

Autor:

Adrián Alberto Cardín Pereda

Directora:

Flor María Pérez Campo

Tesis Doctoral

EVALUACIÓN INTEGRAL DE LA OSTEONECROSIS AVASCULAR DE LA CABEZA FEMORAL: DESDE EL DIAGNÓSTICO POR IMAGEN HASTA LA EXPLORACIÓN CELULAR Y MOLECULAR

PhD Thesis

AN INTEGRAL EVALUATION OF AVASCULAR OSTEONECROSIS OF THE FEMORAL HEAD: FROM IMAGING TO CELLULAR AND MOLECULAR DIAGNOSIS



Escuela de **Doctorado**



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
 ESCUELA DE DOCTORADO

D./D^a..... ,
 del Programa de Doctorado en..... ,
 ha defendido el día ,
 en la Universidad de.....
 su tesis doctoral titulada

dirigida por D./D^a.

y juzgada por el siguiente tribunal:

Presidente: D./D^a.

Secretario/a: D./D^a.

Vocal: D./D^a.

Y una vez vistas las actas de calificación de la tesis y las votaciones emitidas por el tribunal, la tesis obtiene la calificación de..... ,

con las siguientes características:

- Mención "Doctorado Internacional"
- Mención "Doctorado Industrial"
- Tesis en régimen de cotutela internacional

Santander,

EL PRESIDENTE,

EL SECRETARIO

EL VOCAL

Esta Tesis ha sido realizada en el Grupo de Ingeniería de Tejidos (GITC) del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria (UC), dentro de la unidad de Enfermedades Esqueléticas, Metabólicas y Ambientales (iESQUEMA) de la Fundación Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).

La Dra. Flor María Pérez Campo, Profesora Titular en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de La Universidad de Cantabria. CERTIFICA: Que el Graduado Adrián Alberto Cardín Pereda, ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral “EVALUACIÓN INTEGRAL DE LA OSTEONECROSIS AVASCULAR DE LA CABEZA FEMORAL: DESDE EL DIAGNÓSTICO POR IMAGEN LA EXPLORACIÓN CELULAR Y MOLECULAR”. Considero que este trabajo reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para su defensa como Memoria de Doctorado por el interesado, al objeto de poder optar al grado de Doctor en Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Cantabria. Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Santander a 6 de febrero de 2025,

Fdo. Flor María Pérez Campo

Agradecimientos

Este trabajo ha sido el resultado de más de seis años de trabajo. Sin la ayuda de muchas personas no habría sido posible realizarlo. Es mi deber agradecer:

En primer lugar, a mi directora Flor, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar este proyecto.

A mis evaluadores de la UC, José Antonio Parra y Víctor Martínez Taboada, así como a mi tutor Domingo González-Lamuño, por su guía y sus críticas constructivas, que han contribuido a mejorar la calidad de este trabajo.

A mis compañer@s de laboratorio, Daniel, Álvaro, Carol, Alberto (y los que seguro que me estoy dejando...) por su ayuda desinteresada.

A todas las personas que han contribuido a la recogida de muestras, en especial al personal del área quirúrgica del HUMV y del Servicio de COT del HUMV, gracias.

A la Dra. Nuria Terán y otros compañeros del Servicio de Anatomía Patológica del HUMV, por colaborar de manera intensiva en el análisis anatomopatológico de las muestras, muchas gracias.

Agradezco también su aportación a los compañeros de los servicios de Radiodiagnóstico y COT del HUMV que han colaborado en la publicación de nuestros resultados.

Mención especial para el personal de Biodonostia, por ayudarme desinteresadamente con los experimentos de este proyecto. Gracias Ana, Raquel y Claudia.

Gracias a todos los compañeros médicos que me hacen crecer cada día como profesional, permitiéndome ayudar a otras personas, en especial al Servicio de COMF del Hospital Universitario Donostia (muy especialmente al doctor Hernando) y al doctor Alberto Pereira del Hospital da Luz de Lisboa.

Gracias a mi familia, natural y política, por hacerme ser quien soy, por su apoyo incondicional y por su amor, ¡gracias, gracias, gracias!

Por último, a mi mujer Ana, por compartir su vida conmigo, por su amor, por su apoyo, por su comprensión, por su paciencia. Gracias.

INDICE

ABREVIATURAS	12
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABLAS.....	16
RESUMEN	17
SUMMARY	20
INTRODUCCIÓN	22
1.1 Epidemiología de la ONCF.....	22
1.1.1 Incidencia y prevalencia	22
1.1.2 Demografía	22
1.1.3 Localizaciones	23
1.1.4 Factores de riesgo y etiología	23
1.2. Anatomía, histología y fisiología del hueso sano.....	24
1.2.1 Tipos celulares implicados en la homeostasis ósea.....	26
1.2.1.1 Las células madre mesenquimales (CMMs)	27
1.2.1.2 Los osteoblastos (OBLs).....	31
1.2.1.3 Los osteocitos	31
1.2.1.4 Los osteoclastos	34
1.2.2. Mecanismos moleculares que regulan la homeostasis ósea	36
1.2.2.1 Principales rutas que regulan la homeostasis ósea	37
1.2.2.2 Papel de los microARNs en la osteogénesis.	45
1.3 Fisiopatología de la osteonecrosis	48
1.3.1 Fisiopatología de la ONCF traumática	49
1.3.2 Fisiopatología de la ONCF no traumática	51
1.3.2.1 Hemoglobinopatías	51
1.3.2.2 Estados de hipercoagulabilidad	52
1.3.2.3 Hipofibrinólisis	52
1.3.2.4 Compresión extravascular	53
1.3.2.5 Corticosteroides	55
1.3.2.6 Consumo excesivo de alcohol	58
1.3.2.7 Inflamación y autoinmunidad	59
1.3.2.8 Otras formas de ONCF no traumática	61
1.4 Alteraciones celulares en la ONCF.....	62

	10
1.4.1 Alteraciones de las CMMs en la ONCF	62
1.4.2 Alteraciones en células de estirpe ósea en la ONCF	62
1.5 Evaluación médica y diagnóstico en la ONCF.....	63
1.5.1 Diagnóstico por imagen.....	64
1.5.1.1 Radiografía simple	64
1.5.1.2 Resonancia magnética nuclear	65
1.5.1.3 Tomografía axial computarizada	68
1.5.1.4 Medicina nuclear en el diagnóstico de la ONCF	69
1.5.1.5 Estadificación por imagen de la ONCF	70
1.5.2 Diagnóstico histológico	75
1.5.2.1 Histopatología de la osteonecrosis	76
1.5.2.2 Estadio histológico I	79
1.5.2.3 Estadio histológico II	80
1.5.2.4 Estadio histológico III	82
1.5.2.5 Estadio histológico IV	84
1.5.3 Diagnóstico diferencial.....	86
1.5.4 Criterios diagnósticos.....	87
1.6 Prevención y tratamiento de la ONCF	88
1.6.1 Tratamiento no quirúrgico	88
1.6.2 Tratamiento quirúrgico	89
1.6.3 Terapias celulares	91
1.6.4 miARNs como potencial estrategia terapéutica	92
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	93
2.1 Hipótesis	93
2.2 Objetivos.....	93
MATERIAL Y MÉTODOS.....	95
3.1 Obtención de muestras	95
3.2 Aislamiento y cultivo de CMMs de médula ósea humana.....	95
3.3 Diferenciación osteogénica y adipogénica.....	95
3.4 Tinciones con Rojo Alizarina y Oil Red O.....	96
3.5 Cuantificación de actividad fosfatasa alcalina.....	97
3.6 Análisis de proliferación celular	98
3.7 Extracción de ARN y retrotranscripción.....	99
3.8 Análisis de expresión génica por PCR en tiempo real.....	99
3.9 Análisis radiológico.....	100
3.11 Análisis histológico	102

