alcalinos o la construcción de materiales compuestos (378).

Los **metales** incluyen titanio, oro, cobalto, hierro, magnesio, tántalo, zinc y aleaciones de estos metales. En comparación con los polímeros biodegradables, los metales tienen una mayor rigidez y resistencia, tienen un alto rendimiento mecánico y una alta resistencia a la fatiga y a las fracturas. Esta es una ventaja, porque proporcionan un potencial de carga mucho mayor que la cerámica bioactiva. En la etapa inicial de su implantación proporcionan soporte mecánico y, más tarde, a lo largo del crecimiento del nuevo tejido óseo, se degradan *in vivo* y liberan sus iones. Es precisamente una desventaja su rápida degradación, para disminuirla se han introducido técnicas de aleación y solidificación rápida (368, 373).

En nuestro estudio experimental se ha empleado Lyostypt[®], que es una lámina de fieltro de colágeno puro tipo I que funciona como hemostático. La finalidad fue la de contener las MSCs inyectadas de forma local y evitar su migración, pero no tiene propiedades osteoconductoras ni osteoinductivas.

Para mejorar la efectividad de las terapias con MSCs en futuras investigaciones, consideramos su administración junto con matrices osteoconductoras.

7.3.4 EVALUACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN MEDIANTE ESTUDIO RADIOLÓGICO

En la práctica clínica, la prueba de imagen inicial para evaluar la consolidación de una fractura es la radiografía simple, que generalmente se complementará con una tomografía computarizada (TC) en el caso de que se sospeche alteración en la consolidación.

En el animal de experimentación en el que se estudia la pseudoartrosis o el efecto de diversas terapias para su tratamiento, se utilizan varios métodos para su valoración. Es de elección la realización de micro-TC, otras veces se realiza la evaluación combinada mediante radiología simple y micro-TC y, en el menor de los casos, únicamente mediante radiología simple. Es menos frecuente el empleo de DEXA (244, 256), SEM/EDX (254) o ecografía (250) para la valoración del callo.

Cuando se elige la radiología simple, se comprueba la colocación del implante y la alineación de la extremidad, además de evaluar la consolidación. Generalmente, se realizan dos proyecciones para valorar las cuatro corticales del hueso. La primera variación que se observa entre los diferentes autores es el momento de realización y el número de controles radiológicos que se llevan a cabo. Por regla general, es casi obligatorio realizar un control inicial para descartar complicaciones inmediatas y comprobar la colocación del implante, realizando otro control al finalizar el seguimiento para valorar la consolidación. Es muy variable el número de controles intermedios, pero generalmente se realizan radiografías seriadas en diferentes momentos evolutivos (253). Otra variación que existe entre los autores es el número de observadores que evalúan las radiografías y el grado de enmascaramiento.

Para la interpretación del estudio radiológico se emplean métodos cuantitativos, cualitativos o bien descripciones subjetivas de la evolución del callo. Como ejemplo de escalas cuantitativas tenemos la de Lee y Hao (244, 252), que miden la consolidación mediante el porcentaje de hueso formado (244); también la escala de Cheung, que mide la anchura y el área del callo óseo (257). Otro criterio para valorar la consolidación es de forma cualitativa, así, Lei emplea una escala con puntuaciones de 0 a 3; siendo 0 la ausencia de callo, 1 callo apenas visible, 2 callo normal y 3 callo excesivo (245). Son menos los autores que emplean escalas de valoración subjetivas para analizar los resultados radiológicos. A pesar de la existencia de clasificaciones, la mayor parte de estudios, únicamente valoran la existencia de callo fracturario y la existencia de puente óseo entre ambos fragmentos (222, 250). En otras ocasiones, las valoraciones son meramente descriptivas de la evolución del callo en cada grupo de tratamiento (255). Debido a esta amalgama que existe en la evaluación radiológica, es difícil establecer comparaciones entre los diferentes trabajos, además, pocos autores son exhaustivos a la hora de detallar la metodología (257).

La valoración mediante micro-TC permite con mayor precisión la evaluación de la consolidación y las características del callo de fractura, al poder realizar reconstrucciones tridimensionales y la medición de una serie de parámetros que son analizados por programas informáticos específicos. Puede variar la resolución de la prueba (con cortes de 3 a 12 μm) y la segmentación de la escala de grises para diferenciar el tejido mineralizado del no mineralizado. A pesar de esto, los protocolos son bastante homogéneos. En cuanto a los parámetros que se evalúan están el volumen óseo (BV o *bone volume*), el volumen tisular (TV o *tissue volume*) y el cociente entre ambos valores (BV/TV), que es indicativo del porcentaje de tejido mineralizado. Otro parámetro que se suele analizar es la densidad mineral ósea (BMD o *bone mineral density*) (193, 220, 259). Menos empleados son el volumen de hueso maduro (262), las dimensiones del callo (245), el número de trabéculas o el grosor trabecular (256). Además de estas mediciones cuantitativas, se emplean escalas cualitativas como la escala radiográfica de Garrett (176), Haleem o Altman (379). Al igual que ocurre con la radiología simple, hay autores que prefieren exclusivamente los estudios descriptivos

como Shimizu o Hejazi (222, 238). Generalmente, la valoración mediante micro-TC se realiza con la finalización del estudio, una vez sacrificado el animal. Es menos común la realización de un estudio evolutivo, como el que realiza Zhu, con micro-TC a las 2, 4 y 6 semanas (247). Tiene los inconvenientes de tener que anestesiarse al animal y el encarecimiento del procedimiento.

La valoración radiológica en nuestro estudio experimental se realizó, exclusivamente, mediante micro-TC. La metodología de obtención de las imágenes y su procesado, están en concordancia con los estudios publicados. El parámetro que elegimos para el análisis de los resultados fue el cociente BV/TV, al igual que la mayoría de los trabajos de experimentación de características similares al nuestro. También se emplearon dos escalas cuantitativas para valorar la consolidación y la corticalización. No es sistemático el uso de escalas de valoración radiológica cuando se elige la micro-TC, además de ser muy dispares en los distintos trabajos. En nuestro caso, la escala que valora la consolidación con una puntuación de 0 a 4, nos informa del número de corticales consolidadas en las dos proyecciones. Es una clasificación que comúnmente empleamos en la clínica, definiendo la consolidación cuando existen 3 de las 4 corticales consolidadas (45). De forma añadida a la existencia de puente óseo entre los fragmentos, hemos querido matizar la madurez o corticalización del callo de fractura. Es por este motivo que hemos ampliado la clasificación con una nueva puntuación de 0 a 4, especificando el número de corticales que están consolidadas y a la vez corticalizadas, es decir, con una radiodensidad similar a la cortical original. Esta última escala nos puede dar una idea de la mayor o menor densidad mineral ósea y, por consiguiente, de la madurez del callo de fractura.

Nos llama la atención que no existe una correlación significativa entre el cociente BV/TV y los resultados de las clasificaciones de consolidación y corticalización. Posiblemente, por el hecho de tratarse de osteosíntesis inestable, existe mucho volumen del callo fracturario y, aun cuando no hay consolidación, el porcentaje BV/TV apenas se ve alterado en los diferentes grupos de tratamiento. En cambio, la concordancia que existe entre las puntuaciones de consolidación y corticalización con los resultados del estudio histológico, refleja que las clasificaciones de consolidación y corticalización son más representativas del grado de consolidación radiológica que el cociente BV/TV, al menos, en nuestro modelo. El estudio histológico viene a confirmar el grado de consolidación o, en su defecto, de pseudoartrosis.

7.3.5 EVALUACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN MEDIANTE ESTUDIO HISTOLÓGICO

El estudio histológico del foco de fractura no se utiliza en la práctica clínica para evaluar la consolidación. Generalmente, se obtienen muestras del foco de fractura en el contexto de

cirugías de rescate cuando la pseudoartrosis ya está establecida, por lo que, no solo nos sirve de confirmación diagnóstica, sino que nos ayuda a descartar complicaciones como la infección. Sin embargo, el estudio histológico se realiza con frecuencia en los estudios experimentales. Se emplea como método para evaluar la consolidación y diferenciar el tipo de tejido que aparece en el foco de fractura.

En la técnica histológica, el grosor de los cortes del bloque de parafina es variable (de 3 a 9 μm), aunque lo más frecuente son los cortes de 5 μm . La tinción más empleada es la hemotaxilina-eosina, dado que permite valorar la neoformación ósea, la existencia de cartílago y fibrosis. Con menos frecuencia, el estudio se complementa con tinciones como el azul de toluidina (162, 193, 226, 244), su afinidad para teñir el cartílago pone de manifiesto regiones con osificación endocranal y matriz inmadura, también permite valorar los osteoblastos. Otras tinciones se realizan con tricrómico de Masson (193, 238), azul alcian (209, 227) o fosfatasa ácida tartrato resistente (162, 227), esta última sirve para valorar osteoclastos maduros.

Generalmente, el estudio histológico se realiza al finalizar el seguimiento, puesto que implica la eutanasia del animal.

La forma en la que los diversos autores valoran los resultados es muy variable. Dentro de las valoraciones cuantitativas se estudian numerosos parámetros: cantidad de tejido conectivo (226, 251), óseo (244, 251, 252), cartílago (239,257), celularidad (220, 238, 251), tejido hematopoyético (226, 251), tejido fibroso (239) o vasos (220).

Muy pocos autores emplean escalas. De las publicaciones revisadas, únicamente se han encontrado dos clasificaciones, ambas son utilizadas en nuestro trabajo. La escala de Allen, descrita en 1980 (47) y empleada por Hietaniemi (186); y la escala de Huo, descrita en 1991 (48) y empleada en los trabajos de Oetgen (185) y Findeisen (220).

Es llamativo que la mayor parte de los estudios no utilizan escalas de valoración, limitándose a realizar un estudio descriptivo del foco de fractura (176, 193, 222, 247). En ocasiones, los autores son bastante detallistas de las características del tejido, otras veces, simplemente indican la existencia de consolidación o su ausencia. La diferente forma de valoración de los trabajos no facilita la comparación entre resultados ni su análisis estadístico.

Como, de forma práctica, interesa evaluar si finalmente se produce la consolidación o la pseudoartrosis, hemos añadido la clasificación del puente óseo a las valoraciones de Allen y Huo. Es una clasificación muy sencilla que, aunque no está descrita previamente, evalúa la existencia de puente óseo en una o en las dos corticales que aparecen en la preparación histológica. Nos parece apropiada, puesto que se puede cuantificar y aporta más información que el estudio puramente descriptivo de la existencia de consolidación o no.

7.4 TERAPIA CON MSCs PARA CONSOLIDACIÓN EN HUMANOS

Para revisar el estado de la investigación de la terapia con MSCs en humanos, se realizó una búsqueda de los ensayos clínicos registrados en www.clinicaltrials.gov hasta el 20 de abril de 2024. Se seleccionaron, únicamente, estudios en los que se emplearon MSCs obtenidas de médula ósea, generalmente mediante aspiración de cresta ilíaca, que posteriormente fueron sometidas a un proceso de concentración o cultivo. Se descartaron los estudios en los que las MSCs fueron obtenidas de otros tejidos como el adiposo o el cordón umbilical. En algunos casos se añadió una matriz osteoconductora. Con estas premisas encontramos 16 ensayos clínicos, de los que 11 se han completado, 4 están en estado desconocido y 1 permanece activo. Esta terapia se probó, en la mayoría de los ensayos, para pseudoartrosis de huesos largos como el fémur o la tibia, encontrando uno en el que también incluye pseudoartrosis de húmero y otro que incluye pseudoartrosis de cuello femoral. Además de para tratamiento de pseudoartrosis, se han indicado para fractura de tibia (2 ensayos clínicos) y defecto óseo crítico (1 ensayo clínico). El número de pacientes incluidos es muy variable, con un rango de 5 a 85 pacientes. Únicamente, en 5 de los ensayos clínicos analizados se han encontrado publicaciones con los resultados obtenidos. En la tabla 28 se expone un resumen de los ensayos analizados.

Discusión

Título	Identificador	Localización	Pacientes	Indicación	Intervención	Inicio / estado	Publicaciones
Concentrado MSCs							
Treatment of non union of long bone fractures by autologous mesenchymal stem cell	NCT01206179	Royan Institute, Tehran, Iran	6	Pseudoartrosis de huesos largos	Concentrado MSCs, inyección percutánea	2009 / completado 2011	SI
Percutaneous autologous bone-marrow grafting for open tibial shaft fracture	NCT00512434	Angers University Hospital, Angers, France	85	Fractura abierta de tibia	Concentrado MSCs	2007 / completado 2013	NO
The efficacy of mesenchymal stem cells for stimulate the union in treatment of non-united tibial and femoral fractures in Shahid Kamyab Hospital	NCT01788059	Emdadi Kamyab Hospital, Khorasan, Iran	19	Pseudoartrosis de tibia y fémur	Concentrado MSCs, inyección percutánea	2013 / completado 2013	NO
Autologous BM-MSC transplantation in combination with platelet lysate (PL) for nonunion treatment	NCT02448849	Royan Institute, Tehran, Iran	60	Pseudoartrosis de tibia	Concentrado MSCs, inyección percutánea / placebo	2015 / desconocido	NO
Concentrado MSCs + sustituto óseo							
Autologous implantation of mesenchymal stem cells for the treatment of distal tibial fractures	NCT00250302	Hadassah Medical Organization, Jerusalem, Israel	24	Fractura de tibia distal	Concentrado MSCs + matriz ósea	2009 / completado 2011	NO
Use of adult bone marrow mononuclear cells in patients with long bone nonunion	NCT01581892	Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España	7	Pseudoartrosis de huesos largos	Concentrado MSCs + matriz ósea	2011 / completado 2013	SI
Clinical trial based on the use of mononuclear cells from autologous bone marrow in patients with pseudoarthrosis	NCT01813188	Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España	5	Pseudoartrosis de tibia	Concentrado MSCs + TCP + DBM / injerto de cresta ilíaca	2011 / completado 2014	NO
Evaluation the treatment of nonunion of long bone fracture of lower extremities (femur and tibia) using mononuclear stem cells from the iliac wing within a 3-D tissue engineered scaffold	NCT01958502	Emdadi Kamyab Hospital, Khorasan, Iran	18	Pseudoartrosis de fémur y tibia	Concentrado MSCs + BMP-2 + matriz 3D colágeno	2013 / desconocido	NO
Cultivo MSCs							
Treatment of atrophic nonunion by preosteoblast cells	NCT00916981	University Hospital of Liege, Bélgica	15	Pseudoartrosis de huesos largos	Cultivo MSCs, inyección percutánea	2008 / completado 2012	NO
Pivotal phase 2b/3 study on autologous osteoblastic cells implantation in hypotrophic non-union fractures	NCT01756326	Bone Therapeutics S.A., Bélgica	5	Pseudoartrosis de huesos largos	Cultivo MSCs, inyección percutánea / injerto autólogo	2012 / completado 2019	NO

Discusión

Título	Identificador	Localización	Pacientes	Indicación	Intervención	Inicio /estado	Publicaciones
Cultivo MSCs + sustituto óseo							
Feasibility study of Aastrom tissue repair cells to treat non-union fractures	NCT00424567	Aastrom Biosciences, USA	36	Pseudoartrosis de huesos largos	Cultivo MSCs + matriz ósea	2003 / completado 2007	NO
Autologous stem cell therapy for fracture non-union healing	NCT02177565	Robert Jones and Agnes Hunt Orthopaedic Hospital, Oswestry, United Kingdom	35	Pseudoartrosis de tibia y fémur	Cultivo MSCs + matriz ósea / control (sin MSCs)	2000 / completado 2011	NO
Evaluation of efficacy and safety of autologous MSCs combined to biomaterials to enhance bone healing	NCT01842477	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France	30	Pseudoartrosis de húmero, tibia, fémur	Cultivo MSCs + biomaterial	2013 / completado 2016	SI
A comparative study of 2 doses of BM autologous H-MSC +biomaterial vs iliac crest autograft for bone healing in non-union	NCT03325504	Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España	46	Pseudoartrosis de huesos largos	Cultivo MSCs + biomaterial / injerto cresta ilíaca	2017 / activo	SI
Mesenchymal Stem Cells; donor and role in management and reconstruction of nonunion fracture	NCT01626625	Indonesia University, Jakarta, Indonesia	10	Pseudoartrosis de fracturas	Cultivo MSCs + HA / injerto cresta ilíaca	2010 / desconocido	NO
The combined effect of Mesenchymal Stem Cell, HA-CaSO ₄ , BMP-2, and implant in Inducing the healing of critical-sized bone defect	NCT01725689	Indonesia University, Jakarta, Indonesia	6	Defecto óseo crítico (>2.5 cm)	Cultivo MSCs + HA-CaSO ₂ + BMP-2	2012 / desconocido	SI

Tabla 28. Ensayos clínicos realizados en humanos en los que se utiliza terapia con MSCs para tratamiento de pseudoartrosis.

TCP fosfato tricálcico, **DBM** matriz ósea desmineralizada, **BMP-2** proteína morfogenética ósea-2, **HA** hidroxiapatita.

A pesar de que existe un interés creciente por las terapias con MSCs para el tratamiento de diversas patologías, si acotamos nuestra búsqueda a que el origen de las células sea de procedencia ósea y, exclusivamente, para el tratamiento de los problemas de consolidación, el número de ensayos clínicos se reduce considerablemente.

Por otra parte, como lo que nos interesa es conocer los resultados de estos tratamientos, se procedió a revisar los artículos publicados. Se realizó una búsqueda bibliográfica dirigida utilizando el índice PubMed/MEDLINE utilizando las palabras clave: "nonunion", "mesenchymal stem cells", "bone healing", "MSC", "stem cells" y sus términos MeSH en cualquier combinación posible utilizando los operadores lógicos "AND" y "OR". La búsqueda se reiteró hasta el 20 de abril de 2024. Los criterios para la selección de artículos fueron la administración intraoperatoria de MSCs para el tratamiento de pseudoartrosis de fracturas, estudios en humanos, artículos escritos en inglés y de texto completo. La investigación que dependía de los resultados de modelos animales también se omitió. Cinco de los trabajos corresponden a publicaciones de los resultados de ensayos clínicos anteriormente comentados, el resto corresponden a otros trabajos o series de casos.