3.12 Análisis estadístico.....	103
4 RESULTADOS	104
4.1 Evaluación de comorbilidades y demografía de nuestros pacientes.....	104
4.2 Diagnóstico general de la ONCF.	105
4.2.1 Concordancia diagnóstica entre especialistas.....	105
4.2.2 Concordancia pre y post quirúrgica.	106
4.3 Diagnóstico radiológico de la ONCF.....	107
4.3.1 Signos radiológicos característicos de la ONCF.....	107
4.3.2 Estadificación radiológica de la ONCF.	108
4.4 Diagnóstico histológico de la ONCF.	109
4.4.1 Necrosis histológica en la ONCF.....	110
4.4.2 Signos degenerativos histológicos en la ONCF.	110
4.5 Fisiopatología de la ONCF: Integración entre Diagnóstico y Biología Celular	111
4.5.1 Evaluación de la capacidad proliferativa de las CMMs en la ONCF	112
4.5.3 Evaluación de la capacidad osteogénica de las CMMs en la ONCF	114
5 DISCUSIÓN.....	118
5.1 Fiabilidad diagnóstica en la osteonecrosis de cabeza femoral.....	118
5.2 Diagnóstico radiológico de la osteonecrosis de cabeza femoral	118
5.3 Diagnóstico histológico de la osteonecrosis de cabeza femoral	120
5.4 Capacidad de proliferación y diferenciación de las CMMs en ONCF.....	121
5.5 Capacidad de diferenciación de las CMMs en ONCF.....	123
6 CONCLUSIONES.....	126
REFERENCIAS:	128

ABREVIATURAS

AC	Artrosis de cadera
ACFM	Arteria circunfleja femoral medial
ACFL	Arteria circunfleja femoral lateral
ALK	Cinasa similar a los receptores de activina
ALPL	Fosfatasa alcalina
AP	Anteroposterior (proyección radiográfica)
ARCO	Association Research Circulation Osseous
ARNm	ARN mensajero
ASB	Albúmina sérica bovina
ASD	Angiografía de sustracción digital
AT-III	Antitrombina III
BAMBI	Inhibidor de activina unido a la membrana
BCA	Ácido bicinconónico
BGLAP	Osteocalcina, o Proteína ósea con gamma-carboxyglutamato
BMP	Proteínas morfogénicas de hueso
BMPRI/II	Receptores I y II de BMP
CMM	Célula madre mesenquimal
CDA	Coefficiente de difusión aparente
COL1A1	Colágeno tipo 1 alfa 1
EMO	Edema de médula ósea
IGF-I y II	Factor de crecimiento análogo a la insulina I y II
JIC	Japanese Investigation Committee
FBS	Suero bovino fetal
MEC	Matriz extracelular
miARN	microARN
MO	Médula ósea
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OBL	Osteoblasto

OCN	Osteocalcina
OCL	Osteoclasto
OCT	Osteocito
ONCF	Osteonecrosis de cabeza femoral
ONCFIE	Osteonecrosis de cabeza femoral inducida por esteroides
OPG	Osteoprotegerina
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PBS	Solución tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PET/TAC	Tomografía de emisión de positrones/TAC
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PTC	Prótesis total de cadera
RANK	Receptor activador del factor nuclear κ beta
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ beta
RM	Resonancia magnética nuclear
RUNX2	Factor de transcripción 2 relacionado con Runt
SMAD	Small mothers against decapentaplegic (proteína)
SMURF	Factores reguladores de la ubiquitinación de SMAD
SPECT	Tomografía computarizada por emisión monofotónica
TA	Temperatura ambiente
TAC	Tomografía axial computarizada
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TCF/LEF	Factor de células T/factor potenciador linfoide
Tc-99m	Tecnecio-99 metaestable
TNF	Factor de necrosis tumoral
Wnt	Proteína wingless

LISTA DE FIGURAS

Introducción

- Figura 1.** Configuración y estructura del hueso esponjoso.
- Figura 2.** Diferenciación de células madre mesenquimales.
- Figura 3.** Morfología de las CMMs en diferentes pasajes.
- Figura 4.** Representación del sistema lacunocanalicular.
- Figura 5.** Las cinco fases del remodelado óseo.
- Figura 6.** Vía de señalización canónica de las BMP.
- Figura 7.** Vías de BMP con sus inhibidores.
- Figura 8.** Vía canónica de señalización de Wnt.
- Figura 9.** Vías de señalización Wnt.
- Figura 10.** Vía canónica lineal del procesamiento de miARN.
- Figura 11.** Control de los miARN sobre la diferenciación osteogénica de las CMM.
- Figura 12.** Fisiopatología general de la ONCF.
- Figura 13.** Vascularización de la cabeza femoral.
- Figura 14.** Concepto del resistor de Starling aplicado a la microcirculación ósea.
- Figura 15.** Patogénesis de la ONCFIE.
- Figura 16.** Patogénesis de la ONCFIE relacionada con las células endoteliales óseas
- Figura 17 .** Efectos directos e indirectos del alcohol en la fisiología ósea.
- Figura 18.** Células de la inmunidad innata en la osteonecrosis.
- Figura 19.** Radiografía simple AP en la ONCF.
- Figura 20.** Hallazgos histológicos y radiológicos de la ONCF en el mismo paciente.
- Figura 21.** Edema de médula ósea en RM.
- Figura 22.** ONCF de cadera izquierda en TAC.
- Figura 23.** Imágenes de medicina nuclear en la ONCF.
- Figura 24.** Sistema de estadificación de la ONCF de la JIC.
- Figura 25.** Clasificación del CJFH para la osteonecrosis de la cabeza femoral.
- Figura 26.** Imágenes de micro-TAC de la cabeza femoral necrótica.
- Figura 27.** Características histopatológicas de la osteonecrosis.
- Figura 28.** Alteraciones histopatológicas en ONCF estadio II.
- Figura 29.** Microfotografía de la zona de transición.
- Figura 30.** Sección frontal de una cabeza femoral infartada.

Figura 31. Prótesis total de cadera.

Figura 32. Terapias regenerativas en la ONCF.

Material y métodos

Resultados

Figura 1. Espécimen macroscópico y secciones histológicas de ONCF. **Figura 2.** Análisis de proliferación de las CMMs mediante método MTT.

Figura 3. Diferenciación adipogénica en CMMs de ONCF y AC.

Figura 4. Producción de marcadores de estirpe ósea en las muestras.

Figura 5. Evaluación de la proliferación celular de las CMMs mediante el ensayo MTT.

Figura 6. Potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales.

Figura 7. Expresión de marcadores de la diferenciación osteogénica de las CMMs.

Figura 8. Expresión de la fosfatasa alcalina a lo largo de la diferenciación osteogénica.

Figura 9. Mineralización durante la diferenciación osteogénica de las CMMs.

Discusión

Figura 1. Cambios en la diferenciación y proliferación de las CMMs en la ONCF.

LISTA DE TABLAS

Introducción

Tabla 1. Principales factores de riesgo para el desarrollo de ONCF.

Tabla 2. Clasificación de las células madre por capacidad de diferenciación.

Tabla 3. Hormonas y factores implicados en la secuencia de remodelado óseo.

Tabla 4. Clasificación de Ficat y Arlet para la ONCF.

Tabla 5. Sistema de estadificación de la ONCF propuesto por Steinberg.

Tabla 6. Sistema de estadificación ARCO para la ONCF.

Tabla 7. Clasificación histológica de la ONCF.

Tabla 8. Diagnóstico diferencial de la artrosis, la ONCF y la ACRP.

Material y métodos

Tabla 1. Protocolo estándar de RM de cadera.

Tabla 2. Información de los casos en el estudio de la fiabilidad radiológica.

Resultados

Tabla 1. Comorbilidades de los pacientes incluidos en la muestra de estudio.

Tabla 2. Concordancia diagnóstica entre especialistas.

Tabla 3. Resultados de la fiabilidad en la identificación de las características de imagen.

Tabla 4. Concordancia en la estadificación de la ONCF.

Tabla 5. Comparación del estadio radiológico con lagunas osteocíticas vacías.

Tabla 6. Datos del análisis histológico de las muestras de cabeza femoral.

Tabla 7. Rendimiento en la obtención de CMMs.

RESUMEN

La osteonecrosis de cabeza femoral (ONCF) es una enfermedad invalidante y de difícil tratamiento. En esta patología, la alteración progresiva del flujo sanguíneo en el interior del hueso conduce a la necrosis aséptica ósea a nivel de la articulación de la cadera. Si no se recibe tratamiento, la ONCF puede generar el colapso de la cabeza femoral, desencadenando una artropatía secundaria, y requiriendo a menudo la sustitución de la articulación mediante una prótesis total de cadera. Los registros epidemiológicos apuntan a una prevalencia e incidencia no desdeñables. Por ejemplo, en Estados Unidos, se ha estimado que el número de casos nuevos cada año es de unos 10.000 a 20.000, con una prevalencia de entre 300.000 y 600.000 personas.

En la ONCF, la isquemia puede producirse por una interrupción mecánica debida a fracturas o luxaciones, por una oclusión intravascular provocada por trombos o émbolos de grasa o por una compresión extravascular. Cuando existe un claro factor etiológico atribuible al desarrollo de la ONCF se habla de formas secundarias de la enfermedad, mientras que en ausencia de una causa conocida se emplea el término ONCF idiopática.

Las células madre mesenquimales (CMM) de la médula ósea son células presentes en el tejido óseo sin potencial hematopoyético pero con otros múltiples potenciales de diferenciación y capacidad para secretar factores tróficos. Existe evidencia de que estas CMMs juegan un papel vital en la reparación de la osteonecrosis. Actualmente, se considera que la ONCF está asociada con la disfunción de las CMMs de la médula ósea, estando afectada su capacidad de proliferación, apoptosis y osteogénesis. Las células óseas maduras presentan también en la ONCF alteraciones.

En la ONCF, el diagnóstico se realiza combinando la exploración y anamnesis clínicas con el diagnóstico por imagen. El diagnóstico por imagen puede incluir radiografías, tomografía axial computarizada (TAC), gammagrafía ósea y resonancia magnética (RM). Hoy en día, la radiografía simple de cadera constituye la prueba complementaria básica en el diagnóstico de esta patología, siendo la RM la prueba de elección por su mayor sensibilidad y especificidad. La radiografía convencional sigue siendo el pilar de la exploración diagnóstica inicial. Paradójicamente, pese a su extendido uso y los hallazgos radiológicos característicos que presenta, se ha considerado que las radiografías simples son insensibles a los cambios tempranos de la ONCF y, por lo tanto, constituye una herramienta diagnóstica subóptima. El diagnóstico de certeza de la ONCF es el estudio histológico de la cabeza femoral, no realizado en nuestro medio de forma rutinaria. No está indicada la toma de biopsias. Histológicamente, la osteonecrosis se caracteriza por un patrón típico de muerte celular y un complejo proceso de resorción y formación ósea. Los hallazgos histológicos característicos son la necrosis trabecular (más del 50% de lagunas osteocíticas vacías) y una médula hematopoyética necrótica. Estos cambios histopatológicos se correlacionan con el aspecto radiográfico de la cabeza femoral.

Para estratificar la gravedad y el pronóstico, así como para guiar la estrategia de tratamiento, se han desarrollado sistemas de estadificación de la ONCF. El sistema de estadificación de Ficat y Arlet fue la primera clasificación utilizada para la ONCF, es el sistema de estadificación más reportado en la literatura y el más empleado en la práctica clínica.

Dado que la ONCF representa un desafío diagnóstico significativo debido a su naturaleza insidiosa y a la falta de marcadores clínicos definitivos en etapas tempranas

de la enfermedad, en este proyecto exploramos diferentes aspectos relacionados con el diagnóstico de esta patología.

En el presente trabajo, partimos de la hipótesis de que existe inconsistencia en el diagnóstico de la ONCF cuando se realiza por distintos especialistas. El análisis de la consistencia diagnóstica entre especialistas se llevó a cabo comparando el diagnóstico emitido por cirujanos ortopédicos, radiólogos y patólogos, y reveló una concordancia moderada entre los diagnósticos de los primeros dos grupos de especialistas. Veintiuno de los veinticuatro diagnósticos coincidieron entre radiólogos y cirujanos ortopédicos (Coeficiente de kappa = 0,58). El examen histológico de las muestras de cabeza femoral recogidas confirmó el diagnóstico radiológico en veinte de las veinticuatro caderas analizadas (84%). La fiabilidad del diagnóstico interobservador no difirió significativamente entre los distintos estadios de Ficat y Arlet.

En este estudio, postulamos que la radiografía convencional presenta limitaciones en la detección de signos radiológicos característicos de la ONCF. Sólo la identificación del aplanamiento de la cabeza femoral y los signos de artrosis mostraron una concordancia moderada entre observadores con significación estadística. Por otra parte, la detección de la osteoporosis radiológica y de la pérdida de trabeculación mostraron la fiabilidad más baja, con coeficientes kappa incluso negativos. En general se encontró un grado de concordancia pobre entre evaluadores a la hora de identificar signos radiológicos característicos de esta patología, lo que denota una escasa fiabilidad diagnóstica mediante esta técnica.

De forma paralela, partimos de la suposición de que la estadificación radiológica de acuerdo a la clasificación de Ficat y Arlet es válida para su empleo en la práctica clínica habitual. El análisis de la fiabilidad interobservador en la estadificación de la ONCF reveló un grado de acuerdo importante y estadísticamente significativo entre todos los calificadores, especialmente entre los traumatólogos.

En la presente investigación, partimos de la hipótesis de que existe una correlación significativa entre la densidad de lagunas osteocíticas desocupadas y el estadio clínico de la enfermedad. En nuestras muestras, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el número de lagunas osteocíticas vacías entre el grupo ONCF y el grupo de control. Cuando comparamos el número de lagunas osteocíticas vacías y la estadificación de Ficat y Arlet no encontramos una diferencia estadísticamente significativa. Esta ausencia de diferencia podría deberse al limitado número de muestras empleadas. Como parte de la caracterización anatomopatológica de nuestra muestra se analizaron además signos inespecíficos histológicos de degeneración tisular. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de fibrosis medular entre el grupo ONCF y el grupo de control. El análisis de otros signos degenerativos, como la infiltración grasa y la osificación heterotópica, no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos analizados.

En este trabajo partimos de la hipótesis, fundamentada en estudios previos, de que las CMMs en la ONCF presentaban una capacidad de proliferación disminuida. Sin embargo, encontramos que las CMMs de pacientes con ONCF presentaban un incremento significativo de la capacidad proliferativa con respecto a las CMMs de pacientes con artrosis de cadera.

Por último, postulamos que la capacidad de diferenciación de la CMM en ONCF se encuentra alterada. Al respecto, nuestros resultados mostraron un incremento significativo en la capacidad adipogénica (analizada mediante tinciones

específicas) de las CMMs de los pacientes con ONCF respecto a los controles. Asimismo, el análisis de la capacidad osteogénica de las CMMs en ONCF reveló una limitación en la diferenciación hacia linaje óseo (evaluado mediante la expresión de los principales marcadores osteogénicos, la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina y el análisis de la mineralización *in vitro*). Este patrón de diferenciación alterada es consistente con lo descrito en la literatura.

SUMMARY

Osteonecrosis of the femoral head (ONCF) is a disabling disease that is difficult to treat. In this pathology, progressive disruption of blood flow within the bone leads to aseptic bone necrosis at the hip joint. If left untreated, ONCF can lead to collapse of the femoral head, triggering secondary arthropathy, often requiring replacement of the joint with a total hip replacement. Epidemiological records point to a non-negligible prevalence and incidence. For example, in the United States, it has been estimated that the number of new cases each year is about 10,000 to 20,000, with a prevalence of between 300,000 and 600,000 people.