Con estos criterios, se seleccionaron 17 publicaciones que incluyeron 421 participantes de edades comprendidas entre 15 y 86 años (media 46 años), siendo 254 del género masculino (60.3 %) y 167 del género femenino (39.7 %). Las localizaciones anatómicas fueron tibia (n = 229; 54.4 %), tobillo (n = 86; 20.4 %), fémur (n = 61; 14.5 %), húmero (n = 22; 5.2 %), radio/cúbito (n = 18; 4.3 %), sacro (n = 1; 0.2 %), isquion (n = 1; 0.2 %), peroné (n = 1; 0.2 %), metatarsiano (n = 1; 0.2 %), metacarpiano (n = 1; 0.2 %). Todos utilizaron la cresta ilíaca para la extracción de aspirado de médula ósea. Los investigadores utilizaron varios métodos de preparación de las MSCs incluyendo, mayormente, concentración y/o cultivo (concentrado en 9 estudios, cultivo en 7 y aspirado en 1). Se emplearon matrices osteoconductoras biológicas o sintéticas en 10 de los 17 estudios analizados, siendo la más frecuente la hidroxiapatita. La consolidación ósea se evaluó utilizando, principalmente, radiografías ortogonales simples. La ausencia de dolor durante la carga de peso es otro descriptor clínico utilizado para valorar la consolidación de la fractura. Se identificaron el porcentaje de consolidación y el tiempo de consolidación después de la administración de MSCs en el sitio de fractura. Aunque los criterios de valoración no se miden de manera estandarizada en todos los trabajos, los resultados revelados son prometedores, con la mayoría de los pacientes consiguiendo la consolidación ósea con éxito (346 de 407 pacientes, 85 %). Los resultados y las principales características de los artículos analizados se resumen en la tabla 29.

Discusión

Autor	Pacientes	Diagnóstico	Procedimiento	Matriz osteoconductora	MSCs/Volumen inyectado	Resultados
Centeno y col. (2011) (380)	6	Pseudoartrosis de tibia, húmero, sacro, isquion, metatarso	Cultivo MSCs	NO	Desconocido	Consolidación n = 4; 66 %
Cevolani y col. (2021) (381)	38	Pseudoartrosis de fémur, tibia	Concentrado MSCs	Matriz ósea desmineralizada y fibrina rica en plaquetas	5-6 ml	Consolidación n = 30; 79 % 7 meses
Dilogo y col. (2019) (382)	6	Pseudoartrosis de fémur, tibia, húmero	Cultivo MSCs	Hidroxiapatita-CaSO ₂ + BMP-2	50.10 ⁶ 10 ml	Consolidación n = 6; 100 %
Emadedin y col. (2017) (383)	5	Pseudoartrosis de fémur, tibia	Concentrado MSCs	NO	20-50.10 ⁶	Consolidación n = 3; 60 %
Fernández-Bances y col. (2013) (384)	7	Pseudoartrosis de fémur, tibia, cúbito	Concentrado MSCs	Injerto óseo alogénico	10 ml	Consolidación n = 7; 100 % 5 meses
Flouzhat-Lachaniette y col. (2016) (385)	108	Pseudoartrosis de tibia	Concentrado MSCs	NO	150 ml antes de la concentración Después desconocido	Grupo diabetes: Consolidación n = 41; 76 % Grupo no diabetes: Consolidación n = 49; 91 % en menos tiempo y con mayor volumen del callo
Giannotti y col. (2013) (386)	8	Pseudoartrosis de húmero, radio, cúbito	Cultivo MSCs en suero autólogo	Coágulo de fibrina + Injerto autólogo / homólogo / sintético	0.5-2.10 ⁶ MSCs 2 ml	Consolidación n = 8, 100 % 10 meses
Gómez Barrena y col. (2020)	28	Pseudoartrosis de fémur, tibia, húmero	Cultivo MSCs	Hidroxiapatita + fosfato tricálcico	100-200.10 ⁶ MSCs 10 ml	Consolidación n = 26, 93 % 12 meses
Hernigou y col. (2005) (387)	60	Pseudoartrosis de tibia	Concentrado MSCs	NO	20 ml	Consolidación n = 53; 83 %
Hernigou y col. (2015) (388)	86	Pseudoartrosis de tobillo	Concentrado MSCs	NO	150 ml antes de la concentración Después desconocido	Consolidación n = 70; 81 %
Ismail y col. (2016) (389)	10	Pseudoartrosis de fémur, tibia, húmero	Cultivo MSCs	Grupo tratamiento: MSCs + gránulos de hidroxiapatita (n = 5) Grupo control: injerto cresta ilíaca + gránulos de hidroxiapatita (n = 5)	14-18.10 ⁶ MSCs 10 ml	Consolidación n = 10; 100 % 3 meses antes en el grupo de tratamiento que en grupo control
Labibzadeh y col. (2016) (390)	7	Pseudoartrosis de fémur, tibia, peroné	Concentrado MSCs, lisado plaquetario	NO	20.10 ⁶	Consolidación n = 4; 57 %
Le Thua y col. (2015) (391)	27	Pseudoartrosis de fémur, tibia, húmero, cúbito	Concentrado MSCs	Grupo tratamiento: MSCs + chips de hueso alogénico (n = 18) Grupo control: injerto cresta ilíaca (n = 9)	8 ml	Grupo tratamiento: Consolidación n = 17; 94 % 5 meses Grupo control: Consolidación n = 7; 78 %
Marcacci y col. (2007) (392)	4	Defecto óseo de tibia, húmero, cúbito	Cultivo MSCs	Hidroxiapatita	2.10 ⁷ MSCs / ml	Consolidación n = 4; 100 % 8 meses

Discusión

Autor	Pacientes	Diagnóstico	Procedimiento	Matriz osteoconductora	MSCs/Volumen inyectado	Resultados
Singh y col. (2013) (393)	12	Pseudoartrosis-retardo de consolidación de fémur, húmero, cúbito, metacarpo	Aspirado MSCs, 2-3 inyecciones con intervalo de 6-8 sem.	NO	20-40 ml	Consolidación n = 10; 83 % 4 meses
Toro y col. (2019) (394)	6	Pseudoartrosis de húmero	Concentrado MSCs	Injerto cortical / esponjoso	Desconocido	Consolidación n = 6; 100 % 3 meses
Wittig y col. (2016) (395)	3	Pseudoartrosis de fémur, tibia	Cultivo MSCs	Microesferas de colágeno y plasma rico en plaquetas	Desconocido	Consolidación n = 3; 100 %

Tabla 29. Artículos publicados en los que utiliza terapia con MSCs para tratamiento de pseudoartrosis de fracturas en humanos.

BMP-2 proteína morfogenética ósea-2.

La ejecución de los ensayos clínicos que posteriormente llevará a la aprobación de la terapia celular en humanos es compleja no solo por su diseño, estando también presentes cuestiones éticas y regulatorias específicas. En este contexto, la terapia celular se considera una terapia avanzada por la legislación europea, donde las células o tejidos se consideran diseñados o modificados si han sido sometidos a una manipulación sustancial y no están destinados a ser utilizados para la misma función esencial en el receptor que en el donante (*Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Consolidated version: 26/07/2019*). La fabricación de estos productos requiere la autorización de la autoridad competente del estado miembro que garantice los requisitos nacionales de trazabilidad y farmacovigilancia, así como normas de calidad específicas.

En la actualidad, solo se utilizan MSCs autólogas para la terapia celular de reparación ósea. La concentración intraoperatoria de médula ósea en el quirófano utilizando pequeñas centrífugas y kits con marcado CE, no requiere autorización y se realiza bajo la responsabilidad del cirujano. La seguridad de este procedimiento ya fue confirmada por Hernigou y después por otros autores (396). Para las MSCs cultivadas, no se ha encontrado evidencia de alteraciones perjudiciales o transformación maligna (397). Sin embargo, los efectos inmunomoduladores de las MSCs y su capacidad para mantener la supervivencia de las células asociadas merecen precaución y podría ser una barrera para la realización de ensayos clínicos (364).

Analizando la información de los ensayos clínicos y la bibliografía, se aprecia una heterogeneidad en cuanto a población, metodología y resultados. Lo que dificulta la elaboración de conclusiones.

Desde los estudios de Connolly en 1986 ya se había observado que la cantidad de MSCs inyectadas se correlacionaba positivamente con la calidad de la consolidación, lo cual demostraba una relación dosis-respuesta (398). Posteriormente Quarto, pionero en las terapias con MSCs y la pseudoartrosis, también estudió la concentración adecuada para que los pacientes inyectados con médula ósea experimentaran una consolidación rápida (399). Otro autor, Hernigou, apreció una correlación positiva entre el volumen del callo mineralizado y la concentración de MSCs en el injerto (387).

La dosis de células administradas en los estudios publicados es muy variable y, actualmente, no existe un consenso sobre la concentración óptima para inducir el crecimiento óseo. En tal sentido, cabe destacar la investigación realizada por el equipo de Gómez Barrena, donde la dosis de MSCs fue más alta que la mayoría de estudios previos, siendo de 200 millones de células (400). Ésta fue una decisión estratégica para evitar una dosificación subterapéutica, al tiempo que permitía la evaluación de seguridad para las MSCs.

La metodología para evaluar los resultados también debe ser rigurosa, empleando criterios tanto clínicos como radiológicos. Desde el punto radiológico, se establece la consolidación cuando hay formación de callo óseo en tres de las cuatro corticales del hueso afectado (4). Las escalas radiológicas, mayormente están orientadas y validadas para la evaluación de fracturas (401), pero muy raramente se aplican escalas en la pseudoartrosis. Además, existen dificultades para interpretar la progresión hacia la consolidación, especialmente en las fases intermedias. De nuevo, Gómez Barrena ha definido y validado la escala REBORNE para la consolidación en pseudoartrosis de tibia, húmero y fémur (45). Establece un umbral para definir la consolidación y obtiene una puntuación comparable en TC y radiografías. La puntuación se puede aplicar ante diferentes métodos de osteosíntesis, particularmente con biomateriales incorporados, donde la interpretación de la imagen puede verse dificultada.

Dado que la falta de consolidación suele ir acompañada de inestabilidad en el sitio de la fractura, el examen clínico es tan crítico para la evaluación como los resultados radiológicos (365). Consideramos que es un parámetro que debe ser incluido.

Hemos encontrado gran variabilidad en los estudios, tanto en los criterios para evaluar la consolidación como en la manera de reflejar los resultados. Todo ello dificulta la comparación entre los trabajos y la elaboración de conclusiones.

Se aprecia negativamente que la mayor parte de los estudios no cuentan con un grupo control. Un desafío para cualquier propuesta de terapia celular, asociada o no a biomaterial, sería someterse a ensayos clínicos comparativos para demostrar la superioridad sobre el estándar oro actual que es el autoinjerto óseo. Teniendo como referencia que la eficacia del autoinjerto se estableció en una consolidación del 74 % a los 9 meses (402).

Para concluir, podemos afirmar que los resultados de estudios sobre aplicaciones clínicas de células madre mesenquimales son prometedores. El conjunto actual de pruebas muestra un nivel moderado de éxito y bajas tasas de complicaciones, pero todavía no presentan un alto nivel de evidencia científica para el tratamiento estandarizado de la pseudoartrosis. Es decir, hasta la fecha, los datos son insuficientes y se requiere más información para establecer las indicaciones de tratamiento.

Todo ello, sin perder de vista que el crecimiento óseo requiere algo más que células madre. El apoyo de un entorno osteoinductivo es esencial y la reparación ósea puede estar influenciada por otros factores, como la vascularización local y la edad del paciente. El empleo de matrices osteoconductoras asociadas al tratamiento con MSCs, también requiriere más investigación.

7.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este estudio tiene varias limitaciones. Una de las más importantes fue la particularidad de trabajar con ratones inmunodeficientes para prevenir el rechazo de las MSCs humanas. Se ha comentado que las células del sistema inmune juegan un papel importante en la consolidación de fracturas y modulan la actividad de las MSCs. Debido a esta interacción, no está claro si los resultados obtenidos puedan extrapolarse a organismos con respuestas inmunes preservadas, incluidos los pacientes con retardo de consolidación y pseudoartrosis.

Debido a razones éticas y prácticas, no utilizamos MSCs de individuos sanos, sino que comparamos células de pacientes con fractura osteoporótica y artrosis. Esto es una limitación, puesto que la osteoporosis y la artrosis tienden a mostrar cambios en la masa ósea en dirección contrapuesta. Además, en la artrosis, la capacidad osteogénica de las MSCs parece estar conservada, aunque podría depender del entorno inflamatorio local *in vivo*. Para la recolección de MSCs se extrajeron cilindros óseos de la región central de las cabezas femorales en las cirugías de sustitución protésica. En todos los casos se desechó el borde fracturario y/o el hueso subcondral. En el caso de fractura osteoporótica, para despreciar la posible influencia local de la fractura; en el caso de artrosis, para evitar áreas dañadas que pueden ser más propensas a contener MSCs anómalas. Lo idóneo hubiera sido comparar el efecto de las MSCs osteoporóticas con MSCs controles de individuos sanos, pero supondría someter a estos pacientes a un procedimiento invasivo. Por ello, nuestro grupo control fueron las MSCs de pacientes con artrosis, dado que se estima que tienen las capacidades regenerativas conservadas, aunque no todos los autores están de acuerdo.

Se han empleado animales filogenéticamente alejados de la especie humana y con buena capacidad de regeneración ósea. Además, siguiendo los requisitos para limitar el número de animales utilizados para experimentos, el tamaño de la muestra de cada grupo fue relativamente limitado. Esto comprometió el poder en las comparaciones estadísticas, particularmente en el contexto de una amplia varianza interindividual de las puntuaciones de consolidación.

Por otra parte, la expansión en cultivo de las MSCs puede causar algunas modificaciones epigenéticas y fenotípicas. Sin embargo, el cultivo es necesario cuando se considera el trasplante de MSCs, porque su número representa un pequeñísimo porcentaje de las células nucleadas de la médula. Por este motivo, limitamos a dos el número de pases *in vitro* con el fin de evitar los cambios, en lo posible.

Debido a que nuestros resultados no reflejan una mejoría evidente para la consolidación ósea, consideramos que son necesarios más experimentos para establecer si esto puede ser debido a la falta de idoneidad del modelo experimental o realmente se debe a una falta de efecto de las MSCs.

7.6 APORTACIONES DE ESTA TESIS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los problemas de consolidación de las fracturas, como el retardo de consolidación y la pseudoartrosis, suponen un reto terapéutico para pacientes y traumatólogos. Presentan una complejidad en su abordaje terapéutico, además de haber aumentado su frecuencia en los últimos años. Por estos motivos, se buscan alternativas que ayuden a superar la limitación actual de los injertos óseos o de los nuevos biomateriales. Entre estas alternativas surgen las MSCs como un futuro prometedor, porque debido a sus capacidades de diferenciación osteogénica, presentan propiedades idóneas en las terapias de regeneración.

Tanto los estudios preclínicos como algunos clínicos han demostrado efectos beneficiosos, si bien, los mecanismos exactos de acción siguen sin estar claros. Son necesarias más investigaciones que aporten información sobre la dosis celular idónea para implantar y optimizar la vía de administración. En esta línea, se investiga mejorar la supervivencia de las células implantadas y el desarrollo de innovadores materiales con combinaciones celulares. Además, el procedimiento de expansión *in vitro* de las MSCs presenta algunas limitaciones y no está completamente estandarizado.

Aunque mayormente se estudia el trasplante de MSCs autólogas, las propiedades inmunosupresoras de estas células permiten el trasplante de MSCs alogénicas, por lo que se podrían establecer bancos celulares para la medicina regenerativa.

Con la evidencia que existe hasta la fecha, se sugiere que la aplicación de MSCs es una alternativa terapéutica con un gran potencial para el tratamiento de fracturas, sus complicaciones o defectos óseos de diversa etiología.

Lo idóneo sería el trasplante de MSCs de individuos sanos, si bien, en nuestro trabajo se estudia la capacidad regenerativa de MSCs de individuos osteoporóticos. Se ha valorado que estas células puedan tener las propiedades de formación ósea disminuida, aunque otros estudios afirman que las mantienen. Nuestros resultados aportan que la capacidad regenerativa de las MSCs de individuos con osteoporosis, se mantiene conservada con respecto a las MSCs controles de individuos con artrosis. Por este motivo podrían ser igualmente válidas, no obstante, hacen falta más estudios para evaluar su uso potencial en la regeneración ósea.

8 CONCLUSIONES

8 CONCLUSIONES

1. Hemos diseñado un **modelo experimental** de fractura femoral en el ratón NOD/SCID estabilizado con aguja intramedular que es apropiado para la valoración del tratamiento con MSCs humanas.
2. Desde el punto de vista **radiológico** por micro-TC (parámetros consolidación y corticalización), no se observa mejor consolidación en los grupos en los que se administran MSCs, respecto a los grupos control en los que no se administran células. Sin embargo, encontramos que los grupos en los que se administran MSCs cultivadas de pacientes con artrosis consolidan peor, particularmente si se administran de forma sistémica.
3. Desde el punto de vista **histológico** (escalas de Allen, Huo y puente óseo), no se observa mejor consolidación en los grupos en los que se administran MSCs, respecto a los grupos control en los que no se administran células. Sin embargo, encontramos que los grupos en los que se administran MSCs cultivadas de pacientes con artrosis consolidan peor. No observamos diferencias de consolidación según la vía de administración.
4. Los resultados de las puntuaciones radiológicas estuvieron fuertemente **correlacionados** con los resultados de las puntuaciones histológicas, lo que no solo demuestra la solidez del estudio, sino que la valoración histológica confirma el grado de consolidación ósea evaluado por micro-TC.
5. En nuestro modelo experimental no hemos demostrado una clara mejoría en la consolidación ósea mediada por MSCs, independientemente de su origen (MSCs cultivadas de pacientes con fractura osteoporótica o de artrosis), cuando se las compara con el **grupo control** en el que no se administran MSCs.
6. Respecto a la **vía de administración**, no observamos una mejoría significativa en la consolidación ósea, en función de si las MSCs son administradas de forma sistémica o local en el foco de fractura.
7. En cuanto al **origen**, las MSCs cultivadas *in vitro* de pacientes con fractura osteoporótica de cadera conservan las capacidades de regeneración ósea cuando se las compara con MSCs de pacientes con artrosis, por lo que pueden ser válidas para las terapias regenerativas.

9 BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Assiotis A, Sachinis NP, Chalidis BE. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. *J Orthop Surg Res.* 2012;7(1):24.
2. Ball AN, Donahue SW, Wojda SJ, McIlwraith CW, Kawcak CE, Ehrhart N, et al. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis. *J Orthop Res.* 2018;36(6):1559-72.
3. Cheng C, Shoback D. Mechanisms underlying normal fracture healing and risk factors for delayed healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2019;17(1):36-47.
4. Gómez-Barrena E, Padilla-Eguiluz N, Rosset P, Gebhard F, Hernigou P, Baldini N, et al. Early efficacy evaluation of mesenchymal stromal cells (MSC) combined to biomaterials to treat long bone non-unions. *Injury.* 2020;51 Suppl 1:S63-73.
5. Foulke BA, Kendal AR, Murray DW, Pandit H. Fracture healing in the elderly: a review. *Maturitas.* 2016;92:49-55.
6. Hak DJ. The biology of fracture healing in osteoporosis and in the presence of anti-osteoporotic drugs. *Injury.* 2018;49(8):1461-5.
7. Schmidt-Bleek K, Petersen A, Dienelt A, Schwarz C, Duda GN. Initiation and early control of tissue regeneration - bone healing as a model system for tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(2):247-59.
8. Dumic-Cule I, Peric M, Kucko L, Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in fracture repair. *Int Orthop.* 2018;42(11):2619-26.
9. Schlickewei CW, Kleinertz H, Thiesen DM, Mader K, Priemel M, Frosch KH, et al. Current and future concepts for the treatment of impaired fracture healing. *IJMS.* 2019;20(22):5805.
10. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury.* 2014;45 Suppl 2:S3-7.
11. Cheung WH, Miclau T, Chow SKH, Yang FF, Alt V. Fracture healing in osteoporotic bone. *Injury.* 2016;47:S21-6.
12. Bigham-Sadegh A, Oryan A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures: bone healing biology. *Int Wound J.* 2015;12(3):238-47.
13. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(3):133-43.
14. Hadjiargyrou M, O'Keefe RJ. The convergence of fracture repair and stem cells: interplay of genes, aging, environmental factors and disease. *J Bone Miner Res.* 2014;29(11):2307-22.
15. Dimitriou R, Kanakaris N, Soucacos PN, Giannoudis PV. Genetic predisposition to non-union: evidence today. *Injury.* 2013;44:S50-3.

Bibliografia

16. Copuroglu C, Calori GM, Giannoudis PV. Fracture non-union: Who is at risk? *Injury*. 2013;44(11):1379-82.
17. Panteli M, Pountos I, Jones E, Giannoudis PV. Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. *J Cell Mol Med*. 2015;19(4):685-713.
18. Pountos I, Georgouli T, Pneumaticos S, Giannoudis PV. Fracture non-union: can biomarkers predict outcome? *Injury*. 2013;44(12):1725-32.
19. Santolini E, West R, Giannoudis PV. Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence. *Injury*. 2015;46:S8-19.
20. Kostenuik P, Mirza FM. Fracture healing physiology and the quest for therapies for delayed healing and nonunion. *J Orthop Res*. 2017;35(2):213-23.
21. Bell A, Templeman D, Weinlein JC. Nonunion of the femur and tibia. *Orthop Clin North Am*. 2016;47(2):365-75.
22. Fischer V, Haffner-Luntzer M, Amling M, Ignatius A. Calcium and vitamin D in bone fracture healing and post-traumatic bone turnover. *Eur Cell Mater*. 2018;35:365-85.
23. Gorter EA, Hamdy NAT, Appelman-Dijkstra NM, Schipper IB. The role of vitamin D in human fracture healing: a systematic review of the literature. *Bone*. 2014;64:288-97.
24. Jha S, Blau J, Bhattacharyya T. Normal and delayed fracture healing: symphony and cacophony. *Horm Metab Res*. 2016;48(11):779-84.
25. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 2005;293(18):2257-64.
26. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Orav EJ, Lips P, Meunier PJ, Lyons RA, et al. A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *N Engl J Med*. 2012;367(1):40-9.
27. Bolland MJ, Grey A, Avenell A. Effects of vitamin D supplementation on musculoskeletal health: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(11):847-58.
28. Sprague S, Petrisor B, Scott T, Devji T, Phillips M, Spurr H, et al. What Is the Role of Vitamin D Supplementation in acute fracture patients? A systematic review and meta-analysis of the prevalence of hypovitaminosis D and supplementation efficacy. *J Orthop Trauma*. 2016;30(2):53-63.
29. Haines N, Kempton LB, Seymour RB, Bosse MJ, Churchill C, Hand K, et al. The effect of a single early high-dose vitamin D supplement on fracture union in patients with hypovitaminosis D: a prospective randomised trial. *Bone Joint J*. 2017;99-B(11):1520-5.
30. Gatt T, Grech A, Arshad H. The effect of vitamin D supplementation for bone healing in fracture patients: a systematic review. *Adv Orthop*. 2023;2023:6236045.
31. Richardson J, Hill AM, Johnston CJC, McGregor A, Norrish AR, Eastwood D, et al. Fracture healing in HIV-positive populations. *J Bone Joint Surg (Br)*. 2008;90-B(8):988-94.

Bibliografía

32. Pearson RG, Clement RGE, Edwards KL, Scammell BE. Do smokers have greater risk of delayed and non-union after fracture, osteotomy and arthrodesis? A systematic review with meta-analysis. *BMJ Open*. 2016;6(11):e010303.
33. Marquez-Lara A, Hutchinson ID, Nuñez F, Smith TL, Miller AN. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and bone-healing: a systematic review of research quality. *JBJS Rev*. 2016;4(3):1.
34. Wheatley BM, Nappo KE, Christensen DL, Holman AM, Brooks DI, Potter BK. Effect of NSAIDs on bone healing rates: a meta-analysis. *J Am Acad Orthop Surg*. 2019;27(7):e330-6.
35. Simpson AHRW, Tsang STJ. Non-union after plate fixation. *Injury*. 2018;49:S78-82.
36. McMillan TE, Johnstone AJ. Technical considerations to avoid delayed and non-union. *Injury*. 2017;48:S64-8.
37. Fisher JS, Kazam JJ, Fufa D, Bartolotta RJ. Radiologic evaluation of fracture healing. *Skeletal Radiol*. 2019;48(3):349-61.
38. Calori GM, Colombo M, Mazza EL, Mazzola S, Malagoli E, Marelli N, et al. Validation of the Non-Union Scoring System in 300 long bone non-unions. *Injury*. 2014;45:S93-7.
39. Weber BG, Cech O. Pseudarthrosis: pathophysiology, biomechanics, therapy, results. Bern: Hans Huber Publishers. 1976.
40. van Basten Batenburg M, Houben IB, Blokhuis TJ. The Non-Union Scoring System: an interobserver reliability study. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019;45(1):13-9.
41. Panagiotis M. Classification of non-union. *Injury*. 2005;36(4):S30-7.
42. Perlepe V, Cerato A, Putineanu D, Bugli C, Heynen G, Omoumi P, et al. Value of a radiographic score for the assessment of healing of nailed femoral and tibial shaft fractures: retrospective preliminary study. *Eur J Radiol*. 2018;98:36-40.
43. Whelan DB, Bhandari M, Stephen D, Kreder H, McKee MD, Zdero R, et al. Development of the Radiographic Union Score for Tibial fractures for the assessment of tibial fracture healing after intramedullary fixation. *J Trauma*. 2010;68(3):629-32.
44. Litrenta J, Tornetta P, Mehta S, Jones C, O'Toole RV, Bhandari M, et al. Determination of radiographic healing: an assessment of consistency using RUST and Modified RUST in metadiaphyseal fractures. *J Orthop Trauma*. 2015;29(11):516-20.
45. Gómez-Barrena E, Padilla-Eguiluz NG, García-Rey E, Hernández-Esteban P, Cordero-Ampuero J, Rubio-Suárez JC, et al. Validation of a long bone fracture non-union healing score after treatment with mesenchymal stromal cells combined to biomaterials. *Injury*. 2020;51 Suppl 1:S55-62.
46. Nicholson JA, Tsang STJ, MacGillivray TJ, Perks F, Simpson AHRW. What is the role of ultrasound in fracture management?: Diagnosis and therapeutic potential for fractures, delayed unions, and fracture-related infection. *Bone Joint Res*. 2019;8(7):304-12.
47. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1980;51(4):595-600.

Bibliografia

48. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res.* 1991;9(3):383-90.
49. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci.* 2015;28(1):57-71.
50. Kumar M, Shelke D, Shah S. Prognostic potential of markers of bone turnover in delayed-healing tibial diaphyseal fractures. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2019;45(1):31-8.
51. Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury.* 2014;45:S8-15.
52. Wagner JM, Schmidt SV, Dadras M, Huber J, Wallner C, Dittfeld S, et al. Inflammatory processes and elevated osteoclast activity chaperon atrophic non-union establishment in a murine model. *J Transl Med.* 2019;17(1):416.
53. van Baardewijk LJ, van der Ende J, Lissenberg-Thunnissen S, Romijn LM, Hawinkels LJAC, Sier CFM, et al. Circulating bone morphogenetic protein levels and delayed fracture healing. *Int Orthop.* 2013;37(3):523-7.
54. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept - open questions. *Injury.* 2008;39:S5-8.
55. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007;38:S3-6.
56. Calori GM, Mazza EL, Mazzola S, Colombo A, Giardina F, Romanò F, et al. Non-unions. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2017;14(2):186-8.
57. Andrzejowski P, Giannoudis PV. The «diamond concept» for long bone non-union management. *J Orthop Traumatol.* 2019;20(1):21.
58. Calori GM, Giannoudis PV. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber. *Injury.* 2011;42(11):1191-3.
59. Metsemakers WJ, Claes G, Terryn PJ, Belmans A, Hoekstra H, Nijs S. Reamer-Irrigator-Aspirator bone graft harvesting for treatment of segmental bone loss: analysis of defect volume as independent risk factor for failure. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2019;45(1):21-9.
60. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ernthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone.* 2015;70:93-101.
61. Kuehlfluck P, Moghaddam A, Helbig L, Child C, Wildemann B, Schmidmaier G, et al. RIA fractions contain mesenchymal stroma cells with high osteogenic potency. *Injury.* 2015;46 Suppl 8: S23-32.
62. Masquelet AC. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. *Langenbecks Arch Surg.* 2003;388(5):344-6.
63. Willems A, van der Jagt OP, Meuffels DE. Extracorporeal shock wave treatment for delayed union and nonunion fractures: a systematic review. *J Orthop Trauma.* 2019;33(2):97-103.

Bibliografia

64. Campbell EJ, Campbell GM, Hanley DA. The effect of parathyroid hormone and teriparatide on fracture healing. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(1):119-29.
65. Canintika AF, Dologo IH. Teriparatide for treating delayed union and nonunion: a systematic review. *J Clin Orthop Trauma.* 2020;11:S107-12.
66. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54.
67. Caterini R, Potenza V, Ippolito E, Farsetti P. Treatment of recalcitrant atrophic non-union of the humeral shaft with BMP-7, autologous bone graft and hydroxyapatite pellets. *Injury.* 2016;47:S71-7.
68. Wojda SJ, Donahue SW. Parathyroid hormone for bone regeneration. *J Orthop Res.* 2018;36(10):2586-94.
69. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
70. Schipani E, Kronenberg HM. Adult mesenchymal stem cells. En: *The stem cell research community*, editor. *Stembook.* Cambridge (MA): Board. Nonetheless; 2009.
71. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* 2004;37(1):23-34.
72. Thanaskody K, Jusop AS, Tye GJ, Wan Kamarul Zaman WS, Dass SA, Nordin F. MSCs vs. iPSCs: potential in therapeutic applications. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:1005926.
73. Lin H, Sohn J, Shen H, Langhans MT, Tuan RS. Bone marrow mesenchymal stem cells: aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials.* 2019;203:96-110.
74. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;12:87-117.
75. Cohnheim J. Ueber Entzündung und Eiterung. En: Virchow R, editor. *Archiv für pathologische anatomie und physiologie und für klinische medicin.* Berlin: Reimer; 1867.1-79.
76. Maximow AA. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol Rev.* 1924;4(4):533-63.
77. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963;197(4866):452-4.
78. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol.* 1963;62:327-36.
79. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16(3):381-90.
80. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-47.

Bibliografia

81. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40.
82. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-74.
83. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*. 1980;(151):294-307.
84. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
85. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
86. Luna AC, Madeira ME, Conceição TO, Moreira JA, Laiso RA, Maria DA. Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. *BMC Res Notes*. 2014;7:552.
87. Owen M. The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis Rheum*. 1980;23(10):1073-80.
88. Haasters F, Prall WC, Anz D, Bourquin C, Pautke C, Endres S, et al. Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing. *J Anat*. 2009;214(5):759-67.
89. Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci*. 1986;84:139-51.
90. Mareschi K, Rustichelli D, Calabrese R, Gunetti M, Sanavio F, Castiglia S, et al. Multipotent mesenchymal stromal stem cell expansion by plating whole bone marrow at a low cellular density: a more advantageous method for clinical use. *Stem Cells Int*. 2012;2012:920581.
91. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
92. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*. 2006;7:14.
93. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2006;99(5):1285-97.
94. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10(20):3016-20.
95. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004;40(6):1275-84.

Bibliografía

96. Scuteri A, Miloso M, Foudah D, Orciani M, Cavaletti G, Tredici G. Mesenchymal stem cells neuronal differentiation ability: a real perspective for nervous system repair? *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011;6(2):82-92.
97. Gupta S, Sharma A, S A, Verma RS. Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration: from differentiation to cell delivery. *Stem Cell Rev Rep.* 2021;17(5):1666-94.
98. Pérez-Campo FM, Riancho JA. Epigenetic mechanisms regulating mesenchymal stem cell differentiation. *curr genomics.* 2015;16(6):368-83.
99. Ciuffreda MC, Malpasso G, Musarò P, Turco V, Gnecci M. Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:149-58.
100. Ong WK, Chakraborty S, Sugii S. Adipose tissue: understanding the heterogeneity of stem cells for regenerative medicine. *Biomolecules.* 2021;11(7):918.
101. Wiegner R, Rudhart NE, Barth E, Gebhard F, Lampl L, Huber-Lang MS, et al. Mesenchymal stem cells in peripheral blood of severely injured patients. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(4):627-36.
102. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477-88.
103. Zamudio-Cuevas Y, Plata-Rodríguez R, Fernández-Torres J, Flores KM, Cárdenas-Soria VH, Olivos-Meza A, et al. Synovial membrane mesenchymal stem cells for cartilaginous tissues repair. *Mol Biol Rep.* 2022;49(3):2503-17.
104. Lemos DR, Eisner C, Hopkins CI, Rossi FMV. Skeletal muscle-resident MSCs and bone formation. *Bone.* 2015;80:19-23.
105. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes.* 2001;50(3):521-33.
106. Castro-Manreza ME, Bonifaz L, Castro-Escamilla O, Monroy-García A, Cortés-Morales A, Hernández-Estévez E, et al. Mesenchymal stromal cells from the epidermis and dermis of psoriasis patients: morphology, immunophenotype, differentiation patterns, and regulation of T cell proliferation. *Stem Cells Int.* 2019;2019:4541797.
107. Shao M, Xu Q, Wu Z, Chen Y, Shu Y, Cao X, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate IL-6-induced acute liver injury through miR-455-3p. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):37.
108. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(25):13625-30.
109. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149-55.

110. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4(1):21-6.
111. Murabayashi D, Mochizuki M, Tamaki Y, Nakahara T. Practical methods for handling human periodontal ligament stem cells in serum-free and serum-containing culture conditions under hypoxia: implications for regenerative medicine. *Hum Cell.* 2017;30(3):169-80.
112. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(174):249-82.
113. Verboket R, Leiblein M, Seebach C, Nau C, Janko M, Bellen M, et al. Autologous cell-based therapy for treatment of large bone defects: from bench to bedside. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(5):649-65.
114. Han DS, Chang HK, Kim KR, Woo SM. Consideration of bone regeneration effect of stem cells: comparison of bone regeneration between bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells. *J Craniofac Surg.* 2014;25(1):196-201.
115. Han D, Han N, Zhang P, Jiang B. Local transplantation of osteogenic pre-differentiated autologous adipose-derived mesenchymal stem cells may accelerate non-union fracture healing with limited pro-metastatic potency. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(1):1406-10.
116. Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue engineering and cell-based therapies for fractures and bone defects. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6:105.
117. Crivelli B, Chlapanidas T, Perteghella S, Lucarelli E, Pascucci L, Brini AT, et al. Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: from active principle to next generation drug delivery system. *J Control Release.* 2017;262:104-17.
118. Sui BD, Hu CH, Liu AQ, Zheng CX, Xuan K, Jin Y. Stem cell-based bone regeneration in diseased microenvironments: challenges and solutions. *Biomaterials.* 2019;196:18-30.
119. 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.* 2019;14(11):e0225472.
120. Miceli V, Bulati M, Iannolo G, Zito G, Gallo A, Conaldi PG. Therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells: the need of cell priming for cell-free therapies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):763.
121. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(1):12-20.
122. Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials.* 2019;196:80-9.
123. Chen R, Hao Z, Wang Y, Zhu H, Hu Y, Chen T, et al. Mesenchymal stem cell-immune cell interaction and related modulations for bone tissue engineering. *Stem Cells Int.* 2022;2022:7153584.

Bibliografía

124. Mishra VK, Shih HH, Parveen F, Lenzen D, Ito E, Chan TF, et al. Identifying the therapeutic significance of mesenchymal stem cells. *Cells*. 2020;9(5):1145.
125. Pang SHM, D’Rozario J, Mendonca S, Bhuvan T, Payne NL, Zheng D, et al. Mesenchymal stromal cell apoptosis is required for their therapeutic function. *Nat Commun*. 2021;12:6495.
126. Watanabe J, Yamada M, Niibe K, Zhang M, Kondo T, Ishibashi M, et al. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with N-acetyl-L-cysteine enhances bone regeneration via reinforced resistance to oxidative stress. *Biomaterials*. 2018;185:25-38.
127. Wei H, Xu Y, Chen Q, Chen H, Zhu X, Li Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-223 regulates neuronal cell apoptosis. *Cell Death Dis*. 2020;11(4):290.
128. Wen C, Lin L, Zou R, Lin F, Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosome mediated long non-coding RNA KLF3-AS1 represses autophagy and apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis. *Cell Cycle*. 2022;21(3):289-303.
129. Silva-Carvalho AÉ, Cardoso MH, Alencar-Silva T, Bogéa GMR, Carvalho JL, Franco OL, et al. Dissecting the relationship between antimicrobial peptides and mesenchymal stem cells. *Pharmacol Ther*. 2022;233:108021.
130. Alves-Paiva RM, do Nascimento S, De Oliveira D, Coa L, Alvarez K, Hamerschlak N, et al. Senescence state in mesenchymal stem cells at low passages: implications in clinical use. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:858996.
131. Fathi E, Charoudeh HN, Sanaat Z, Farahzadi R. Telomere shortening as a hallmark of stem cell senescence. *Stem Cell Investig*. 2019;6:7.
132. Mareschi K, Banche Niclot AGS, Marini E, Bari E, Labanca L, Lucania G, et al. A new human platelet lysate for mesenchymal stem cell production compliant with good manufacturing practice conditions preserves the chemical characteristics and biological activity of lyo-secretome isolated by ultrafiltration. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8):4318.
133. Castiglia S, Mareschi K, Labanca L, Lucania G, Leone M, Sanavio F, et al. Inactivated human platelet lysate with psoralen: a new perspective for mesenchymal stromal cell production in good manufacturing practice conditions. *Cytotherapy*. 2014;16(6):750-63.
134. Mareschi K, Marini E, Niclot AGSB, Barone M, Pinnetta G, Adamini A, et al. A new human platelet lysate for mesenchymal stem cell production compliant with good manufacturing practice conditions. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):3234.
135. Mareschi K, Castiglia S, Adamini A, Rustichelli D, Marini E, Banche Niclot AGS, et al. Inactivated platelet lysate supports the proliferation and immunomodulant characteristics of mesenchymal stromal cells in GMP culture conditions. *Biomedicines*. 2020;8(7):220.
136. Bernardi M, Adami V, Albiero E, Madeo D, Rodeghiero F, Astori G. Absence of micronucleus formation in CHO-K1 cells cultivated in platelet lysate enriched medium. *Exp Toxicol Pathol*. 2014;66(2-3):111-6.
137. Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant*. 2011;20(6):797-811.