In ONCF, ischaemia may be caused by mechanical disruption due to fractures or dislocations, by intravascular occlusion caused by thrombi or fat emboli, or by extravascular compression. When there is a clear aetiological factor attributable to the development of ONCF, it is referred to as secondary forms of the disease, while in the absence of a known cause, the term idiopathic ONCF is used.

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) are cells present in bone tissue without haematopoietic potential but with multiple other differentiation potentials and the ability to secrete trophic factors. There is evidence that these MSCs play a vital role in the repair of osteonecrosis. ONCF is now considered to be associated with dysfunction of bone marrow MSCs, with their capacity for proliferation, apoptosis and osteogenesis being impaired. Mature bone cells are also altered in ONCF.

In ONCF, diagnosis is made by combining clinical examination and anamnesis with diagnostic imaging. Imaging may include X-rays, computed tomography (CT), bone scintigraphy and magnetic resonance imaging (MRI). Today, plain radiography of the hip is the basic complementary test in the diagnosis of this pathology, with MRI being the test of choice due to its greater sensitivity and specificity. Conventional radiography remains the mainstay of the initial diagnostic examination. Paradoxically, despite its widespread use and characteristic radiological findings, plain radiographs have been considered to be insensitive to early changes in ONCF and are therefore a suboptimal diagnostic tool. The definitive diagnosis of ONCF is histological examination of the femoral head, which is not routinely performed in our hospitals. Biopsies are not indicated. Histologically, osteonecrosis is characterised by a typical pattern of cell death and a complex process of bone resorption and formation. Characteristic histological findings are trabecular necrosis (more than 50% empty osteocytic lacunae) and a necrotic haematopoietic marrow. These histopathological changes correlate with the radiographic appearance of the femoral head.

To categorise severity and prognosis, as well as to guide treatment strategy, staging systems for ONCF have been developed. The Ficat and Arlet staging system which was the first classification used for ONCF, is the most reported staging system in the literature and the most widely used in clinical practice.

As ONCF represents a significant diagnostic challenge due to its insidious nature and the lack of definitive clinical markers in early stages of the disease, in this project we explore different aspects related to the diagnosis of this pathology.

In the present study, we hypothesised that there is inconsistency in the diagnosis of ONCF when made by different specialists. Analysis of diagnostic consistency between specialists was carried out by comparing the diagnoses made by orthopaedic surgeons, radiologists and pathologists, and revealed moderate agreement between the diagnoses

of the first two groups of specialists. Twenty-one of the twenty-four diagnoses were in agreement between radiologists and orthopaedic surgeons (kappa coefficient = 0.58). Histological examination of the femoral head specimens collected confirmed the radiological diagnosis in twenty of the twenty-four hips analysed (84%). The interobserver diagnostic reliability did not differ significantly between the different Ficat and Arlet stages.

In this study, we postulate that conventional radiography has limitations in the detection of radiological signs characteristic of ONCF. Only the identification of flattening of the femoral head and signs of osteoarthritis showed moderate interobserver agreement with statistical significance. On the other hand, the detection of radiological osteoporosis and loss of trabeculation showed the lowest reliability, with even negative kappa coefficients. In general, a poor degree of inter-rater agreement was found in identifying radiological signs characteristic of this pathology, which denotes a low diagnostic reliability using this technique.

In parallel, we assumed that radiological staging according to the Ficat and Arlet classification is valid for use in routine clinical practice. Analysis of interobserver reliability in ONCF staging revealed a significant and statistically significant degree of agreement among all raters, especially among orthopaedic surgeons.

In the present investigation, we hypothesised that there is a significant correlation between the density of unoccupied osteocyte lacunae and the clinical stage of the disease. In our samples, we found a statistically significant difference in the number of empty osteocyte lacunae between the ONCF group and the control group. When we compared the number of empty osteocytic lacunae and the Ficat and Arlet staging we did not find a statistically significant difference. This lack of difference could be due to the limited number of samples used. As part of the anatomopathological characterisation of our sample we further analysed histological non-specific signs of tissue degeneration. A statistically significant difference was found in the presence of spinal cord fibrosis between the ONCF group and the control group. Analysis of other degenerative signs, such as fatty infiltration and heterotopic ossification, revealed no statistically significant differences between the two groups analysed.

In this study, we hypothesised, based on previous studies, that MSCs in ONCF had a decreased proliferative capacity. However, we found that MSCs from patients with ONCF had a significantly increased proliferative capacity compared to MSCs from patients with osteoarthritis of the hip.

Finally, we initially postulated that the differentiation capacity of MSCs in ONCF is altered. In this regard, our results showed a significant increase in the adipogenic capacity (analysed by specific staining) of MSCs from ONCF patients compared to controls. Furthermore, analysis of the osteogenic capacity of MSCs in ONCF revealed limited differentiation towards bone lineage (assessed by expression of the main osteogenic markers, measurement of alkaline phosphatase activity and analysis of *in vitro* mineralisation). This pattern of altered differentiation is consistent with that described in the literature.

INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la ONCF

1.1.1 Incidencia y prevalencia

La osteonecrosis de cabeza femoral (ONCF) es una enfermedad invalidante y de difícil tratamiento que afecta a personas jóvenes y de mediana edad(1, 2). En esta patología, la alteración progresiva del flujo sanguíneo en el interior del hueso conduce a la necrosis aséptica ósea a nivel de la articulación de la cadera(3, 4). Si no se recibe tratamiento, la ONCF puede generar el colapso de la cabeza femoral, desencadenando una artropatía secundaria, y requiriendo a menudo la sustitución de la articulación mediante una prótesis total de cadera (PTC)(5). Hasta la fecha, no existe ningún informe epidemiológico de la ONCF a nivel mundial, sin embargo, algunos países ya han realizado estudios sobre la incidencia de esta enfermedad. Por ejemplo, en Estados Unidos, se ha estimado que el número de casos nuevos cada año es de unos 10.000 a 20.000(6-8), aunque se han reportado incidencias superiores a 30.000 casos/año, con cifras en aumento(9). Se estima que en dicho país, entre 300.000 y 600.000 personas padecen ONCF(10), siendo esta patología la causa directa de entre el 5 y el 18% de todas las artroplastias de cadera realizadas anualmente(3, 8, 11, 12). En Alemania, la incidencia de la ONCF se sitúa entre 5000 y 7000 nuevos casos al año(11). En japon, se han reportado anualmente entre 2.500 y 3.300 nuevos casos(13). En Corea, la prevalencia ha aumentado de 20 casos por 100.000 habitantes en 2002 a 37 en 2006, y el número medio de nuevos casos anuales se ha estimado en 14.103(14). En China, la nación que lidera la investigación en ONCF(15), la prevalencia de esta enfermedad se ha estimado en un 0.725%, con más de ocho millones de personas afectas en 2020(16). En un estudio de la población sueca con una cohorte de más de tres millones de habitantes, Bergman et al. encontraron un riesgo a diez años para osteonecrosis del 0,4%, con una incidencia de 4,7 casos por 10.000 habitantes/año, reportándose así una frecuencia de esta enfermedad diez veces mayor que la descrita en trabajos previos basados en muestras poblacionales menores(17).

Por lo tanto, teniendo en cuenta esta información y a pesar de la falta de datos epidemiológicos globales, los estudios publicados hasta este momento sugieren una prevalencia considerable y en aumento, con incidencias significativas que contribuyen a un porcentaje notable de las artroplastias de cadera.

1.1.2 Demografía

La ONCF es significativamente más frecuente en varones que en mujeres(10, 13, 14, 18). Esta diferencia se ha llegado a estimar en una relación de hasta 8:1 hombres/mujeres, pero lo más habitual en la literatura es encontrar ratios de género de 2:1(8) o de 3:1(19, 20). En la población china, por ejemplo, se ha estimado una incidencia en varones del doble que en mujeres, siendo superior en varones para todos los grupos de edad estudiados(16). En el caso de la japonesa, esta ratio hombres/mujeres es de 1.4 a 1(13).

En relación con la edad de aparición, la mayor parte de trabajos la señalan que esta se produce generalmente antes de los 40 años(21). Por ejemplo, Mont et al. reportaron una edad media de debut de 38 años(22). Sin embargo, esta fecha de debut es un parámetro variable según la literatura consultada, ya que otros estudios recogen rangos de edad promedio de entre 30 y 50(10), de entre 55 y 65(16), o de entre 40 y 65

años(13). En estos últimos casos, la incidencia entre los menores de 40 años está generalmente asociada al empleo de glucocorticoides sistémicos, y la incidencia entre los mayores de 65 relacionada con las formas idiopáticas de ONCF.

En conclusión y en lo que se refiere a la demografía de esta patología, la ONCF muestra una distribución de género con una mayor incidencia en hombres, especialmente en China, y una aparición frecuente antes de los 40 años, a menudo vinculada al uso de glucocorticoides. Por encima de los 65 años, la enfermedad tiende a presentarse de forma idiopática, reflejando una variabilidad en la edad de inicio y factores de riesgo asociados según distintas poblaciones y estudios.

1.1.3 Localizaciones

Mientras que la ONCF de origen traumático es típicamente unilateral(23), la ONCF no traumática se presenta frecuentemente de forma bilateral. La afectación de ambas caderas se sitúa en torno al 70-80% de los pacientes(8, 19, 24), aunque se han reportado formas bilaterales en cifras superiores al 80% de los pacientes(20, 21). En los casos de afectación bilateral, se han encontrado volúmenes de afectación por la ONCF similares en ambas caderas, siendo estos predictores del colapso de la cabeza femoral(25). En relación con otras localizaciones, la necrosis avascular o necrosis aséptica puede afectar a múltiples articulaciones, típicamente los hombros, las rodillas y los tobillos, siendo la cadera la localización más frecuente(26, 27). Hablamos de osteonecrosis multifocal cuando se afectan tres o más zonas anatómicas distintas, tratándose de un patrón de afectación poco frecuente que sólo se observa en aproximadamente el 3% de todos los pacientes con necrosis avascular(28, 29).

1.1.4 Factores de riesgo y etiología

Se entiende por factor de riesgo cualquier característica o circunstancia detectable de una persona o grupo de personas que se sabe asociada con un aumento en la probabilidad de padecer, desarrollar o estar especialmente expuesto a una enfermedad. Hablamos de etiología refiriéndonos a la causa o causas del desarrollo de una enfermedad(30). En la necrosis ósea avascular, existe un consenso general sobre su histopatología, pero no existe consenso en cuanto a las asociaciones etiológicas que pueden constituir factores de riesgo para esta enfermedad. La aproximación metodológica a la definición de los factores de riesgo explica en gran medida la incertidumbre sobre lo que constituye un factor de riesgo y la fuerza de esa asociación. Históricamente, el enfoque retrospectivo basado en el estudio de casos se ha utilizado para examinar poblaciones de pacientes con presencia de comorbilidades que podrían asociarse como factores de riesgo. Este enfoque ha conducido a la identificación de numerosos posibles factores de baja prevalencia y ha fallado en determinar cuáles son verdaderamente etiológicos y cuáles constituyen factores de riesgo para la ONCF(31). La Tabla 1 recoge los principales factores de riesgo de ONCF aceptados actualmente(17, 31-34).

Factor de riesgo
Radiación
Traumatismos
Enfermedades hematológicas (leucemias, linfomas)
Disbarismos (enfermedad de Caisson)
Enfermedades de la médula ósea (enfermedad de Gaucher)
Anemia falciforme
Alcoholismo
Estados de hipercoagulabilidad
Glucocorticoides
Lupus eritematoso sistémico
Trasplantes
Infecciones virales (CMV, hepatitis, VIH, rubéola, rubeola, varicela)
Inhibidores de la proteasa
Pancreatitis
Agresión vascular
Endocarditis bacteriana subaguda
Poliarteritis nodosa
Artritis reumatoide
Arteritis de células gigantes
Sarcoidosis

Tabla 1. Principales factores de riesgo para el desarrollo de ONCF.

1.2. Anatomía, histología y fisiología del hueso sano

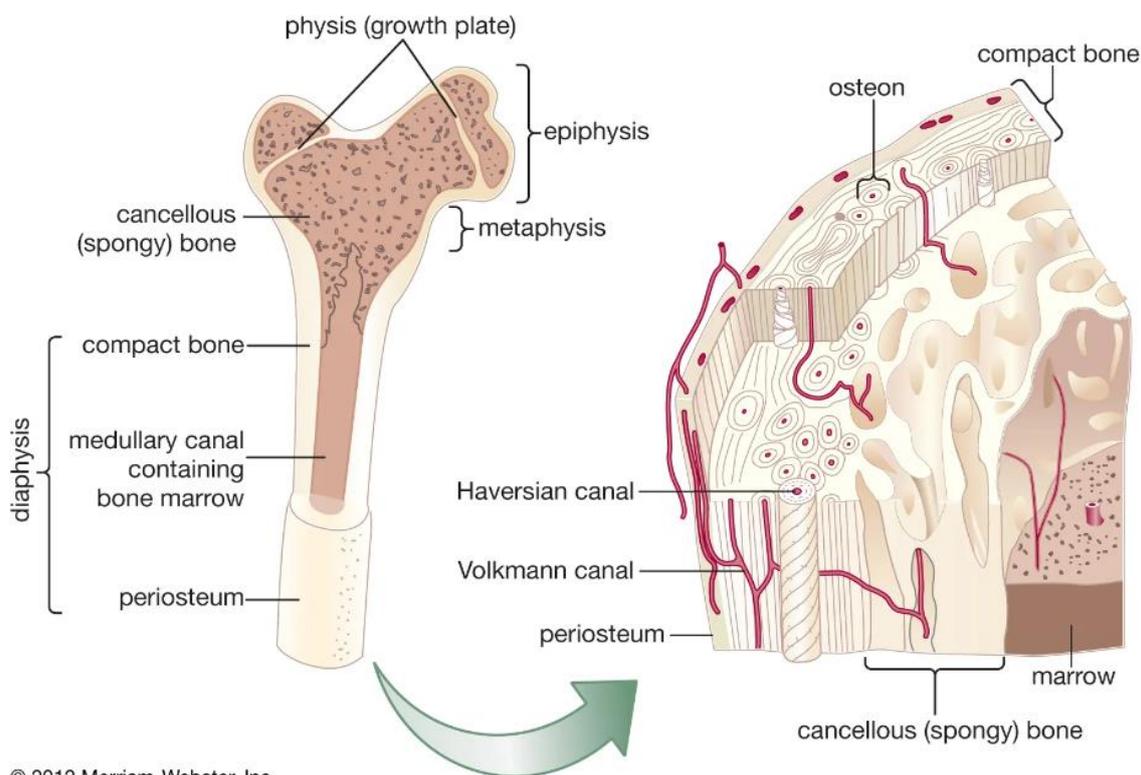
Los huesos son una parte esencial del sistema locomotor. Pese a su apariencia rígida y estática, se trata de estructuras biológicas de gran complejidad, sujetas a una renovación constante que les permite ejercer tanto su función de soporte y protección como otros procesos sujetos a gran dinamismo, tales como la hematopoyesis, la regulación de las reservas minerales, y otro tipo de regulaciones endocrinas y paracrinas(35).