Bibliografía

138. Fossett E, Khan WS, Longo UG, Smitham PJ. Effect of age and gender on cell proliferation and cell surface characterization of synovial fat pad derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2012;30(7):1013-8.
139. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S23-33.
140. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells International*. 2013;2013:e130763.
141. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*. 2015;35(2):e00191.
142. Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, Jolkkonen J, Deten A, Boltze J. Concise Review: MSC adhesion cascade-insights into homing and transendothelial migration. *Stem Cells*. 2017;35(6):1446-60.
143. Freitas J, Santos SG, Gonçalves RM, Teixeira JH, Barbosa MA, Almeida MI. Genetically engineered-MSC therapies for non-unions, delayed unions and critical-size bone defects. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14):3430.
144. Confalonieri D, Schwab A, Walles H, Ehlicke F. Advanced Therapy Medicinal Products: a guide for bone marrow-derived msc application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018;24(2):155-69.
145. Fuggle NR, Cooper C, Oreffo ROC, Price AJ, Kaux JF, Maheu E, et al. Alternative and complementary therapies in osteoarthritis and cartilage repair. *Aging Clin Exp Res*. 2020;32(4):547-60.
146. Real AD, López-Delgado L, Sañudo C, Pérez-Núñez MI, Laguna E, Menéndez G, et al. Método sensible para monitorizar la migración de las células madre mesenquimales de la médula ósea en modelos murinos. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2020;12(2):40-4.
147. Xiao F, Chen L. Effects of extracorporeal fucosylation of CD44 on the homing ability of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *J Orthop Sci*. 2019;24(4):725-30.
148. Sackstein R. The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the «step 2-bypass pathway» and other emerging perspectives. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(4):239-48.
149. Thankamony SP, Sackstein R. Enforced hematopoietic cell E- and L-selectin ligand (HCELL) expression primes transendothelial migration of human mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(6):2258-63.
150. Sackstein R. Directing stem cell trafficking via GPS. *Methods Enzymol*. 2010;479:93-105.
151. Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med*. 2008;14(2):181-7.
152. Sackstein R. Glycoengineering of HCELL, the human bone marrow homing receptor: sweetly programming cell migration. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(4):766-76.

Bibliografía

153. Dykstra B, Lee J, Mortensen LJ, Yu H, Wu ZL, Lin CP, et al. Glycoengineering of E-selectin ligands by intracellular versus extracellular fucosylation differentially affects osteotropism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2016;34(10):2501-11.
154. García-Bernal D, García-Arranz M, García-Guillén AI, García-Hernández AM, Blanquer M, García-Olmo D, et al. Exofucosylation of adipose mesenchymal stromal cells alters their secretome profile. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:584074.
155. López-Lucas MD, Pachón-Peña G, García-Hernández AM, Parrado A, Sánchez-Salinas D, García-Bernal D, et al. Production via good manufacturing practice of exofucosylated human mesenchymal stromal cells for clinical applications. *Cytotherapy*. 2018;20(9):1110-23.
156. Pachón-Peña G, Donnelly C, Ruiz-Cañada C, Katz A, Fernández-Veledo S, Vendrell J, et al. A Glycovariant of human CD44 is characteristically expressed on human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2017;35(4):1080-92.
157. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater*. 2013;26:1-12; discussion 12-14.
158. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co. Limited; 1959.
159. Mills LA, Simpson AHRW. In vivo models of bone repair. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(7):865-74.
160. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 1998;139(2):663-70.
161. Manigrasso MB, O'Connor JP. Comparison of fracture healing among different inbred mouse strains. *Calcif Tissue Int*. 2008;82(6):465-74.
162. Rapp AE, Bindl R, Recknagel S, Erbacher A, Müller I, Schrezenmeier H, et al. Fracture healing is delayed in immunodeficient NOD/scid- IL2R γ cnull mice. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0147465.
163. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 2011;49(4):591-9.
164. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat*. 2015;3(3):95-104.
165. Haffner-Luntzer M, Hankenson KD, Ignatius A, Pfeifer R, Khader BA, Hildebrand F, et al. Review of animal models of comorbidities in fracture-healing research. *J Orthop Res*. 2019;37(12):2491-8.
166. Mehta M, Schell H, Schwarz C, Peters A, Schmidt-Bleek K, Ellinghaus A, et al. A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011;131(1):121-9.
167. Wright KC. Working with laboratory animals: general principles and practical considerations. *J Vasc Interv Radiol*. 1997;8(3):363-73.

Bibliografía

168. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, et al. An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res*. 2010;28(3):397-402.
169. Gunderson ZJ, Campbell ZR, McKinley TO, Natoli RM, Kacena MA. A comprehensive review of mouse diaphyseal femur fracture models. *Injury*. 2020;51(7):1439-47.
170. Histing T, Bremer P, Rollmann MF, Herath S, Klein M, Pohlemann T, et al. A minimally invasive model to analyze endochondral fracture healing in mice under standardized biomechanical conditions. *JoVE*. 2018;(133):57255.
171. Helbig L, Guehring T, Rosenberger S, Ivanova A, Kaeppler K, Fischer CA, et al. A new animal model for delayed osseous union secondary to osteitis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:362.
172. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*. 1984;2(1):97-101.
173. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res*. 2007;25(1):51-61.
174. Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, Krummrey G, Einhorn T, Haas N, et al. Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *European Journal of Trauma*. 2004;30:35-42.
175. Minkwitz S, Faßbender M, Kronbach Z, Wildemann B. Longitudinal analysis of osteogenic and angiogenic signaling factors in healing models mimicking atrophic and hypertrophic non-unions in rats. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124217.
176. Gröngröft I, Wissing S, Meesters DM, Poeze M, Matthys-Mark R, Ito K, et al. Development of a novel murine delayed secondary fracture healing in vivo model using periosteal cauterization. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2019;139(12):1743-53.
177. Kerzner B, Martin HL, Weiser M, Fontana G, Russell N, Murphy WL, et al. A reliable and reproducible critical-sized segmental femoral defect model in rats stabilized with a custom external fixator. *J Vis Exp*. 2019;(145):10.3791/59206.
178. Reed AAC, Joyner CJ, Isefuku S, Brownlow HC, Simpson AHRW. Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85(4):604-10.
179. Pérez Núñez MI, Ferreño Blanco D, Alfonso Fernández A, Casado de Prado JA, Sánchez Crespo M, De la Red Gallego M, et al. Comparative study of the effect of PTH (1-84) and strontium ranelate in an experimental model of atrophic nonunion. *Injury*. 2015;46(12):2359-67.
180. Lin EA, Liu CJ, Monroy A, Khurana S, Egol KA. Prevention of atrophic nonunion by the systemic administration of parathyroid hormone (PTH 1-34) in an experimental animal model. *J Orthop Trauma*. 2012;26(12):719-23.
181. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, et al. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res*. 2008;147(1):84-91.

182. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, et al. A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech.* 2008;41(8):1689-96.
183. Schmidhammer R, Zandieh S, Mittermayr R, Pelinka LE, Leixnering M, Hopf R, et al. Assessment of bone union/nonunion in an experimental model using microcomputed technology. *J Trauma.* 2006;61(1):199-205.
184. Meesters DM, Neubert S, Wijnands KAP, Heyer FL, Zeiter S, Ito K, et al. Deficiency of inducible and endothelial nitric oxide synthase results in diminished bone formation and delayed union and nonunion development. *Bone.* 2016;83:111-8.
185. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury.* 2008;39(10):1119-26.
186. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P. An experimental model for non-union in rats. *Injury.* 1995;26(10):681-6.
187. Cullinane DM, Fredrick A, Eisenberg SR, Pacicca D, Elman MV, Lee C, et al. Induction of a neoarthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect. *J Orthop Res.* 2002;20(3):579-86.
188. Azad V, Breitbart E, Al-Zube L, Yeh S, O'Connor JP, Lin SS. rhBMP-2 enhances the bone healing response in a diabetic rat segmental defect model. *J Orthop Trauma.* 2009;23(4):267-76.
189. Fujita M, Matsui N, Tsunoda M, Saura R. Establishment of a non-union model using muscle interposition without osteotomy in rats. *Kobe J Med Sci.* 1998;44(5-6):217-33.
190. Geris L, Reed AAC, Vander Sloten J, Simpson AHRW, Van Oosterwyck H. Occurrence and treatment of bone atrophic non-unions investigated by an integrative approach. *PLoS Comput Biol.* 2010;6(9):e1000915.
191. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res.* 2003;21(3):503-10.
192. Chaubey A, Grawe B, Meganck JA, Dymant N, Inzana J, Jiang X, et al. Structural and biomechanical responses of osseous healing: a novel murine nonunion model. *J Orthop Traumatol.* 2013;14(4):247-57.
193. Danoff JR, Aurégan JC, Coyle RM, Burky RE, Rosenwasser MP. Augmentation of fracture healing using soft callus. *J Orthop Tra.* 2016;30(3):113-8.
194. Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Sentürk U, Dormann S, Bail HJ, et al. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *J Orthop Res.* 2008;26(12):1649-55.
195. Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, et al. The LockingMouseNail--a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *J Surg Res.* 2011;169(2):220-6.
196. Hsu WK, Sugiyama O, Park SH, Conduah A, Feeley BT, Liu NQ, et al. Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats. *Bone.* 2007;40(4):931-8.

197. Zhang ZY, Teoh SH, Chong MSK, Lee ESM, Tan LG, Mattar CN, et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*. 2010;31(4):608-20.
198. Delgado-Calle J, Sañudo C, Sánchez-Verde L, García-Renedo RJ, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone*. 2011;49(4):830-8.
199. Campbell GM, Sophocleous A. Quantitative analysis of bone and soft tissue by micro-computed tomography: applications to ex vivo and in vivo studies. *Bonekey Rep*. 2014;3:564.
200. Funakoshi K, Bagheri M, Zhou M, Suzuki R, Abe H, Akashi H. Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):13202.
201. Wang F, Eid S, Dennis JE, Cooke KR, Auletta JJ, Lee Z. Route of delivery influences biodistribution of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells following experimental bone marrow transplantation. *J Stem Cells Regen Med*. 2015;11(2):34-43.
202. Sood V, Mittal BR, Bhansali A, Singh B, Khandelwal N, Marwaha N, et al. Biodistribution of 18F-FDG-labeled autologous bone marrow-derived stem cells in patients with type 2 diabetes mellitus: exploring targeted and intravenous routes of delivery. *Clin Nucl Med*. 2015;40(9):697-700.
203. Meseguer-Olmo L, Montellano AJ, Martínez T, Martínez CM, Revilla-Nuin B, Roldán M, et al. Intraarticular and intravenous administration of 99mTc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells (99mTc-AH-MSCS): in vivo imaging and biodistribution. *Nucl Med Biol*. 2017;46:36-42.
204. Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Prolif*. 2021;54(1):e12956.
205. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007;13:1-10.
206. Montijo HE, Kellam JF, Gettys FK, Starman JS, Nelson MKJ, Bayoumi EM, et al. Utilization of the AO LockingRatNail in a novel rat femur critical defect model. *J Invest Surg*. 2012;25(6):381-6.
207. Abou-Khalil R, Colnot C. Cellular and molecular bases of skeletal regeneration: what can we learn from genetic mouse models? *Bone*. 2014;64:211-21.
208. Skaliczki G, Schandl K, Weszl M, Major T, Kovács M, Skaliczki J, et al. Serum albumin enhances bone healing in a nonunion femoral defect model in rats: a computer tomography micromorphometry study. *Int Orthop*. 2013;37(4):741-5.
209. Dickson GR, Geddis C, Fazzalari N, Marsh D, Parkinson I. Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed union/non-union fracture. *J Orthop Res*. 2008;26(5):729-36.
210. Garrett IR, Gutierrez GE, Rossini G, Nyman J, McCluskey B, Flores A, et al. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats. *J Orthop Res*. 2007;25(10):1351-7.
211. Zhao Z, Yang D, Ma X, Zhao H, Nie C, Si Z. Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator. *Tohoku J Exp Med*. 2009;219(2):115-20.

212. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl)*. 2005;50(5):137-42.
213. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, et al. Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: a combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res*. 2008;26(2):184-9.
214. Claes L, Blakytyn R, Göckelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res*. 2009;27(1):22-7.
215. Schwarz C, Wulsten D, Ellinghaus A, Lienau J, Willie BM, Duda GN. Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(1-2):247-54.
216. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H. Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg*. 2007;20(3):149-55.
217. Li W, Zara JN, Siu RK, Lee M, Aghaloo T, Zhang X, et al. Nell-1 enhances bone regeneration in a rat critical-sized femoral segmental defect model. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(2):580-7.
218. Russell G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall J, et al. Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg*. 2007;20(4):249-55.
219. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T. Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech*. 2007;40(1):215-9.
220. Findeisen L, Bolte J, Vater C, Petzold C, Quade M, Müller L, et al. Cell spheroids are as effective as single cells suspensions in the treatment of critical-sized bone defects. *BMC Musculoskelet Disord*. 2021;22(1):401.
221. Jiang H, Wang Y, Meng J, Chen S, Wang J, Qiu Y, et al. Effects of transplanting bone marrow stromal cells transfected with CXCL13 on fracture healing of diabetic rats. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(1):123-33.
222. Shimizu T, Akahane M, Morita Y, Omokawa S, Nakano K, Kira T, et al. The regeneration and augmentation of bone with injectable osteogenic cell sheet in a rat critical fracture healing model. *Injury*. 2015;46(8):1457-64.
223. Xing J, Jin H, Hou T, Chang Z, Luo F, Wang P, et al. Establishment of a bilateral femoral large segmental bone defect mouse model potentially applicable to basic research in bone tissue engineering. *J Surg Res*. 2014;192(2):454-63.
224. Huang S, Xu L, Sun Y, Zhang Y, Li G. The fate of systemically administrated allogeneic mesenchymal stem cells in mouse femoral fracture healing. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:206.
225. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am*. 1984;66(2):274-9.

226. Burastero G, Scarfi S, Ferraris C, Fresia C, Sessarego N, Fruscione F, et al. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone*. 2010;47(1):117-26.
227. Harada N, Watanabe Y, Sato K, Abe S, Yamanaka K, Sakai Y, et al. Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold. *Biomaterials*. 2014;35(27):7800-10.
228. Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *Biomed Res Int*. 2014;2014:348635.
229. Thormann U, Ray S, Sommer U, Elkhassawna T, Rehling T, Hundgeburth M, et al. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials*. 2013;34(34):8589-98.
230. Hak DJ, Makino T, Niikura T, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH. Recombinant human BMP-7 effectively prevents non-union in both young and old rats. *J Orthop Res*. 2006;24(1):11-20.
231. Utvåg SE, Korsnes L, Rindal DB, Reikerås O. Influence of flexible nailing in the later phase of fracture healing: strength and mineralization in rat femora. *J Orthop Sci*. 2001;6(6):576-84.
232. Roberto-Rodrigues M, Fernandes RMP, Senos R, Scoralick ACD, Bastos AL, Santos TMP, et al. Novel rat model of nonunion fracture with vascular deficit. *Injury*. 2015;46(4):649-54.
233. Kratzel C, Bergmann C, Duda G, Greiner S, Schmidmaier G, Wildemann B. Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008;9:135.
234. López-Delgado L, Del Real A, Sañudo C, Garcia-Ibarbia C, Laguna E, Menendez G, et al. Osteogenic capacity of mesenchymal stem cells from patients with osteoporotic hip fractures in vivo. *Connect Tissue Res*. 2022;63(3):243-55.
235. Park JS, Park KH. Light enhanced bone regeneration in an athymic nude mouse implanted with mesenchymal stem cells embedded in PLGA microspheres. *Biomater Res*. 2016;20:4.
236. Brennan MÁ, Renaud A, Amiaud J, Rojewski MT, Schrezenmeier H, Heymann D, et al. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(5):114.
237. Orsi PR, Landim-Alvarenga FC, Justulin LA, Kaneno R, de Assis Golim M, Dos Santos DC, et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):205.
238. Hejazi F, Ebrahimi V, Asgary M, Piryaee A, Fridoni MJ, Kermani AA, et al. Improved healing of critical-size femoral defect in osteoporosis rat models using 3D elastin/polycaprolactone/nHA scaffold in combination with mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(3):27.
239. Cui K, Chen Y, Zhong H, Wang N, Zhou L, Jiang F. Transplantation of IL-10-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorates diabetic-induced impaired fracture healing in mice. *Cell Mol Bioeng*. 2020;13(2):155-63.

240. Xing DG, Liu ZH, Gao HW, Ma WL, Nie L, Gong MZ. Effect of transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with insulin-like growth factor-1 gene on fracture healing of rats with diabetes. *Bratisl Lek Listy*. 2015;116(1):64-8.
241. Watson L, Chen XZ, Ryan AE, Fleming Á, Carbin A, O'Flynn L, et al. Administration of human non-diabetic mesenchymal stromal cells to a murine model of diabetic fracture repair: a pilot study. *Cells*. 2020;9(6):1394.
242. Riahi M, Parivar K, Baharara J, Zandi R. Evaluation of the repair of diaphyseal fracture of femoral bone using bone marrow mesenchymal stem cells in nicotine-bearing rat. *Bratisl Lek Listy*. 2019;120(6):434-42.
243. Obermeyer T, Yonick D, Lauing K, Stock S, Nauer R, Strotman P, et al. Mesenchymal stem cells facilitate fracture repair in an alcohol-induced impaired healing model. *J Orthop Trauma*. 2012;26(12):712-8.
244. Lee OK, Coathup MJ, Goodship AE, Blunn GW. Use of mesenchymal stem cells to facilitate bone regeneration in normal and chemotherapy-treated rats. *Tissue Eng*. 2005;11(11-12):1727-35.
245. Lei SH, Guo L, Yue HY, Zhao DC, Zhang CJ, Du WJ, et al. Marrow stromal stem cell autologous transplantation in denervated fracture healing: an experimental study in rats. *Orthop Surg*. 2013;5(4):280-8.
246. Kang JW, Park KD, Choi Y, Baek DH, Cho WS, Choi M, et al. Biodistribution and in vivo efficacy of genetically modified human mesenchymal stem cells systemically transplanted into a mouse bone fracture model. *Arch Pharm Res*. 2013;36(8):1013-22.
247. Zhu C, Sha M, Jiang H, Lin J, Lin W, Li W, et al. Co-culture of the bone and bone marrow: a novel way to obtain mesenchymal stem cells with enhanced osteogenic ability for fracture healing in SD rats. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):293.
248. Granero-Moltó F, Myers TJ, Weis JA, Longobardi L, Li T, Yan Y, et al. Mesenchymal stem cells expressing insulin-like growth factor-I (MSCIGF) promote fracture healing and restore new bone formation in *Irs1* knockout mice: analyses of MSCIGF autocrine and paracrine regenerative effects. *Stem Cells*. 2011;29(10):1537-48.
249. Sun Y, Xu L, Huang S, Hou Y, Liu Y, Chan KM, et al. mir-21 overexpressing mesenchymal stem cells accelerate fracture healing in a rat closed femur fracture model. *Biomed Res Int*. 2015;2015:412327.
250. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*. 2010;46(2):418-24.
251. Cassaro CV, Justulin LA, de Lima PR, Golim M de A, Biscola NP, de Castro MV, et al. Fibrin biopolymer as scaffold candidate to treat bone defects in rats. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2019;25:e20190027.
252. Hao C, Wang Y, Shao L, Liu J, Chen L, Zhao Z. Local injection of bone mesenchymal stem cells and fibrin glue promotes the repair of bone atrophic nonunion in vivo. *Adv Ther*. 2016;33(5):824-33.

253. Zhang R, Lee P, Lui VCH, Chen Y, Liu X, Lok CN, et al. Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model. *Nanomedicine*. 2015;11(8):1949-59.
254. Rady D, Mubarak R, Moneim RAA. Healing capacity of bone marrow mesenchymal stem cells versus platelet-rich fibrin in tibial bone defects of albino rats: an in vivo study. 2018;7:1573.
255. Li C, Wang Q, Gu X, Kang Y, Zhang Y, Hu Y, et al. Porous Se@SiO₂ nanocomposite promotes migration and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cell to accelerate bone fracture healing in a rat model. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:3845-60.
256. Li Z, Gu Y, Lin Z, Ma H, Zhang S. Cordycepin promotes osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and accelerates fracture healing via hypoxia in a rat model of closed femur fracture. *Biomed Pharmacother*. 2020;125:109991.
257. Cheung WH, Chin WC, Wei FY, Li G, Leung KS. Applications of exogenous mesenchymal stem cells and low intensity pulsed ultrasound enhance fracture healing in rat model. *Ultrasound Med Biol*. 2013;39(1):117-25.
258. Wang X, Wang C, Gou W, Xu X, Wang Y, Wang A, et al. The optimal time to inject bone mesenchymal stem cells for fracture healing in a murine model. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):272.
259. Huang S, Xu L, Zhang Y, Sun Y, Li G. Systemic and local administration of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes fracture healing in rats. *Cell Transplant*. 2015;24(12):2643-55.
260. Tanriverdi AK, Polat O, Elçin AE, Ahlat O, Gürman G, Günalp M, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in polytrauma: Evaluation of bone and liver healing response in an experimental rat model. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(1):53-64.
261. Mir SA, Azam MQ, Al-Dakheel DA, Acharya S. Healing of experimentally created non-union of femur in rats using bone precursor cells from mesenchymal stem cells (MSCs). *J Stem Cells*. 2015;10(2):91-6.
262. Watson L, Chen XZ, Ryan AE, Fleming Á, Carbin A, O'Flynn L, et al. Administration of human non-diabetic mesenchymal stromal cells to a murine model of diabetic fracture repair: a pilot study. *Cells*. 2020;9(6):1394.
263. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19-31.
264. Smakaj A, De Mauro D, Rovere G, Pietramala S, Maccauro G, Parolini O, et al. Clinical application of adipose derived stem cells for the treatment of aseptic non-unions: current stage and future perspectives-systematic review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):3057.
265. Di Taranto G, Cicione C, Visconti G, Isgrò MA, Barba M, Di Stasio E, et al. Qualitative and quantitative differences of adipose-derived stromal cells from superficial and deep subcutaneous lipoaspirates: a matter of fat. *Cytotherapy*. 2015;17(8):1076-89.

Bibliografía

266. Alonso-Goulart V, Carvalho LN, Marinho ALG, de Oliveira Souza BL, de Aquino Pinto Palis G, Lage HGD, et al. Biomaterials and adipose-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine: a systematic review. *Materials (Basel)*. 2021;14(16):4641.
267. Li Y, Jin D, Xie W, Wen L, Chen W, Xu J, et al. PPAR- γ and Wnt regulate the differentiation of MSCs into adipocytes and osteoblasts respectively. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(3):185-92.
268. Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther*. 2010;21(10):1226-38.
269. Rauch A, Haakonsson AK, Madsen JGS, Larsen M, Forss I, Madsen MR, et al. Osteogenesis depends on commissioning of a network of stem cell transcription factors that act as repressors of adipogenesis. *Nat Genet*. 2019;51(4):716-27.
270. Li Z, Liu C, Xie Z, Song P, Zhao RCH, Guo L, et al. Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PLoS One*. 2011;6(6):e20526.
271. Fu J, Wang Y, Jiang Y, Du J, Xu J, Liu Y. Systemic therapy of MSCs in bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):377.
272. Freitas GP, Lopes HB, Souza ATP, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Souza LEB, et al. Cell therapy: effect of locally injected mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or adipose tissue on bone regeneration of rat calvarial defects. *Sci Rep*. 2019;9(1):13476.
273. del Real A, Pérez-Campo FM, Fernández AF, Sañudo C, Ibarbia CG, Pérez-Núñez MI, et al. Differential analysis of genome-wide methylation and gene expression in mesenchymal stem cells of patients with fractures and osteoarthritis. *Epigenetics*. 2017;12(2):113-22.
274. García-García P, Ruiz M, Reyes R, Delgado A, Évora C, Riancho JA, et al. Smurf1 silencing using a LNA-ASOs/lipid nanoparticle system to promote bone regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(12):1306-17.
275. García-Sánchez D, González-González A, García-García P, Reyes R, Pérez-Núñez MI, Riancho JA, et al. Effective osteogenic priming of mesenchymal stem cells through LNA-ASOs-mediated Sfrp1 gene silencing. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1277.
276. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 2004;22(5):675-82.
277. Regulation (EC) N.º 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 november 2007 on advanced therapy medicinal products and amending directive 2001/83/EC and regulation (EC) N.º 726/2004. OJ L nov 13, 2007.
278. Fekete N, Rojewski MT, Fürst D, Kreja L, Ignatius A, Dausend J, et al. GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PLoS One*. 2012;7(8):e43255.
279. Mankani MH, Kuznetsov SA, Robey PG. Formation of hematopoietic territories and bone by transplanted human bone marrow stromal cells requires a critical cell density. *Exp Hematol*. 2007;35(6):995-1004.

280. Hertel FC, Silva AS da, Sabino A de P, Valente FL, Reis ECC. Preconditioning methods to improve mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in bone regeneration-a systematic review. *Biology (Basel)*. 2022;11(5):733.
281. He X, Wang Y, Liu Z, Weng Y, Chen S, Pan Q, et al. Osteoporosis treatment using stem cell-derived exosomes: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):72.
282. Re F, Gabusi E, Manferdini C, Russo D, Lisignoli G. Bone regeneration improves with mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles (EVs) combined with scaffolds: a systematic review. *Biology (Basel)*. 2021;10(7):579.
283. He XY, Yu HM, Lin S, Li YZ. Advances in the application of mesenchymal stem cells, exosomes, biomimetic materials, and 3D printing in osteoporosis treatment. *Cell Mol Biol Lett*. 2021;26(1):47.
284. Qi X, Zhang J, Yuan H, Xu Z, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats. *Int J Biol Sci*. 2016;12(7):836-49.
285. Dufrane D. Impact of age on human adipose stem cells for bone tissue engineering. *Cell Transplant*. 2017;26(9):1496-504.
286. Yi H, Wang Y, Liang Q, Mao X. Preclinical and clinical amelioration of bone fractures with mesenchymal stromal cells: a systematic review and meta-analysis. *Cell Transplant*. 2022;31:9636897211051743.
287. Tan SHS, Wong JRY, Sim SJY, Tjio CKE, Wong KL, Chew JRJ, et al. Mesenchymal stem cell exosomes in bone regenerative strategies-a systematic review of preclinical studies. *Mater Today Bio*. 2020;7:100067.
288. Prall WC, Haasters F, Heggebö J, Polzer H, Schwarz C, Gassner C, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440(4):617-22.
289. Rodríguez JP, Ríos S, Fernández M, Santibañez JF. Differential activation of ERK1,2 MAP kinase signaling pathway in mesenchymal stem cell from control and osteoporotic postmenopausal women. *J Cell Biochem*. 2004;92(4):745-54.
290. Haasters F, Docheva D, Gassner C, Popov C, Böcker W, Mutschler W, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(1):118-23.
291. Wang Y, Song W, Jing S, Yu J. Effect of estrogen deficiency on the proliferation and osteogenic differentiation potential of mandibular bone marrow stromal cells. 2014;49(10):619-24.
292. Rodríguez JP, Montecinos L, Ríos S, Reyes P, Martínez J. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem*. 2000;79(4):557-65.
293. Pino AM, Rosen CJ, Rodríguez JP. In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. *Biol Res*. 2012;45(3):279-87.

294. Zhang Y, Böse T, Unger RE, Jansen JA, Kirkpatrick CJ, van den Beucken JJP. Macrophage type modulates osteogenic differentiation of adipose tissue MSCs. *Cell Tissue Res.* 2017;369(2):273-86.
295. Zhang ZM, Jiang LS, Jiang SD, Dai LY. Osteogenic potential and responsiveness to leptin of mesenchymal stem cells between postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *J Orthop Res.* 2009;27(8):1067-73.
296. Jin WJ, Jiang SD, Jiang LS, Dai LY. Differential responsiveness to 17 β -estradiol of mesenchymal stem cells from postmenopausal women between osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos Int.* 2012;23(10):2469-78.
297. Stenderup K, Justesen J, Eriksen EF, Rattan SI, Kassem M. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6):1120-9.
298. Popov C, Radic T, Haasters F, Prall WC, Aszodi A, Gullberg D, et al. Integrins α 2 β 1 and α 11 β 1 regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *Cell Death Dis.* 2011;2(7):e186.
299. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.* 2008;7(3):335-43.
300. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
301. Ganguly P, El-Jawhari JJ, Giannoudis PV, Burska AN, Ponchel F, Jones EA. Age-related changes in bone marrow mesenchymal stromal cells: a potential impact on osteoporosis and osteoarthritis development. *Cell Transplant.* 2017;26(9):1520-9.
302. Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal Stem Cells: Cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):360.
303. Paspaliaris V, Kolios G. Stem cells in Osteoporosis: From biology to new therapeutic approaches. *Stem Cells Int.* 2019;2019:1730978.
304. Katsara O, Mahaira LG, Iliopoulou EG, Moustaki A, Antsaklis A, Loutradis D, 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 Dev.* 2011;20(9):1549-61.
305. Marędziak M, Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, Henry BM. The influence of aging on the regenerative potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2152435.
306. Hoogduijn MJ, Verstegen MMA, Engela AU, Korevaar SS, Roemeling-van Rhijn M, Merino A, et al. No evidence for circulating mesenchymal stem cells in patients with organ injury. *Stem Cells Dev.* 2014;23(19):2328-35.
307. Alm JJ, Koivu HMA, Heino TJ, Hentunen TA, Laitinen S, Aro HT. Circulating plastic adherent mesenchymal stem cells in aged hip fracture patients. *J Orthop Res.* 2010;28(12):1634-42.

Bibliografía

308. Gunawardene P, Bermeo S, Vidal C, Al-Saedi A, Chung P, Boersma D, et al. Association between circulating osteogenic progenitor cells and disability and frailty in older persons: the nepean osteoporosis and frailty study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016;71(9):1124-30.
309. Stenderup K, Rosada C, Justesen J, Al-Soubky T, Dagnaes-Hansen F, Kassem M. Aged human bone marrow stromal cells maintaining bone forming capacity in vivo evaluated using an improved method of visualization. *Biogerontology*. 2004;5(2):107-18.
310. 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*. 2003;33(6):919-26.
311. Zheng CX, Sui BD, Liu N, Hu CH, He T, Zhang XY, et al. Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic cytotherapy. *Sci Rep*. 2018;8(1):5215.
312. Sui BD, Hu CH, Zheng CX, Jin Y. Microenvironmental views on mesenchymal stem cell differentiation in aging. *J Dent Res*. 2016;95(12):1333-40.
313. del Real A, Riancho-Zarrabeitia L, López-Delgado L, Riancho JA. Epigenetics of skeletal diseases. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(3):246-55.
314. Toraño EG, Bayón GF, del Real Á, Sierra MI, García MG, Carella A, et al. Age-associated hydroxymethylation in human bone-marrow mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2016;14(1):207.
315. Wang R, Wang Y, Zhu L, Liu Y, Li W. Epigenetic regulation in mesenchymal stem cell aging and differentiation and osteoporosis. *Stem Cells Int*. 2020;2020:8836258.
316. Farr JN, Fraser DG, Wang H, Jaehn K, Ogradnik MB, Weivoda MM, et al. Identification of senescent cells in the bone microenvironment. *J Bone Miner Res*. 2016;31(11):1920-9.
317. Farr JN, Xu M, Weivoda MM, Monroe DG, Fraser DG, Onken JL, et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med*. 2017;23(9):1072-9.
318. Farr JN, Khosla S. Cellular senescence in bone. *Bone*. 2019;121:121-33.
319. Iso Y, Yamaya S, Sato T, Poole CN, Ioyama K, Mimura M, et al. Distinct mobilization of circulating CD271+ mesenchymal progenitors from hematopoietic progenitors during aging and after myocardial infarction. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(6):462-8.
320. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*. 2014;28:269-86.
321. Rojas A, Aguilar R, Henriquez B, Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ, van Zundert B, Allende ML, Montecino M. Epigenetic control of the bone-master Runx2 gene during osteoblast-lineage commitment by the histone demethylase JARID1B/KDM5B. *J Biol Chem*. 2015;290(47):28329-42.
322. 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*. 2003;31(10):890-6.

323. Čamernik K, Mihelič A, Mihalič R, Haring G, Herman S, Marolt Presen D, et al. Comprehensive analysis of skeletal muscle- and bone-derived mesenchymal stem/stromal cells in patients with osteoarthritis and femoral neck fracture. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):146.
324. Campbell TM, Churchman SM, Gomez A, McGonagle D, Conaghan PG, Ponchel F, et al. Mesenchymal stem cell alterations in bone marrow lesions in patients with hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(7):1648-59.
325. Stiehler M, Rauh J, Bünger C, Jacobi A, Vater C, Schildberg T, et al. In vitro characterization of bone marrow stromal cells from osteoarthritic donors. *Stem Cell Res.* 2016;16(3):782-9.
326. Jones E, English A, Churchman SM, Kouroupis D, Boxall SA, Kinsey S, et al. Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells. *Arthritis Rheum.* 2010;62(7):1944-54.
327. Im GI, Kim MK. The relationship between osteoarthritis and osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2014;32(2):101-9.
328. Geusens PP, van den Bergh JP. Osteoporosis and osteoarthritis: shared mechanisms and epidemiology. *Curr Opin Rheumatol.* 2016;28(2):97-103.
329. Gamblin AL, Brennan MA, Renaud A, Yagita H, Lézot F, Heymann D, et al. Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. *Biomaterials.* 2014;35(36):9660-7.
330. Giannoni P, Scaglione S, Daga A, Ilengo C, Cilli M, Quarto R. Short-time survival and engraftment of bone marrow stromal cells in an ectopic model of bone regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(2):489-99.
331. Humbert P, Brennan MÁ, Davison N, Rosset P, Trichet V, Blanchard F, et al. Immune modulation by transplanted calcium phosphate biomaterials and human mesenchymal stromal cells in bone regeneration. *Front Immunol.* 2019;10:663.
332. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(13):2345-60.
333. Liu H, Li D, Zhang Y, Li M. Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):393-404.
334. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007;101(1):135-46.
335. Liu H, Li M, Du L, Yang P, Ge S. Local administration of stromal cell-derived factor-1 promotes stem cell recruitment and bone regeneration in a rat periodontal bone defect model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;53:83-94.
336. Chen Z, Klein T, Murray RZ, Crawford R, Chang J, Wu C, et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Materials Today.* 2016;19(6):304-21.

337. Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, Lohan P, Treacy O, Ritter T. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far? *Immunol Cell Biol.* 2013;91(1):40-51.
338. Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE. MSCs: Delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. *Stem Cells Int.* 2013;2013:732742.
339. Wu J, Wang Q, Fu X, Wu X, Gu C, Bi J, et al. Influence of immunogenicity of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells on bone tissue engineering. *Cell Transplant.* 2016;25(2):229-42.
340. Baron F, Storb R. Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(6):822-40.
341. Berner A, Reichert JC, Woodruff MA, Saifzadeh S, Morris AJ, Epari DR, et al. Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta Biomater.* 2013;9(8):7874-84.
342. Kim S, Han YS, Lee JH, Lee SH. Combination of MSC spheroids wrapped within autologous composite sheet dually protects against immune rejection and enhances stem cell transplantation efficacy. *Tissue Cell.* 2018;53:93-103.
343. Preda MB, Neculachi CA, Fenyó IM, Vacaru AM, Publik MA, Simionescu M, et al. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. *Cell Death Dis.* 2021;12(6):566.
344. Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(10):1799-802.
345. Luk F, de Witte SFH, Korevaar SS, Roemeling-van Rhijn M, Franquesa M, Strini T, et al. Inactivated mesenchymal stem cells maintain immunomodulatory capacity. *Stem Cells Dev.* 2016;25(18):1342-54.
346. Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med.* 2017;9(416):eaam7828.
347. Vagnozzi RJ, Maillet M, Sargent MA, Khalil H, Johansen AKZ, Schwanekamp JA, et al. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy. *Nature.* 2020; 577(7790):405-9.
348. Weiss ARR, Lee O, Eggenhofer E, Geissler E, Korevaar SS, Soeder Y, et al. Differential effects of heat-inactivated, secretome-deficient MSC and metabolically active MSC in sepsis and allogeneic heart transplantation. *Stem Cells.* 2020;38(6):797-807.
349. de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Gargasha M, Merino A, Korevaar SS, et al. Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (msc) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells. *Stem Cells.* 2018;36(4):602-15.

350. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 2009;18(5):683-92.
351. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc.* 2007;39(2):573-6.
352. Dreger T, Watson JT, DVM WA, Molligan J, Achilefu S, Schon LC, et al. Intravenous application of CD271-selected mesenchymal stem cells during fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2014;28(01):S15-9.
353. Braid LR, Wood CA, Wiese DM, Ford BN. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy.* 2018;20(2):232-44.
354. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 2009;5(1):54-63.
355. Poltavtseva RA, Poltavtsev AV, Lutsenko GV, Svirshchevskaya EV. Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy. *Cell Tissue Res.* 2019;375(3):563-74.
356. Cui L li, Kerkelä E, Bakreen A, Nitzsche F, Andrzejewska A, Nowakowski A, et al. The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):11.
357. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells.* 2019;8(8):784.
358. Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(1):51-8.
359. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):824-33.
360. Luo Y, Wang B, Liu J, Ma F, Luo D, Zheng Z, et al. Ginsenoside RG1 enhances the paracrine effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on radiation induced intestinal injury. *Aging (Albany NY).* 2020;13(1):1132-52.
361. Cao W, Cao K, Cao J, Wang Y, Shi Y. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. *Immunol Lett.* 2015;168(2):147-53.
362. Carreras-Planella L, Monguió-Tortajada M, Borràs FE, Franquesa M. Immunomodulatory effect of MSC on B cells is independent of secreted extracellular vesicles. *Front Immunol.* 2019;10:1288.
363. Wu Y, Huang F, Zhou X, Yu S, Tang Q, Li S, et al. Hypoxic Preconditioning enhances dental pulp stem cell therapy for infection-caused bone destruction. *Tissue Eng Part A.* 2016; 22(19-20):1191-203.

364. Killington K, Mafi R, Mafi P, Khan WS. A Systematic review of clinical studies investigating mesenchymal stem cells for fracture non-union and bone defects. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018;13(4):284-91.
365. Khan S, Peracha A, Abro AA, Sufyan M, Rahim Najjad MK, Aziz S, et al. Clinical studies investigating the role of mesenchymal stem cells in healing of fracture non-unions: a systematic review. *J Pak Med Assoc.* 2023;73(Suppl 1)(2):S26-31.
366. Mott A, Mitchell A, McDaid C, Harden M, Gruppung R, Dean A, et al. Systematic review assessing the evidence for the use of stem cells in fracture healing. *Bone Jt Open.* 2020;1(10):628-38.
367. Qi C, Yan X, Huang C, Melerzanov A, Du Y. Biomaterials as carrier, barrier and reactor for cell based regenerative medicine. *Protein Cell.* 2015;6(9):638-53.
368. Toosi S, Behravan N, Behravan J. Nonunion fractures, mesenchymal stem cells and bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106(9):2552-62.
369. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;78:1246-62.
370. Wu S, Liu X, Yeung K, Liu C, Yang X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports.* 2014;80:1-36.
371. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408.
372. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(6):485-502.
373. Gao C, Peng S, Feng P, Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* 2017;5(1):1-33.
374. Miguez-Pacheco V, Hench LL, Boccaccini AR. Bioactive glasses beyond bone and teeth: emerging applications in contact with soft tissues. *Acta Biomater.* 2015;13:1-15.
375. Asti A, Gioglio L. Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *Int J Artif Organs.* 2014;37(3):187-205.
376. Ali Akbari Ghavimi S, Ebrahimzadeh MH, Solati-Hashjin M, Abu Osman NA. Polycaprolactone/starch composite: fabrication, structure, properties, and applications. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(7):2482-98.
377. Hung BP, Naved BA, Nyberg EL, Dias M, Holmes CA, Elisseff JH, et al. Three-dimensional printing of bone extracellular matrix for craniofacial regeneration. *ACS Biomater Sci Eng.* 2016;2(10):1806-16.
378. Meseguer-Olmo L, Vicente-Ortega V, Alcaraz-Baños M, Calvo-Guirado JL, Vallet-Regí M, Arcos D, et al. In-vivo behavior of Si-hydroxyapatite/polycaprolactone/DMB scaffolds fabricated by 3D printing. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101A(7):2038-48.

Bibliografía

379. Natividad-Pedreño M, Nuñez-Chia A, Cobo-Valenzuela N, Alcantara-Martos T, Carrascal MT, Delgado-Martinez AD. Effect of cefazolin and cefuroxime on fracture healing in rats. *Injury*. 2016;47:S3-6.
380. Centeno CJ, Schultz JR, Cheever M, Freeman M, Robinson B. A case series of percutaneous treatment of non-union fractures with autologous, culture expanded, bone marrow derived, mesenchymal stem cells and platelet lysate. *J Bioengineer & Biomedical Sci*. 2011;S2:007.
381. Cevolani L, Bianchi G, Costantino E, Staals E, Lucarelli E, Spazzoli B, et al. Minimally invasive treatment of long bone non-unions with bone marrow concentrate, demineralized bone matrix and platelet-rich fibrin in 38 patients. *J Tissue Eng Regen Med*. 2021;15(10):831-40.
382. Dilogio IH, Phedy P, Kholinne E, Djaja YP, Fiolin J, Kusnadi Y, et al. Autologous mesenchymal stem cell implantation, hydroxyapatite, bone morphogenetic protein-2, and internal fixation for treating critical-sized defects: a translational study. *Int Orthop*. 2019;43(6):1509-19.
383. Emadedin M, Labibzadeh N, Fazeli R, Mohseni F, Hosseini SE, Moghadasali R, et al. Percutaneous autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell implantation is safe for reconstruction of human lower limb long bone atrophic nonunion. *Cell J*. 2017;19(1):159-65.
384. Fernandez-Bances I, Perez-Basterrechea M, Perez-Lopez S, Nuñez Batalla D, Fernandez Rodriguez MA, Alvarez-Viejo M, et al. Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft. *Cytotherapy*. 2013;15(5):571-7.
385. Flouzat-Lachaniette CH, Heyberger C, Bouthors C, Roubineau F, Chevallier N, Rouard H, et al. Osteogenic progenitors in bone marrow aspirates have clinical potential for tibial non-unions healing in diabetic patients. *Int Orthop*. 2016;40(7):1375-9.
386. Giannotti S, Trombi L, Bottai V, Ghilardi M, D'Alessandro D, Danti S, et al. Use of autologous human mesenchymal stromal cell/fibrin clot constructs in upper limb non-unions: long-term assessment. *PLoS One*. 2013;8(8):e73893.
387. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(7):1430-7.
388. Hernigou P, Guissou I, Homma Y, Poignard A, Chevallier N, Rouard H, et al. Percutaneous injection of bone marrow mesenchymal stem cells for ankle non-unions decreases complications in patients with diabetes. *Int Orthop*. 2015;39(8):1639-43.
389. Ismail HD, Phedy P, Kholinne E, Djaja YP, Kusnadi Y, Merlina M, et al. Mesenchymal stem cell implantation in atrophic nonunion of the long bones: a translational study. *Bone Joint Res*. 2016;5(7):287-93.
390. Labibzadeh N, Emadedin M, Fazeli R, Mohseni F, Hosseini SE, Moghadasali R, et al. Mesenchymal stromal cells implantation in combination with platelet lysate product is safe for reconstruction of human long bone nonunion. *Cell J*. 2016;18(3):302-9.
391. Hau LTT, Bui DP, Nguyen DT, Pham DN, Le QB, Nguyen PH, et al. Autologous bone marrow stem cells combined with allograft cancellous bone in treatment of nonunion. *Biomed Res Ther*. 2015;2(12):409-17.

Bibliografía

392. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 2007;13(5):947-55.
393. Singh AK, Shetty S, Saraswathy JJ, Sinha A. Percutaneous autologous bone marrow injections for delayed or non-union of bones. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2013;21(1):60-4.
394. Toro G, Lepore F, Calabrò G, Toro G, Rossini M, Vasso M, et al. Humeral shaft non-union in the elderly: results with cortical graft plus stem cells. *Injury.* 2019;50 Suppl 2:S75-9.
395. Wittig O, Romano E, González C, Diaz-Solano D, Marquez ME, Tovar P, et al. A method of treatment for nonunion after fractures using mesenchymal stromal cells loaded on collagen microspheres and incorporated into platelet-rich plasma clots. *Int Orthop.* 2016;40(5):1033-8.
396. Hernigou P, Homma Y, Flouzat-Lachaniette CH, Poignard A, Chevallier N, Rouard H. Cancer risk is not increased in patients treated for orthopaedic diseases with autologous bone marrow cell concentrate. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(24):2215-21.
397. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood.* 2010;115(8):1549-53.
398. Connolly JF, Shindell R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr Med J.* 1986;71(4):105-7.
399. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 2001;344(5):385-6.
400. Gómez-Barrena E, Rosset P, Gebhard F, Hernigou P, Baldini N, Rouard H, et al. Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. *Biomaterials.* 2019;196:100-8.
401. Whelan DB, Bhandari M, McKee MD, Guyatt GH, Kreder HJ, Stephen D, et al. Interobserver and intraobserver variation in the assessment of the healing of tibial fractures after intramedullary fixation. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84(1):15-8.
402. Papanagiotou M, Dailiana ZH, Karachalios T, Varitimidis S, Vlychou M, Hantes M, et al. RhBMP-7 for the treatment of nonunion of fractures of long bones. *Bone Joint J.* 2015;97-B(7):997-1003.

10 ANEXOS

10 ANEXOS

ANEXO I

CERTIFICADO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN FINANCIADO MEDIANTE UNA BECA DEL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (PI16/00915)



D. FRANCISCO GALO PERALTA, DIRECTOR DE GESTIÓN DE LA FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA (IDIVAL)

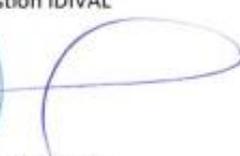
CERTIFICA:

Que, examinados los antecedentes obrantes en nuestros archivos resulta que **D^a. Esther Laguna Bercero**, con D.N.I. 25.459.344-T, participa como **investigadora colaboradora** en el siguiente proyecto de investigación:

- *“Estudio de las células troncales mesenquimales en la osteoporosis: Papel de los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y potencial regenerativo” (expte. PI16/00915)* siendo el investigador principal el **Dr. José Antonio Riancho Moral**, y financiado por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) mediante *“Resolución de 30 de noviembre de 2016 del Director del Instituto de Salud Carlos III, por la que se conceden subvenciones para Proyectos de Investigación en Salud (Modalidad Proyectos de Investigación en Salud) de la convocatoria 2016 de la Acción Estratégica en Salud 2013-2016, regulada por Resolución del Instituto de Salud Carlos III de 28 de marzo de 2016 (Extracto publicado en el BOE 01/04/2016 - código BDNS 302836) y Orden ECC/1051/2013, de 7 de junio (BOE Núm. 139) de Bases Reguladoras”*, desde 1 de enero de 2017 y por una duración de 3 años.

Y para que así conste, a petición de la interesada, se extiende la presente certificación en Santander, a 2 de marzo de 2018.

El Director de Gestión IDIVAL



Fdo. Galo Peralta Fernández

ANEXO II

INFORME DEL COMITÉ DE BIOÉTICA PARA EL ESTUDIO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL



**INFORME DEL COMITÉ DE BIOÉTICA
DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

Nº de registro: 2016/14

Datos de la solicitud:

Investigador principal: José Antonio Riancho Moral

Título del proyecto de investigación: Estudio de las células troncales mesenquimales en la osteoporosis: papel de los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y potencial regenerativo

Duración y lugar de realización del proyecto: 15/01/2017 a 15/12/2019, Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria

Informe:

El Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria, reunido el día 22 de noviembre de 2016, ha evaluado toda la documentación aportada por el investigador principal en la solicitud de referencia, conforme a lo establecido en el artículo 34. 2 del “*Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia*”, verificando que dicho proyecto cumple los siguientes requisitos:

1. Está justificado desde el punto de vista científico.
2. Su finalidad justifica la utilización de animales.
3. Está diseñado de manera que los procedimientos son humanitarios y respetuosos con el medio ambiente.

En virtud de lo cual el citado Comité ha resuelto emitir el informe FAVORABLE para la realización del proyecto de experimentación animal reseñado.

En Santander, a 23 de noviembre 2016

Presidente del Comité de Bioética

Prof. Juan M. García Lobo



Secretario del Comité

Prof. Alvaro Díaz Martínez

ANEXO III

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA EXTRACCIÓN DE MSCs

CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO GENETICO OSTEOPOROSIS-ARTROSIS

D.....

He sido informado por el Dr..... de que se está realizando un estudio de investigación sobre las causas y los mecanismos que favorecen la aparición de enfermedades de los huesos, como la artrosis y la osteoporosis, y en particular el papel de la herencia.

- Por ello, doy el consentimiento para participar en dicho estudio, que supone recoger datos sobre mis hábitos y enfermedades (o de mi familiar.....) y efectuar un análisis de sangre.
- Por ello, doy el consentimiento para que los facultativos del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla recojan con fines de investigación los fragmentos de hueso desechados durante la operación de colocación de prótesis de cadera o rodilla que se me va a realizar, a fin de que puedan ser utilizados para dicho estudio.

Entiendo que:

- Estos procedimientos no tienen riesgos significativos, aunque la extracción de sangre puede producir algunas molestias en el brazo.
- Ello no supone ninguna modificación del procedimiento a emplear en mi durante la intervención quirúrgica.
- No tiene ninguna repercusión negativa en el diagnóstico, el tratamiento o cualquier aspecto de la evolución de la enfermedad.
- El hueso se utilizará únicamente con fines de investigación científica, descartando cualquier uso comercial del mismo.
- Los datos se manejarán de forma privada, confidencial y genérica, sin nombres que puedan asociar mi persona con los resultados.
- Mi participación es voluntaria, tengo derecho al acceso a todos mis datos y podré modificar este consentimiento cuando lo desee.

Firma, fecha

ANEXO IV

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA PARA EL ESTUDIO DE EXPERIMENTACIÓN EN HUMANOS



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN
CLÍNICA DE CANTABRIA
IDIVAL



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretario/a del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Estudio de las células troncales mesenquimales en la osteoporosis: Papel de los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y potencial regenerativo.

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: 2016.159)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como Investigador principal el Dr./Dra. **JOSÉ ANTONIO RIANCHO MORAL**.

Como queda reflejado en el Acta: **16/2016**.

Lo que firmo en Santander, a **07 de octubre de 2016**

T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
Secretario/a del CEIC



ANEXO V

PUBLICACIÓN

Effects of systemic or local administration of mesenchymal stem cells from patients with osteoporosis or osteoarthritis on femoral fracture healing in a mouse model.

Laguna E, Pérez-Núñez MI, Del Real Á, Menéndez G, Sáinz-Aja JA, López-Delgado L, Sañudo C, Martín A, Mazorra R, Ferreño D, García-Montesinos B, Riancho JA.

Biomolecules 2022, Vol. 12 (5), 722.

<https://doi.org/10.3390/biom12050722>

Article

Effects of Systemic or Local Administration of Mesenchymal Stem Cells from Patients with Osteoporosis or Osteoarthritis on Femoral Fracture Healing in a Mouse Model

Esther Laguna ^{1,*,†}, María Isabel Pérez-Núñez ^{1,†}, Álvaro del Real ^{2,†}, Guillermo Menéndez ¹, José A. Sáinz-Aja ³, Laura López-Delgado ⁴, Carolina Sañudo ⁵, Alicia Martín ⁵, Remigio Mazorra ⁶, Diego Ferreño ³, Belén García-Montesinos ⁷ and José A. Riancho ⁴



Citation: Laguna, E.; Pérez-Núñez, M.I.; del Real, Á.; Menéndez, G.; Sáinz-Aja, J.A.; López-Delgado, L.; Sañudo, C.; Martín, A.; Mazorra, R.; Ferreño, D.; et al. Effects of Systemic or Local Administration of Mesenchymal Stem Cells from Patients with Osteoporosis or Osteoarthritis on Femoral Fracture Healing in a Mouse Model. *Biomolecules* **2022**, *12*, 722. <https://doi.org/10.3390/biom12050722>

Academic Editor: Huseyin Sumer

Received: 21 April 2022

Accepted: 16 May 2022

Published: 19 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39008 Santander, Spain; perezmi@unican.es (M.I.P.-N.); guillermo.menendez@scsalud.es (G.M.)
 - ² Departamento de Medicina y Psiquiatría, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain; delreal@unican.es
 - ³ Laboratorio de la División de Ciencia e Ingeniería de los Materiales (LADICIM), Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, Universidad de Cantabria, 39005 Santander, Spain; jose.sainz-aja@unican.es (J.A.S.-A.); diego.ferreno@unican.es (D.F.)
 - ⁴ Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain; lauralopdel@gmail.com (L.L.-D.); jose.riancho@unican.es (J.A.R.)
 - ⁵ Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain; carolinasanudo@gmail.com (C.S.); martinrebolloalicia@gmail.com (A.M.)
 - ⁶ Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; remigio.mazorra@scsalud.es
 - ⁷ Servicio de Cirugía Maxilofacial, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; belenm.garciamontesinos@scsalud.es
- * Correspondence: laguname@unican.es
 † These authors contributed equally to this work.

Abstract: The purpose of this study was to analyze the regenerative capacity of mesenchymal stem cells (MSCs) in the treatment of fractures. MSCs extracted from patients with osteoporotic hip fractures or hip osteoarthritis undergoing hip replacement surgeries were cultured and injected into mice with femoral fracture. Two experimental models were established, one for the systemic administration of MSCs ($n = 29$) and another one for local administration ($n = 30$). Fracture consolidation was assessed by micro-CT and histology. The degree of radiological consolidation and corticalization was better with MSCs from osteoporosis than from osteoarthritis, being significant after systemic administration ($p = 0.0302$ consolidation; $p = 0.0243$ corticalization). The histological degree of consolidation was also better with MSCs from osteoporosis than from osteoarthritis. Differences in histological scores after systemic infusion were as follows: Allen, $p = 0.0278$; Huo, $p = 0.3471$; and Bone Bridge, $p = 0.0935$. After local administration at the fracture site, differences in histological scores were as follows: Allen, $p = 0.0764$; Huo, $p = 0.0256$; and Bone Bridge, $p = 0.0012$. As osteoporosis and control groups were similar, those differences depended on an inhibitory influence by MSCs from patients with osteoarthritis. In conclusion, we found an unexpected impairment of consolidation induced by MSCs from patients with osteoarthritis. However, MSCs from patients with osteoporosis compared favorably with cells from patients with osteoarthritis. In other words, based on this study and previous studies, MSCs from patients with osteoporosis do not appear to have worse bone-regenerating capabilities than MSCs from non-osteoporotic individuals of similar age.

Keywords: mesenchymal stem cells; bone regeneration; animal model; micro-CT; histological study

1. Introduction

Failure of the bone healing process after fracture is estimated at 5–10%, which represents a significant clinical and economic impact [1,2].

The treatment of consolidation problems is a great challenge. Alternative therapies to the “gold standard”, which continues to be autologous iliac crest grafting, are being investigated [2,3]. Among these, cell therapies with MSCs represent an attractive option because they are the natural source of osteoblastic precursors [4–6].

MSCs are often isolated from the mononuclear cells present in bone marrow washings or aspirates, taking advantage of their tendency to adhere to plastic surfaces. MSCs can be maintained in culture for more than 20 divisions and expand up to 10^9 times. However, repeated passages in culture can lead to epigenetic and phenotypic changes [7]. MSCs can impact fracture consolidation in several ways. They are able to migrate, preferentially, to skeletal lesions, releasing cytokines and growth factors that exert anabolic actions on target tissues [8–12]. By differentiating these cells into osteoblastic precursors and subsequently mature musculoskeletal cells, they are then able to form new bone tissue and repair skeletal defects [13,14].