Los huesos del sistema esquelético pueden organizarse, en función de su forma, en cinco grupos diferentes. Los huesos largos son mucho más largos que anchos, y suelen estar situados en el esqueleto apendicular. Los huesos cortos son más pequeños que los anteriores y suelen tener forma cúbica. Los huesos planos son delgados y ligeramente curvos, se localizan principalmente en el esqueleto axial y su principal función es la de proteger órganos y tejidos subyacentes. Los huesos sesamoideos, poco frecuentes, tienen forma ovalada y se desarrollan en los tendones. Por último, se habla de huesos irregulares para referirse a aquellos que no encajan en los otros grupos, incluyéndose aquí huesos como las vértebras(36). Pese a la variedad en la forma de los huesos, sólo dos tejidos óseos conforman todo el sistema esquelético, el hueso cortical y el hueso esponjoso(37) (Figura1). Estos dos tipos de hueso tienen propiedades y funciones diferentes. Mientras que el hueso cortical es denso y proporciona soporte estructural, el hueso esponjoso funciona como un lugar de crecimiento y remodelación ósea. El hueso cortical está recubierto por el periostio, una membrana fibrosa y muy vascularizada que proporciona el anclaje de tendones y ligamentos y contiene células

progenitoras necesarias para la reparación y el crecimiento óseo. El núcleo del hueso cortical está compuesto por unidades cilíndricas denominadas osteonas o Sistemas de Havers. Las osteonas contienen un canal central (canal Haversiano) que alberga vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (Figura 1). Cada canal Haversiano está rodeado por capas concéntricas de matriz mineral (lamellae), que contienen a los osteocitos (OCT), un tipo de célula madura derivada de los osteoblastos (OBL). El espacio vacío que rodea a los OCT se conoce como laguna. Las lagunas se encuentran intercomunicadas mediante prolongaciones filamentosas, de esta forma, los vasos y nervios situados en las osteonas pueden formar canales perpendiculares, conocidos como canales de Volkmann, que interconectan cada osteona. Las osteonas del hueso cortical están dispuestas en paralelo, y es esta particular disposición la que proporciona al hueso su gran resistencia al estrés mecánico(38, 39) (Figura 1).

La capa interna del hueso cortical se conoce como endostio. El endostio es una fina membrana vascular de tejido conjuntivo que recubre la superficie interna de los huesos, formando la cavidad medular. Esta estructura actúa como barrera entre el tejido óseo y la cavidad que alberga la médula ósea (MO), estableciendo el límite entre el hueso cortical y el llamado hueso esponjoso. El endostio contribuye a regular el intercambio de nutrientes y productos de desecho entre el tejido óseo y el torrente sanguíneo, siendo crucial para mantener el funcionamiento del hueso(38).

El aspecto compacto del hueso cortical obedece a la disposición paralela a la superficie ósea de las láminas o lamellae, por el contrario, en el hueso esponjoso estas láminas están dispuestas irregularmente formando una estructura caótica que recuerda a una esponja. Así, el hueso esponjoso está constituido por estructuras tridimensionales llamadas trabéculas, ramificaciones que dan lugar a un sistema de cavidades irregulares, las cuales albergan vasos sanguíneos y células de la MO en el seno de un tejido conjuntivo laxo. Las trabéculas están formadas por láminas óseas de espesor variable recorridas por fibras colágenas paralelas entre sí, en donde los osteocitos se distribuyen regularmente(39) (Figura 1).



© 2012 Merriam-Webster, Inc.

Figura 1. Configuración y estructura del hueso esponjoso. Tomado de: <https://www.britannica.com/science/bone-anatomy/additional-info>. Acceso: 16/12/2023. (40)

En lo que se refiere a la estructura de los huesos largos, llamamos diáfisis a la región cilíndrica media del hueso largo. Las regiones distales o extremos se denominan epífisis. Sobre las epífisis se encuentra una capa de cartilago hialino que conformará las superficies articulares. La metafisis es la región anatómica de transición entre la diáfisis y la epífisis, que en los huesos largos alberga la placa de crecimiento durante el desarrollo, por lo que es una zona crucial para el crecimiento óseo en longitud

El tejido óseo se caracteriza por su considerable matriz extracelular (MEC), que constituye la mayoría de su composición y se compone en un 50% de matriz mineral inorgánica, como la hidroxiapatita y el fosfato de calcio. La fracción orgánica de la MEC ósea, conocida como osteoide, está formada principalmente por fibras de colágeno tipo I, además de osteocalcina, glucoproteínas, proteoglicanos, entre otros. Así, el componente mineral inorgánico de la MEC ósea ocupa los espacios intersticiales entre las fibras de colágeno(38). El proceso de cristalización y endurecimiento de este componente mineral se denomina osificación, un tema al que regresaremos más adelante.

1.2.1 Tipos celulares implicados en la homeostasis ósea

La homeostasis del tejido óseo es el proceso dinámico y regulado que mantiene el equilibrio entre la formación ósea, llevada a cabo por los osteoblastos (OBL), y la resorción ósea, realizada por los osteoclastos (OCL).

Aunque el recambio óseo continúa durante toda la vida adulta, el efecto neto de la formación y la resorción sobre la masa ósea es nulo en individuos sanos. Más adelante en la vida, la masa ósea comienza a disminuir a medida que la resorción supera

a la formación. Esto es particularmente importante tras la caída en estrógenos en las mujeres tras la menopausia, lo que conlleva un mayor riesgo de fractura.

Las funciones opuestas de los osteoblastos (OBLs) y los osteoclastos (OCLs) están intrínsecamente sincronizadas a través de interacciones moleculares complejas. Estas interacciones parecen estar moduladas por células progenitoras como las células madre mesenquimales (CMMs), que no solo son cruciales en la regulación de la homeostasis ósea, sino que también desempeñan un papel vital en la reparación de fracturas. Cuando se produce una lesión ósea, se desencadena una secuencia de eventos celulares y moleculares que inician con la formación de un hematoma. Este es seguido por una respuesta inflamatoria que activa las CMMs y otras vías involucradas en la reparación del tejido. Este proceso inflamatorio es esencial, ya que no solo gestiona la actividad de las CMMs, sino que también facilita la diferenciación celular necesaria para la reconstrucción ósea, permitiendo así la curación de la fractura y el restablecimiento de la estructura y función esqueléticas(41).

Por otro lado, otro tipo celular, los osteocitos (OCT), que pueden definirse como células óseas maduras incrustadas en la matriz ósea, desempeñan un papel central en la homeostasis ósea. Estas células actúan como sensores mecánicos y reguladores de la remodelación ósea al dirigir la actividad de los osteoblastos y osteoclastos en respuesta a las fuerzas mecánicas y cambios bioquímicos. Además, los osteocitos mantienen la matriz ósea y regulan el intercambio de minerales, como el calcio, contribuyendo a la mineralización y salud general del hueso.

1.2.1.1 Las células madre mesenquimales (CMMs)

Las CMMs son un tipo de célula no especializada, con una elevada capacidad proliferativa, y multipotencialidad (Tabla 2), ya que puede dar origen a varias estirpes celulares distintas, tales como: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos entre otros(38) (Figura 2), pero incluso pueden diferenciarse hacia células de linaje endodérmico (hepatocitos, células pancreáticas) o ectodérmico (queratinocitos, astrocitos y neuronas)(42).

Célula Madre (Stem Cell)	Características
Totipotentes	Sólo existen durante la primera división del cigoto. Estas células pueden diferenciarse en todos los tipos celulares posibles de un organismo dado, incluidos los tejidos extraembrionarios, como la placenta y el cordón umbilical.
Pluripotentes	Derivadas de la masa celular interna de un blastocisto, son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares de un organismo, excepto en los tejidos extraembrionarios.
Multipotentes	Tienen una capacidad de diferenciación más restringida que las células madre pluripotentes, pudiendo diferenciarse en varios (pero no todos) tipos celulares estrechamente relacionados. Estas células madre también se denominan células madre adultas, ya que pueden encontrarse en tejidos adultos. A este grupo pertenecen las células madre mesenquimales y las células madre hematopoyéticas.
Oligopotentes	Mantienen la capacidad de autorrenovación, pero tienen un potencial de diferenciación muy bajo, ya que sólo pueden derivar en unos pocos tipos celulares.
Unipotentes	Son las que tienen una capacidad de diferenciación más limitada, pudiendo diferenciarse en un solo tipo celular, aunque tienen capacidad de autorrenovación, lo que las distingue de las células normales.