The efficiency of MSCs in bone regeneration is reflected in the numerous studies and clinical trials that currently exist [15–18]. MSCs can be administered either directly into the fracture site or by systemic injection. Preliminary studies from our group suggest that MSCs from patients with osteoporotic fractures may be actively differentiated into osteoblasts *in vitro*, which represents an argument for considering MSCs as a promising therapeutic tool for treating consolidation disorders [19]. However, since cells from elderly patients may experience senescence-associated changes, before proposing this therapy as valid, their regenerative capacity should be tested *in vivo* [20–22].

Therefore, this study aimed to evaluate, from the radiological and histological points of view, the consolidation of an experimental fracture treated with MSCs, investigating possible differences related to either the route of administration (systemic or local) or the source of the cells (osteoporosis or osteoarthritis).

2. Materials and Methods

2.1. Isolation and Culture of Human MSCs

MSCs were obtained from the femoral heads of patients undergoing hip replacement surgery because of osteoporotic hip fracture or osteoarthritis, establishing two experimental groups. Patients with high-energy trauma, secondary osteoporosis and secondary osteoarthritis were excluded. The mean age of both patient groups was 82.65 (osteoporosis) and 71.68 (osteoarthritis). The study was approved by the Ethics Committee in Clinical Research of Cantabria and the donors gave their written informed consent.

Trabecular bone fragments from the central part of the femoral head were obtained with a trephine and washed with 50 mL of phosphate-buffered saline (PBS). The suspended cells were separated using Ficoll gradient centrifugation. Cells at the interface were cultured on polystyrene culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). This medium was supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1% of Amphotericin A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells from passages 2–3 were used for the experiments.

2.2. Experimental Animals and Surgical Procedures

Immunodeficient NOD.CB17-Prkdc scid/J mice were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). The colony was housed at the animal housing and experimentation service of the University of Cantabria, under aseptic conditions and veterinary control. The animal experimental protocol was approved by the Research Ethics Committee of the University and the Health Council of Cantabria, as established by current regulations. Surgery was performed on 8-week-old mice, weighing 24–48 g, after intraperitoneal anesthesia and antibiotic. Through a lateral approach to the femur, a complete open

osteotomy was performed at the level of the middle third of the right femur by cutting with a number 15 scalpel. The fracture was stabilized by retrograde nailing from the knee (intercondylar region) with a 27 G needle. Subsequently, the periosteum was cauterized at 800 °C with a portable bipolar electrocautery to slow down the bone healing process. Sedation was reversed and postoperative analgesia was administered. The animals were sacrificed 4 weeks after surgery to extract the femurs under study (Figure 1).

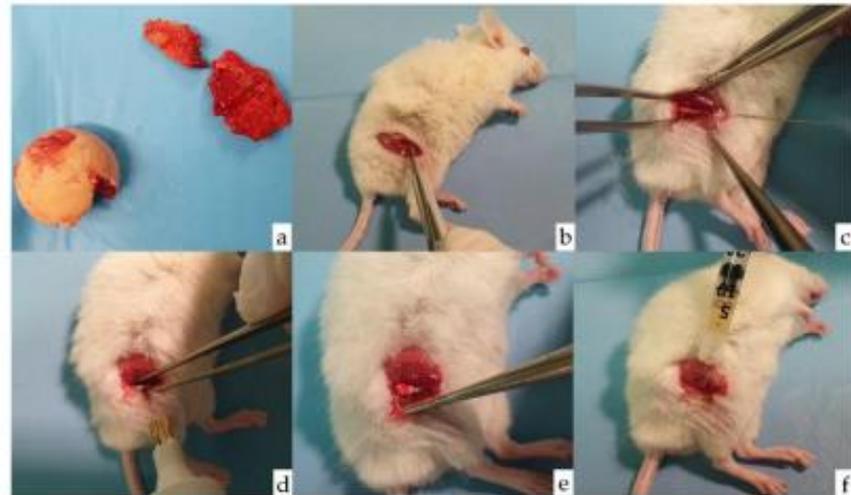


Figure 1. Surgical procedure. (a) Femoral head and neck of prosthetic replacement surgery that serves for extraction of bone cylinders and culture of MSCs. (b) Transverse osteotomy of the femur. (c) Retrograde 27 G needle insertion. (d) Cauterization of the fracture focus at periosteum level. (e) Addition of a collagen patch (Lyostypt[®], Braun-Aesculap, Tuttlingen, Germany) to prevent cell migration. (f) Local injection of MSCs in Model B.

2.3. Experimental Groups

Mice were randomly divided into two experimental models: model A, for systemic administration of MSCs ($n = 29$); and model B, for local administration of MSCs ($n = 30$). In both groups, cells were injected through a 25 G needle and cells from a single patient were infused into each mouse.

Model A was further divided into group A1 (control group, $n = 13$) injected with 0.1 mL of cell-free saline; group A2 (osteoporosis group, $n = 8$) injected with 10^6 MSCs resuspended in 0.1 mL of saline, cultured from patients with osteoporosis; and group A3 (osteoarthritis group, $n = 8$) injected with 10^6 MSCs resuspended in 0.1 mL of saline, cultured from patients with osteoarthritis. MSCs were injected retro-orbitally on postoperative day 2.

Model B was divided into group B1 (control group, $n = 11$) injected with 0.1 mL of cell-free saline; group B2 (osteoporosis group, $n = 9$) injected with 10^6 MSCs resuspended in 0.1 mL of saline, cultured from patients with osteoporosis; and group B3 (osteoarthritis group, $n = 10$) injected with 10^6 MSCs resuspended in 0.1 mL of saline, cultured from patients with osteoarthritis. Cells were applied to the fracture site during surgery, with the addition of a collagen patch (Lyostypt[®]) to prevent cell migration.

2.4. Radiological Analysis

The femurs were scanned with the high-resolution micro-CT scanner Skyscan1172 (Bruker-microCT, Kontich, Belgium) with a resolution of 6 μm . A 2D analysis of the callus was performed with the CTAn[®] program (v.1.18) to obtain the BV/TV (Bone Volume/Tissue Volume) ratio, which is proportional to the bone mass. We obtained two data: BV/TV callus + cortical (which refers to the complete callus, including the primary cortex) and

BV/TV callus (from which the primary cortex is subtracted). The CTVox[®] program (v.1.5) performed a 3D reconstruction, from which we selected orthogonal-coronal and sagittal views crossing at the center of the bone, to assess the four cortices around the bony callus. The assessment was carried out by four independent observers who were unaware of the treatment group. In case of discrepant scores, images were reviewed until a consensus was reached. Consolidation and corticalization of the fracture callus were assessed. To score consolidation, one point was awarded for each cortex showing a Bone Bridge between fracture edges (0–4). Callus corticalization was defined by the presence of a well-defined layer of cortical bone at the outer limit of the callus, and one point was given for each consolidated cortex at the orthogonal views of the callus (0–4).

2.5. Histological Analysis

After fixation in formalin, femurs were preserved in ethanol and decalcified. Then, the intramedullary needles were removed, and bone was embedded in paraffin blocks. Sections of 3 μ m were cut and stained with hematoxylin–eosin.

Histological sections were evaluated using two semi-quantitative numerical scales, proposed by Allen and Huo [23,24]. In addition, the presence or absence of bone bridging in the two cortices observed has been considered (Table 1).

Table 1. Histological scores. Allen score, Huo score and Bone Bridge score to assess histological consolidation.

ALLEN	
Score	Histological Findings
1	Pseudoarthrosis: fibrous tissue between the fragments
2	Incomplete union: fibrous and cartilaginous tissue
3	Complete union with cartilaginous tissue
4	Incomplete bone union with areas of ossification: the equivalent amount of cartilage and trabecular bone
5	Incomplete bone union with a predominance of bone cells
6	Complete bone consolidation: bone between both bone fragments
HUO	
Score	Histological findings
1	Fibrous tissue
2	Predominantly fibrous tissue with a small amount of cartilage
3	An equal mixture of fibrous and cartilaginous tissue
4	Predominantly cartilage with a small amount of fibrous tissue
5	Cartilage
6	Predominantly cartilage with a small amount of immature bone
7	An equal mixture of cartilage and immature bone
8	Predominantly immature bone with a small amount of cartilage
9	Union of fracture fragments by immature bone
10	Union of fracture fragments by mature bone
BONE BRIDGE	
Score	Histological findings
0	No bone bridge
1	Bone bridge in one cortex
2	Bone bridge in two cortices

2.6. Data Analysis

Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests were used for the statistical comparison of between-group differences. Non-parametric tests were used because the sample size was small, and we were not able to ascertain the distribution of the data. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Radiological Study

When analyzing the BV/TV we did not find differences between subgroups 1 (control), 2 (osteoporosis) or 3 (osteoarthritis), within each administration group, systemic (A) or local (B). However, all parameters (callus + cortical BV/TV and callus only BV/TV) were higher in the local administration group ($p < 0.05$). When callus + cortical BV/TV callus was studied, the between-group pairwise comparisons were as follows: A1-B1— $p = 0.0011$; A2-B2— $p = 0.0069$; and A3-B3 $p = 0.0223$. When callus only BV/TV was analyzed, the p -values of the comparisons were as follows: A1-B1— $p = 0.0001$; A2-B2— $p = 0.0069$; and A3-B3— $p = 0.0157$ (Figure 2).

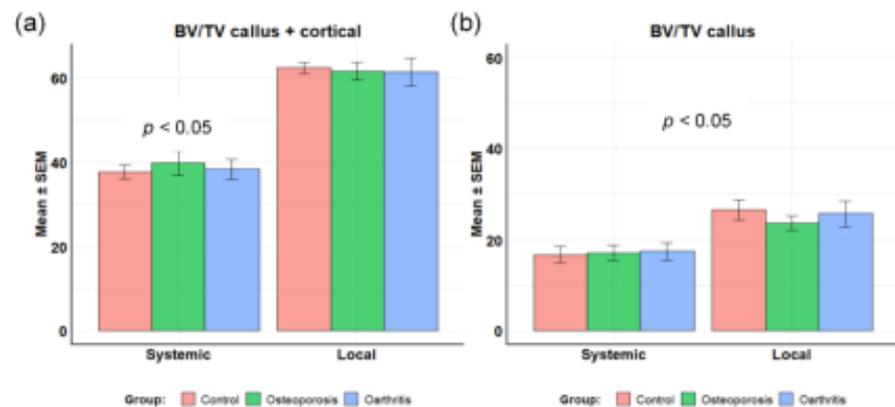


Figure 2. BV/TV of the callus region. (a) Callus+cortical BV/TV; (b) callus only BV/TV.

The analysis of consolidation and corticalization of model A (systemic administration) were as follows. Consolidation [median (IQR)]: control—4.0 (3.0–4.0); osteoporosis—3.5 (2.3–4.0); and osteoarthritis 0.5 (0–2.3). Corticalization: control—2.0 (1.0–3.0); osteoporosis—1.5 (0–2.0); and osteoarthritis—0 (0–0.3). The scores for MSCs grown from patients with osteoporosis were significantly better than those for MSCs from patients with osteoarthritis ($p = 0.0302$ consolidation; $p = 0.0243$ corticalization). The comparisons of osteoporosis and control groups did not show significant differences (Figure 3).

Consolidation scores in model B (local administration) were: control—4.0 (3.0–4.0); osteoporosis—4.0 (3.0–4.0); and osteoarthritis—3.0 (2.3–3.8). The corticalization scores were: control—2.0 (1.0–2.0); osteoporosis—1.0 (0.3–1.8); and osteoarthritis—1.0 (0.3–1.8). Although the scores tended to be better in the MSCs from patients with osteoporosis than osteoarthritis, the differences did not reach statistical significance ($p = 0.1771$ consolidation; $p = 0.2503$ corticalization). Likewise, there were no significant differences between the treatment and control groups (Figure 4).

As expected, the overall comparisons of Models A and B showed no significant differences in control subgroups that did not receive MSCs either by the systemic or the local routes. On the contrary, in animals who were transplanted with MSCs, those receiving MSCs by the systemic route tended to have somewhat lower (albeit not statistically significant) consolidation scores than those receiving MSCs locally, particularly in the case of MSCs grown from patients with osteoarthritis ($p = 0.0993$ – 0.6977).

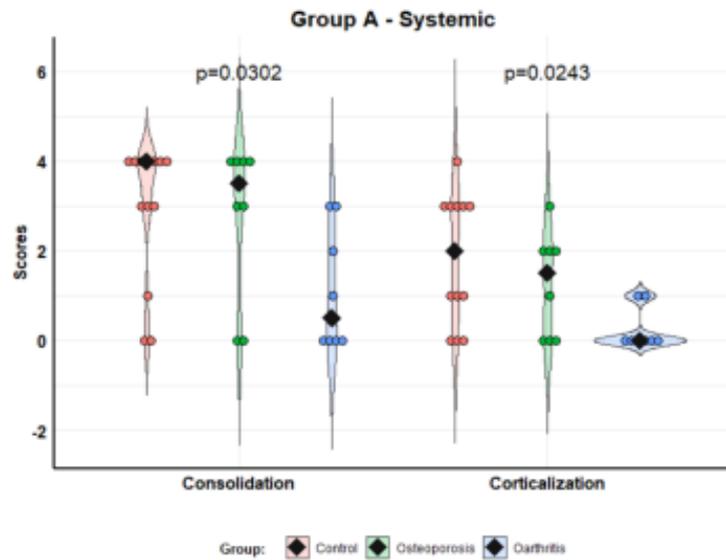


Figure 3. Scores of consolidation and corticalization in model A (systemic administration). Violin plots with individual values and medians (rhombi).

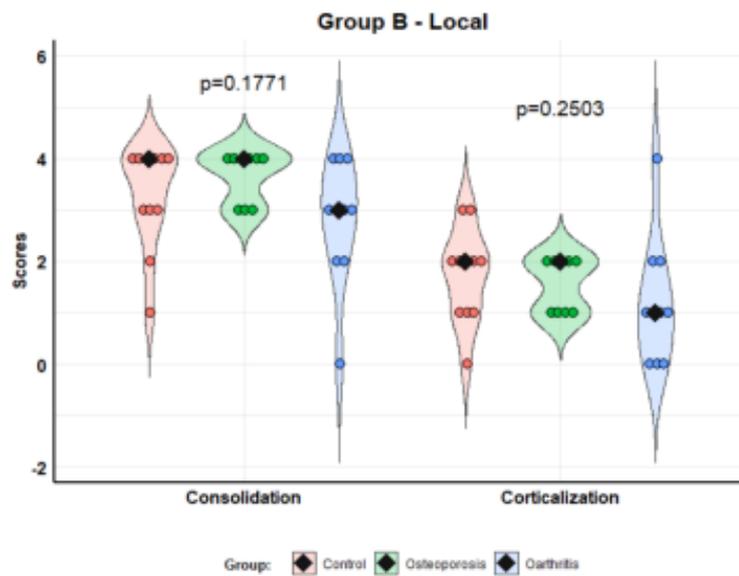


Figure 4. Scores of consolidation and corticalization in model B (local administration). Violin plots with individual values and medians (rhombi).

The next figure shows several examples of micro-CT studies in different experimental groups (Figure 5).

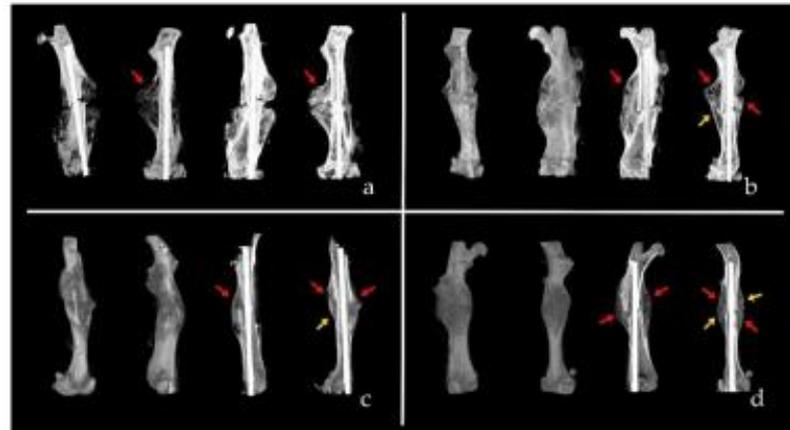


Figure 5. Several examples of consolidation and corticalization scores. **(a)** CT of group A3 (systemic administration of MSCs from osteoarthritis). Score 1-0: One cortex is consolidated and no one corticalized. **(b)** CT of group A2 (systemic administration of MSCs from osteoporosis). Score 3-1: Three consolidated cortices and one corticalized. **(c)** CT of group B3 (local administration of MSCs from osteoarthritis). Score 3-1: Three consolidated cortices and one corticalized. **(d)** CT of group B2 (local administration of MSCs from osteoporosis). Score 4-2: Four consolidated cortices and two corticalized. Red arrows are consolidated cortices and yellow arrows are corticalized cortices.

3.2. Fracture Histology

In the systemic administration group (Model A), the histological analysis (Allen, Huo and Bone Bridge scores) showed better scores in animals receiving MSCs from osteoporosis than in those injected with MSCs from patients with osteoarthritis; this difference was significant regarding Allen ($p = 0.0278$) and Huo ($p = 0.0347$) scores, but not in Bone Bridge ($p = 0.0935$) scores. We found no differences between the control group and the osteoporosis group (Figure 6).

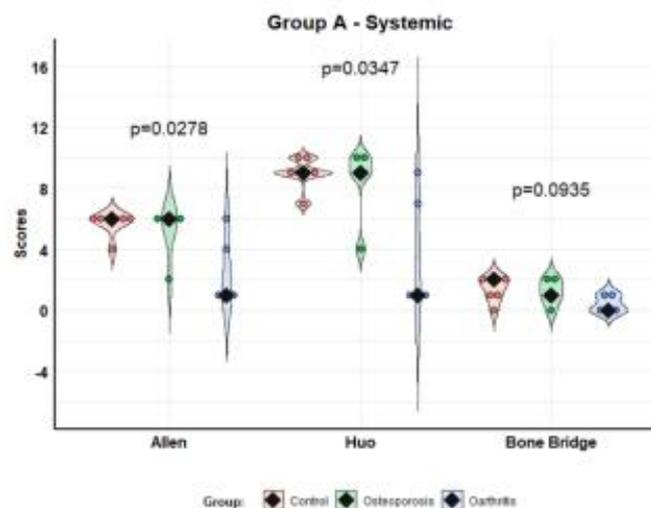


Figure 6. Histological scores according to Allen, Huo and Bone Bridge scales for Model A (systemic administration). Violin plots with individual values and medians (rhombi).

In the local administration group (Model B), the analysis of histological results also showed better scores with MSCs from osteoporosis than MSCs from osteoarthritis, although

this improvement was not so striking. The difference was significant in the Huo ($p = 0.0256$) and Bone Bridge ($p = 0.0012$) scores, but not in the Allen ($p = 0.0764$) score. We found no differences between the control group and the osteoporosis group (Figure 7).