Tabla 2. Clasificación de las células madre en función de su capacidad de diferenciación. (43)

A pesar de que las CMMs presentan una gran capacidad de diferenciación, se consideran células multipotentes y no pluripotentes (Tabla 2), debido a que no ha sido posible evaluar su complementación tetraploide(44). Su carácter multipotente les confiere una capacidad regenerativa demostrada en multitud de tejidos dañados, tales como piel, hueso, cartílago, retina, hígado, riñón, córnea, sistema nervioso o miocardio entre otros(45).

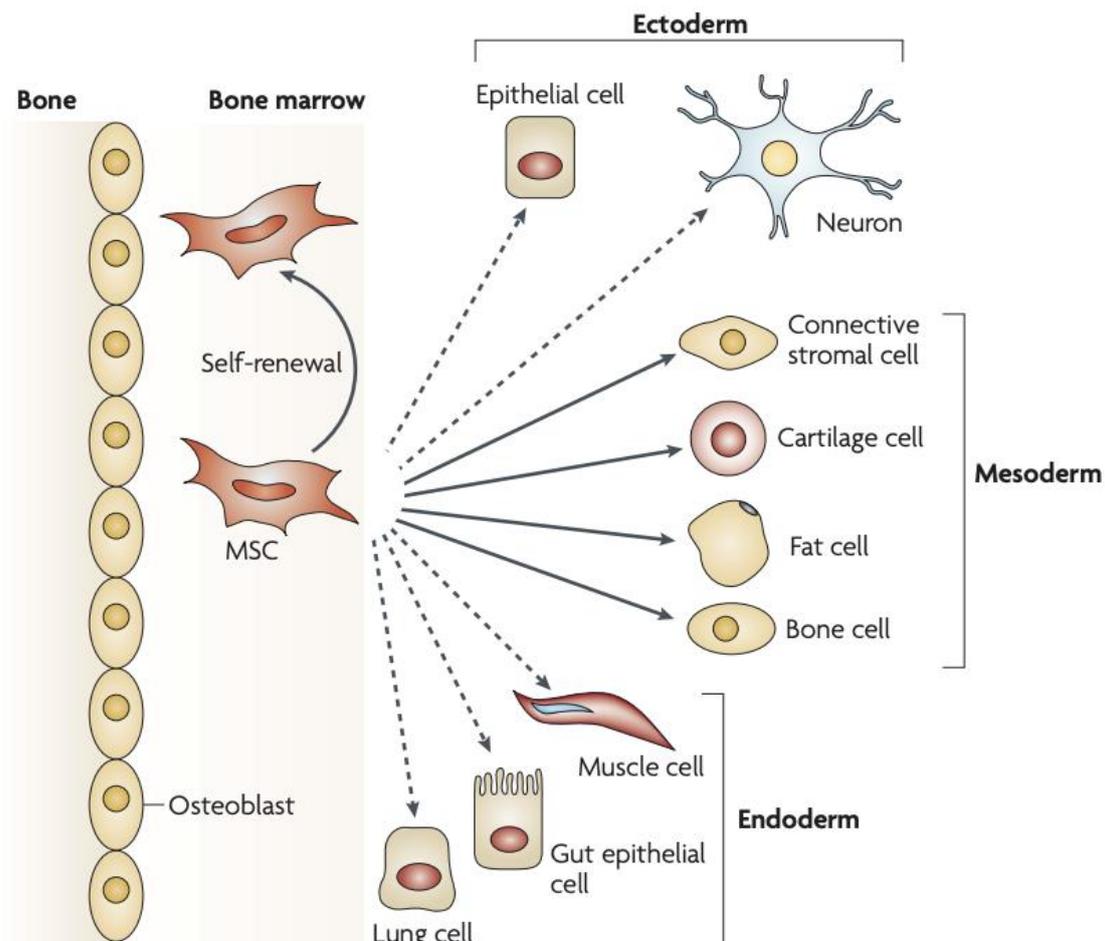


Figura 2. Diferenciación de células madre mesenquimales: las CMM pueden dar lugar a células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Tomado de: Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726–736 (2008)(46).

Las CMMs fueron descritas por primera vez en 1968 por Friedenstein et al. como unidades formadoras de colonias, de aspecto fibroblastoide, que se adherían al plástico en cultivo y con capacidad de regenerar tejido óseo *ex-vivo*. Estas células también son conocidas como células mesenquimales troncales o células madre estromales(44, 47). En el año 2006, durante el Congreso de la *International Society of Cellular Therapy* se definieron las características mínimas necesarias para considerar una célula como CMM. Estas son las siguientes: 1) debe tener capacidad de adherencia al plástico en cultivo, 2) debe expresar los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105, y carecer

de los antígenos hematopoyéticos CD34, CD45 y marcadores típicos de linfocitos B, monocitos y macrófagos, y finalmente, 3) deben ser multipotentes y presentar una alta plasticidad para diferenciarse *in vitro* bajo condiciones estándar de cultivo a condrocitos, adipocitos y OBLs(44, 48). Otras características de las CMMs son: su origen mesodérmico, su apariencia fibroblástica, su capacidad de autorrenovación o una inmunogenicidad relativamente baja(44, 49). Hoy sabemos que las CMMs expresan, otros antígenos de superficie además de los ya mencionados, como CD44, CD105, CD106, CD149, CD166 y Stro-1(50).

Pueden obtenerse CMMs de aspirados de MO, tejido adiposo, sangre, pulpa dental y ligamento periodontal, músculo liso, esquelético y cardíaco, hígado, bazo, testículos, páncreas, periostio, membrana sinovial, dermis, hueso trabecular, pulmón, placenta y líquido amniótico(51, 52). La CMM se puede además aislar y expandir *in vitro* (figura 3), así como criopreservarse sin sufrir alteraciones fenotípicas ni perder su capacidad proliferativa o de diferenciación(53). Sin embargo, se ha reportado que cuando estas células indiferenciadas son sometidas a procesos de división en cultivo durante más de 7 pases comienzan a afectarse su actividad telomerasa y su cariotipo, con la consecuente aparición de senescencia replicativa y declive en la multipotencialidad(54).

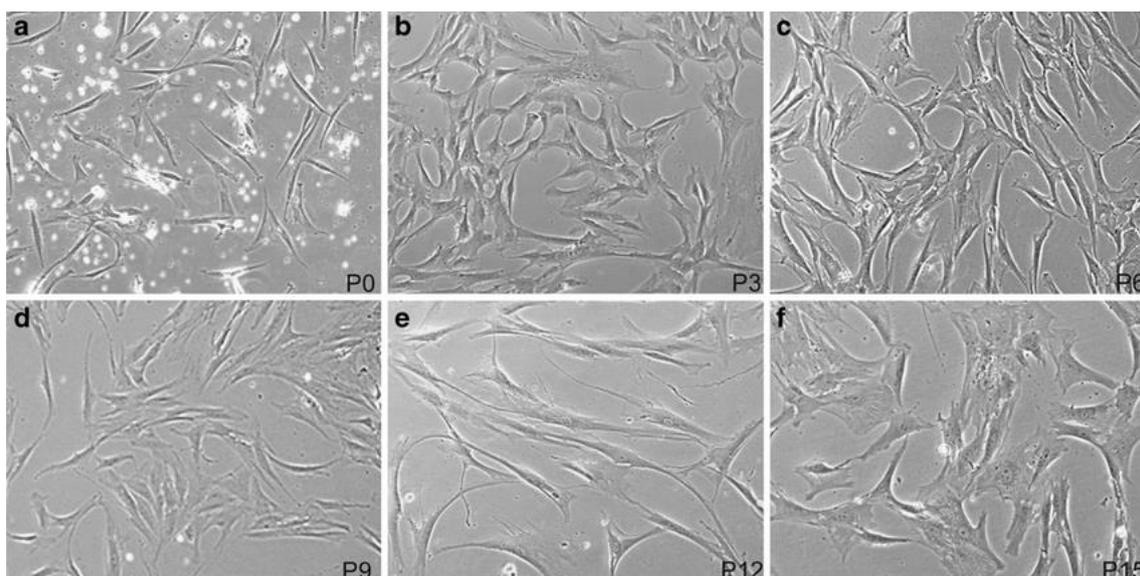


Figura 3. Morfología de las CMMs en diferentes pasajes. Células primarias en cultivo (a), en P3 (b), P6 (c), P9 (d), P12 (e) y P15 (f). Se mantiene una morfología consistente hasta P12. Las imágenes se tomaron bajo microscopía de contraste de fases (a–f $\times 10$; P pasaje). Tomado de: Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Annals of hematology*. 2012;91:1175-86. (55)

Debido a su elevado potencial regenerativo, actualmente se están desarrollando múltiples tratamientos basados en el uso de CMMs para reparar hueso y/o cartílago. Además, existe evidencia de que las CMMs tienen un papel importante en la angiogénesis durante el proceso de reparación tisular. Entre otras aplicaciones, se está examinando la capacidad de las CMMs para regenerar tejido cardíaco y neuronal, reducir la inflamación, tratar enfermedades autoinmunes o evitar el rechazo de trasplantes(56, 57). A finales de 2023 había más de 1400 estudios encontrados con la búsqueda del término "Mesenchymal stem cells" en la página web "clinicaltrials.gov".