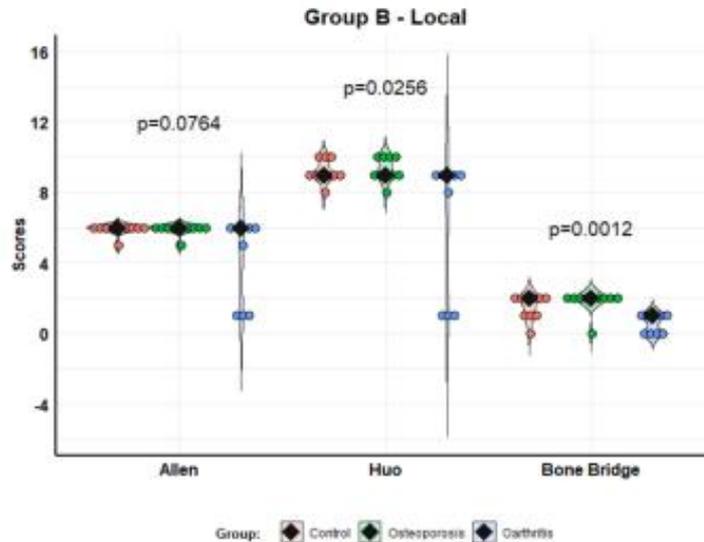


Figure 7. Histological scores according to Allen, Huo and Bone Bridge scales for Model B (local administration). Violin plots with individual values and medians (rhombi).

In the pairwise analysis comparing systemic and local administration of MSCs, we found no differences in any group (control, osteoporosis, osteoarthritis) in any of the three scales (Allen, Huo, and Bone Bridge) ($p = 0.0829$ – 0.8409).

The next figure shows several examples of histological studies in different experimental groups (Figure 8).

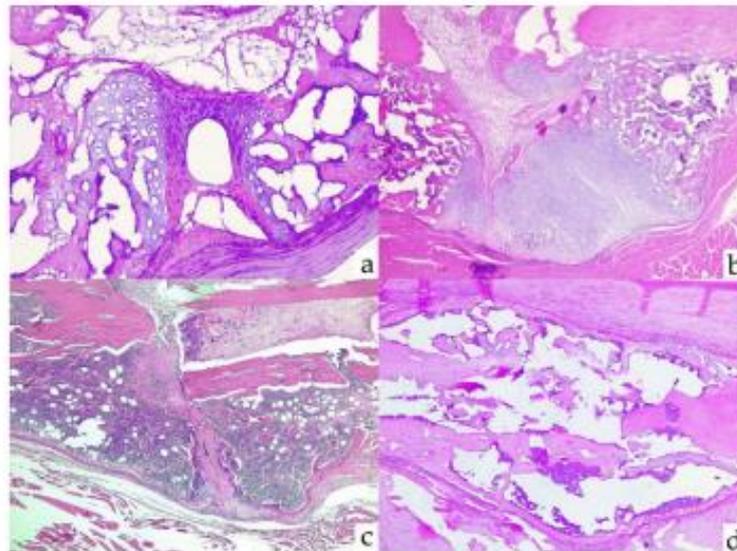


Figure 8. Several examples of histological scores. (a) Group A3: absence of consolidation. Allen 1, Huo 1, and Bone Bridge 0. (b) Group A2: incomplete consolidation with cartilage between bone

fragments. Allen 2, Huo 4, and Bone Bridge 0. (c) Group B3: immature bone and cartilage. Allen 5, Huo 8, and Bone Bridge 0. (d) Group B2: complete consolidation with bilateral bone bridge. Allen 6, Huo 10, and Bone Bridge 2.

3.3. Correlation between Radiological and Histological Study

Overall, radiological and histological scores were strongly correlated, as shown in Figure 9.

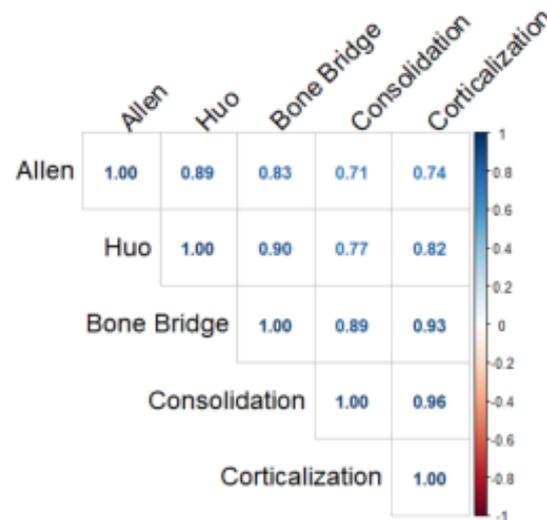


Figure 9. Spearman correlation coefficients between radiological and histological indices.

4. Discussion

As natural precursors of osteoblasts, MSCs are attractive candidates to be used in bone regeneration therapies, including the filling of bone defects, and delayed fracture consolidation. Their potential role in generalized bone disorders, such as osteoporosis, has also been postulated [25].

Autologous MSCs would be particularly attractive due to the absence of rejection and other practical and ethical problems. However, the osteogenic capacity of MSCs from osteoporosis patients and other elderly subjects has been questioned. Some studies found a decreased number of circulating osteogenic precursors and decreased activity of MSCs in osteoporotic patients and elderly people. However, others have pointed out that the mobilization and activity of MSCs is preserved in the elderly [26]. In particular, the state of senescence of the MSCs of these patients is of concern. This is emerging as an important mechanism in the pathogenesis of several age-related disorders, including osteoporosis [20,22]. In previous studies, we found that MSCs from osteoporotic patients retain the ability to undergo osteogenic differentiation and express high levels of collagen and other matrix constituents *in vitro*. However, alkaline phosphatase activity and calcium deposition are decreased in comparison with MSCs grown from patients with osteoarthritis of a similar age range [19]. Likewise, cells from osteoporotic patients and osteoarthritic patients have a similar capacity to form new bone when transplanted subcutaneously into immunodeficient mice [18].

In this study, we aimed to explore if MSC patients undergoing hip replacement improved fracture healing in a model of suboptimal fracture consolidation by using unstable endomedullary osteosynthesis. In this model, we were not able to show any beneficial effects of MSCs from patients with osteoporosis administered either intravenously or locally at the fracture site, and the radiological and histological scores of fracture consolidation were similar in control animals and in those receiving MSCs from osteoporotic patients.

On the contrary, and quite unexpectedly, animals infused with MSCs from patients with osteoarthritis showed an impairment of fracture healing scores, particularly if cells were injected intravenously.

Either by a systemic or local administration, MSCs arguably have two possible mechanisms of action. First, a direct effect using the differentiation of MSCs into osteoblasts and chondroblasts that could directly contribute to bone repair. Second, indirectly, by modulating inflammation and immune responses that participate importantly in the healing process [27,28]. In fact, MSCs release a variety of molecules, including cytokines, growth factors and miRNAs, some of them enclosed within exosomes and other extracellular vesicles, which may have paracrine and systemic regulatory effects [15]. Most MSCs injected intravenously appear to be trapped in visceral tissues, and particularly in the lungs [29–31]. This was also the case in this study (data not shown). Thus, the direct differentiation of MSCs into skeletal progenitor cells likely has little importance when MSCs are infused by this route.

The mechanisms explaining the impairment of fracture consolidation induced by MSCs from osteoarthritic patients are unclear. Nevertheless, since the effect was more marked after intravenous infusion than after local administration into the fracture site, they likely involve secondary effects mediated through the release of circulating factors. There are complex interaction networks between immune and MSCs cells. As recently reviewed by Chen et al. [32], innate immune responses provide a suitable inflammatory microenvironment for initiating fracture repair. Adaptive immune responses maintain bone regeneration and bone remodeling. MSCs and immune cells regulate each other. All kinds of immune cells and secreted cytokines can regulate the migration, proliferation and osteogenic differentiation of MSCs, which have a strong immunomodulatory ability to these immune cells. Additionally, T-cell deficiency may impair bone regeneration.

This study has several limitations. Most importantly, we used immunodeficient animals to prevent the rejection of human MSCs. As previously mentioned, cells of the immune system play an important role in fracture healing and modulate the activity of MSCs. Therefore, it is unclear if our results can be extrapolated to organisms with preserved immune responses, including patients with delayed union and non-union fractures. Due to ethical and practical reasons, we did not use MSCs from normal individuals, but compared cells from patients with osteoporosis and osteoarthritis, which tend to show bone mass changes in the opposite direction. However, this prevented us from comparing the effect of these MSCs with those of normal individuals. Additionally, following requirements to limit the number of animals used for experiments, the sample size of each group was relatively limited. This compromised the power in statistical comparisons, particularly in the context of wide interindividual variance of consolidation scores.

5. Conclusions

In our study, we were not able to demonstrate an MSCs-mediated improvement in bone healing, irrespective of the MSCs' origin. Further experiments are needed to establish whether this reflects a suboptimal fracture fixation and other drawbacks of the experimental model, or it rather reflects a true lack of effect of MSCs. Indeed, we found an unexpected impairment of consolidation induced by MSCs from patients with osteoarthritis, but the mechanisms involved remain to be elucidated. In any case, fracture healing with MSCs from patients with osteoporosis compared favorably with cells from patients with osteoarthritis. In other words, based on this and previous studies, MSCs from patients with osteoporosis do not appear to have worse bone regenerating capabilities than MSCs from non-osteoporotic individuals of similar age.

Author Contributions: Conceptualization, M.I.P.-N. and J.A.R.; methodology, E.L., M.I.P.-N., Á.d.R., G.M., L.L.-D., R.M., B.G.-M. and J.A.R.; software, Á.d.R., J.A.S.-A. and D.F.; validation, E.L., M.I.P.-N. and J.A.R.; formal analysis, Á.d.R.; investigation, E.L., M.I.P.-N., Á.d.R., G.M., L.L.-D., C.S., A.M., R.M., B.G.-M. and J.A.R.; resources, J.A.S.-A., D.F. and J.A.R.; data curation, E.L., M.I.P.-N., Á.d.R., L.L.-D., C.S. and A.M.; writing—original draft preparation, E.L.; writing—review and editing, M.I.P.-N. and J.A.R.; visualization, E.L. and Á.d.R.; supervision, M.I.P.-N. and J.A.R.; project administration, J.A.R.; funding acquisition, J.A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III [PI16-915], which can be cofunded by EU Feder funds.

Institutional Review Board Statement: The human aspects of the protocol were approved by the Ethics Committee in Clinical Research of Cantabria (code 2016-0159). The animal study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the University of Cantabria and the Health Council of Cantabria (code 2016-27930).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study as MSCs donors.

Data Availability Statement: Raw data are available from authors upon reasonable request.

Acknowledgments: Álvaro del Real received support from the postdoctoral grant “Augusto González de Linares” of the University of Cantabria.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Assiotis, A.; Sachinis, N.P.; Chalidis, B.E. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. *J. Orthop. Surg. Res.* **2012**, *7*, 24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ball, A.N.; Donahue, S.W.; Wojda, S.J.; McIlwraith, C.W.; Kawcak, C.E.; Ehrhart, N.; Goodrich, L.R. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis: Challenges of Promoting Osteogenesis. *J. Orthop. Res.* **2018**, *36*, 1559–1572. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Garcia, P.; Histing, T.; Holstein, J.H.; Klein, M.; Laschke, M.W.; Matthys, R.; Menger, M.D. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: A comprehensive review. *Eur. Cell Mater.* **2013**, *26*, 1–12, discussion 12–14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Schlickewei, C.W.; Kleinertz, H.; Thiesen, D.M.; Mader, K.; Priemel, M.; Frosch, K.-H.; Keller, J. Current and Future Concepts for the Treatment of Impaired Fracture Healing. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gómez-Barrena, E.; Rosset, P.; Lozano, D.; Stanovici, J.; Ernthaller, C.; Gerbhard, F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* **2015**, *70*, 93–101. [\[CrossRef\]](#)
- Katsimbri, P. The biology of normal bone remodeling. *Eur. J. Cancer Care* **2017**, *26*, e12740. [\[CrossRef\]](#)
- Bentivegna, A.; Roversi, G.; Riva, G.; Paoletta, L.; Redaelli, S.; Miloso, M.; Dalprà, L. The Effect of Culture on Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Focus on DNA Methylation Profiles. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 5656701. [\[CrossRef\]](#)
- Iaquinta, M.R.; Mazzoni, E.; Manfrini, M.; D’Agostino, A.; Trevisiol, L.; Nocini, R.; Trombelli, L.; Barbanti-Brodano, G.; Martini, F.; Tognon, M. Innovative biomaterials for bone regrowth. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 618. [\[CrossRef\]](#)
- Abdel Meguid, E.; Ke, Y.; Ji, J.; El-Hashash, A.H.K. Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: New insights, tools, and hopes. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 1825–1835. [\[CrossRef\]](#)
- 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* **2019**, *14*, e0225472. [\[CrossRef\]](#)
- Yang, X.; Yang, J.; Lei, P.; Wen, T. LncRNA MALAT1 shuttled by bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomes alleviates osteoporosis through mediating microRNA-34c/SATB2 axis. *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 8777–8791. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Crivelli, B.; Chlapanidas, T.; Perteghella, S.; Lucarelli, E.; Pascucci, L.; Brini, A.T.; Ferrero, I.; Marazzi, M.; Pessina, A.; Torre, A.L. Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system. *J. Control. Release* **2017**, *262*, 104–117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Han, Y.; Li, X.; Zhang, Y.; Han, Y.; Chang, F.; Ding, J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells* **2019**, *8*, 886. [\[CrossRef\]](#)
- Hou, W.; Ye, C.; Li, W.; Zhang, W.; He, R.; Zheng, Q. Bioengineering application using co-cultured mesenchymal stem cells and preosteoclasts may effectively accelerate fracture healing. *Med. Hypotheses* **2019**, *123*, 24–26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

15. Iaquina, M.R.; Mazzoni, E.; Bononi, I.; Rotondo, J.C.; Mazziotta, C.; Montesi, M.; Sprio, S.; Tampieri, A.; Tognon, M.; Martini, F. Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Brown, C.; McKee, C.; Bakshi, S.; Walker, K.; Hakman, E.; Halassy, S.; Svinarich, D.; Dodds, R.; Govind, C.K.; Chaudhry, G.R. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *13*, 1738–1755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Chan, Y.-H.; Ho, K.-N.; Lee, Y.-B.; Chou, M.-J.; Lew, W.-Z.; Huang, H.-M.; Lai, P.-C.; Feng, S.-W. Melatonin enhances osteogenic differentiation of dental pulp mesenchymal stem cells by regulating MAPK pathways and promotes the efficiency of bone regeneration in calvarial bone defects. *Stem Cell Res. Ther.* **2022**, *13*, 73. [[CrossRef](#)]
18. López-Delgado, L.; Del Real, A.; Sañudo, C.; García-Ibarbia, C.; Laguna, E.; Menendez, G.; García-Montesinos, B.; Santurtun, A.; Merino, J.; Pérez-Núñez, I.M.; et al. Osteogenic capacity of mesenchymal stem cells from patients with osteoporotic hip fractures in vivo. *Connect. Tissue Res.* **2022**, *63*, 243–255. [[CrossRef](#)]
19. Del Real, A.; Pérez-Campo, F.M.; Fernández, A.F.; Sañudo, C.; Ibarbia, C.G.; Pérez-Núñez, M.I.; Crieckinge, W.V.; Braspenning, M.; Alonso, M.A.; Fraga, M.F.; et al. Differential analysis of genome-wide methylation and gene expression in mesenchymal stem cells of patients with fractures and osteoarthritis. *Epigenetics* **2017**, *12*, 113–122. [[CrossRef](#)]
20. Farr, J.N.; Khosla, S. Cellular Senescence in Bone. *Bone* **2019**, *121*, 121–133. [[CrossRef](#)]
21. Farr, J.N.; Fraser, D.G.; Wang, H.; Jaehn, K.; Ogrodnik, M.B.; Weivoda, M.M.; Drake, M.T.; Tchkonina, T.; LeBrasseur, K.N.; Kirkland, J.L. Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *J. Bone Miner. Res.* **2016**, *31*, 1920–1929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Farr, J.N.; Xu, M.; Weivoda, M.M.; Monroe, D.G.; Fraser, D.G.; Onken, J.L.; Negley, B.A.; Sfeir, J.G.; Ogrodnik, M.B.; Hachfeld, C.M.; et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1072–1079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Allen, H.L.; Wase, A.; Bear, W.T. Indomethacin and aspirin: Effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop. Scand.* **1980**, *51*, 595–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Huo, M.H.; Troiano, N.W.; Pelker, R.R.; Gundberg, C.M.; Friedlaender, G.E. The influence of ibuprofen on fracture repair: Biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J. Orthop. Res.* **1991**, *9*, 383–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hu, L.; Yin, C.; Zhao, F.; Ali, A.; Ma, J.; Qian, A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 360. [[CrossRef](#)]
26. Iso, Y.; Yamaya, S.; Sato, T.; Poole, C.N.; Isoyama, K.; Mimura, M.; Shinji, K.; Youichi, K.; Youichi, T.; Jeffrey, L.S. Distinct mobilization of circulating CD271+ mesenchymal progenitors from hematopoietic progenitors during aging and after myocardial infarction. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 462–468. [[CrossRef](#)]
27. Watson, L.; Elliman, S.J.; Coleman, C.M. From isolation to implantation: A concise review of mesenchymal stem cell therapy in bone fracture repair. *Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *5*, 51. [[CrossRef](#)]
28. Huang, S.; Xu, L.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Li, G. Systemic and Local Administration of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Fracture Healing in Rats. *Cell Transplant.* **2015**, *24*, 2643–2655. [[CrossRef](#)]
29. Funakoshi, K.; Bagheri, M.; Zhou, M.; Suzuki, R.; Abe, H.; Akashi, H. Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13202. [[CrossRef](#)]
30. Chikate, T.R.; Tang, L. Tracking and Imaging of Transplanted Stem Cells in Animals. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2150*, 45–56. [[CrossRef](#)]
31. Real, A.D.; López-Delgado, L.; Sañudo, C.; Pérez-Núñez, M.I.; Laguna, E.; Menéndez, G.; Garcés, C.; García-Montesinos, B.; García-Ibarbia, C.; Santurtún, A.; et al. Método sensible para monitorizar la migración de las células madre mesenquimales de la médula ósea en modelos murinos. *Rev. Osteoporos Metab. Miner.* **2020**, *12*, 40–44. [[CrossRef](#)]
32. Chen, R.; Hao, Z.; Wang, Y.; Zhu, H.; Hu, Y.; Chen, T.; Zhang, P.; Li, J. Mesenchymal Stem Cell-Immune Cell Interaction and Related Modulations for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* **2022**, *2022*, 7153584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]