Una de las grandes ventajas de las CMMs mesenquimales es su presencia en múltiples tejidos del cuerpo humano, lo que facilita su aislamiento. Las CMMs se pueden obtener de diversas fuentes tisulares, incluyendo MO, tejido adiposo, sangre de cordón umbilical y pulpa dental, entre otras. La MO es una fuente clásica de CMMs, aunque su obtención es claramente invasiva. Por otro lado, las CMMs derivadas del tejido adiposo se extraen mediante procedimientos menos invasivos como la liposucción, facilitando su adquisición y aumentando la comodidad del donante. Estas células tienen además una viabilidad y un potencial de diferenciación elevados(57). Las CMMs del cordón umbilical presentan la ventaja de una recolección no invasiva y un potencial inmunomodulador superior, mientras que las de la pulpa dental pueden ser recogidas tras procedimientos odontológicos rutinarios, representando una fuente accesible y con mínima morbilidad asociada. Para su empleo en medicina regenerativa, cada una de las fuentes anteriormente citadas tiene ventajas e inconvenientes, ya que, dependiendo de la fuente las propiedades de las CMMs, como el potencial de diferenciación, pueden variar. Además, hay que tener en cuenta que aquellos tejidos que no son fácilmente accesibles no serían una fuente adecuada de CMMs para su uso en medicina regenerativa(58). No obstante, la MO es la fuente de CMMs mejor caracterizada, a pesar de sus inconvenientes como la difícil accesibilidad o la correlación de la proliferación y el potencial de diferenciación con la edad del donante. Aunque las CMMs de diferentes fuentes tisulares comparten muchas características y, en general, cumplen los criterios de la *International Society of Cellular Therapy* para la CMM, cada vez hay más pruebas de que las CMMs de diferentes fuentes pueden distinguirse a nivel de producción de citocinas y perfiles de expresión génica. Así, su capacidad para diferenciarse en distintos tejidos, incluidos los linajes endodérmico y ectodérmico, también varía según el tejido de origen, además, cabe destacar que las CMMs de origen fetal pueden sufrir más divisiones celulares que las CMMs procedentes de tejidos adultos, como la MO, antes de alcanzar la senescencia. Estas diferencias en su potencial abren la posibilidad de adaptar distintos los tipos de CMM a diferentes aplicaciones médicas(59). La heterogeneidad de la CMM no ha impedido a los científicos investigar su uso terapéutico.

La aplicación potencial de las CMMs en medicina regenerativa se centró inicialmente en el trasplante de células en los pacientes buscando una posterior diferenciación de esas CMMs en un tipo celular específico para sustituir el tejido perdido o dañado. Sin embargo, los distintos pasos de manipulación celular que se requieren antes de la implantación de esas células en un tejido determinado tienen efectos perjudiciales sobre la viabilidad celular. Además, la necesidad de expandir *in vitro* las células CMMs de forma previa a su implantación para conseguir un número de células suficiente para la realización de los procedimientos, también aumenta la inestabilidad genómica de estas, lo que puede conllevar efectos muy negativos en el tejido receptor a largo plazo. También debe tenerse en cuenta que la vía de administración puede ejercer un estrés mecánico importante sobre estas células, limitando su viabilidad. Todo esto ha llevado a un cambio de paradigma en el uso de las CMMs. Ahora sabemos que muchos de los efectos beneficiosos que se consiguen con la administración de estas células no dependen de su viabilidad a largo plazo ni de su capacidad de diferenciación a células de una estirpe concreta, sino a sus acciones paracrinas. Por tanto, parte de la investigación de las CMMs en medicina regenerativa está orientada hacia el estudio del secretoma en la actualidad(60).

1.2.1.2 Los osteoblastos (OBLs)

Los OBLs son células mononucleares, de forma poliédrica, conocidas por su capacidad osteoformadora, siendo inductoras de la mineralización ósea y secretando múltiples componentes de la MEC del hueso(61). Los OBLs, que comprenden del 4 al 6% del total de células óseas residentes, pueden quedar inmersas en la matriz ósea durante el crecimiento del hueso y madurar hasta dar lugar a los OCTs. Estos OCTs son las células más abundantes del hueso, constituyendo el (90% de las células de este tejido). Si los OBLs no quedan inmersos en la matriz ósea, pueden entrar en un estado quiescente, dando lugar a una célula de revestimiento (bone lining cell). Estas células muestran las características morfológicas de células con gran síntesis proteica, incluyendo un abundante retículo endoplásmico rugoso y un prominente aparato de Golgi, así como diversas vesículas secretoras(62). Las células limitantes tienen un papel importante en la protección de la matriz ósea y en la regulación del paso de iones calcio y otros minerales hacia y desde el hueso, además de funcionar como un reservorio de células precursoras que pueden diferenciarse en osteoblastos durante el proceso de remodelado óseo.

Los OBLs tienen diferentes funciones. Estas células emiten procesos citoplasmáticos que les permiten comunicarse con OBLs y OCTs vecinos, sintetizan la sustancia osteoide, secretan factores de crecimiento, median en la resorción llevada a cabo por los OCLs y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALPL), que permite la mineralización del tejido óseo. La sialoproteína ósea y la osteocalcina (OCN), se expresan en el proceso de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica(39).

La diferenciación osteogénica de los osteoblastos (OBL) es un proceso que requiere la activación secuencial de genes específicos, entre ellos las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y los componentes de la vía Wingless (Wnt). La expresión de RUNX2 (Runt-Related Transcription Factor 2), Distal-less homeobox 5 (Dlx5) y Osterix (Osx) son fundamentales para este proceso, siendo RUNX2 el factor principal que induce la expresión de otros genes vitales para las funciones osteoblásticas, como ColA1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain), ALPL, BSP (Bone Sialoprotein), y BGLAP (Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein)(63, 64).

Además, es importante reconocer que las células osteoblásticas tienen un papel clave no sólo en la síntesis de la matriz ósea, sino también en la regulación de la osteoclastogénesis y, consecuentemente, en la resorción ósea. Por lo tanto, el mantenimiento de la integridad esquelética depende de una interacción equilibrada y coordinada entre los OBLs y los osteoclastos OCLs (65).

1.2.1.3 Los osteocitos

Mientras que OBLs, OCLs y células de revestimiento se encuentran en la superficie ósea, los OCTs están en el interior de la matriz ósea, como ya se ha mencionado. Los OCTs son, además de las células más abundantes del hueso, las células más longevas, siendo capaces de sobrevivir hasta 25 años(61, 63). Poseen forma estrellada, presentando ciertas variaciones, de modo que los OCTs localizados en hueso trabecular son más redondeados que los situados en hueso cortical, que son más alargados(66). Estas células se sitúan en el interior de las llamadas lagunas osteocíticas, u osteoplasmas.

Los osteocitos, que residen dentro de las lagunas, extienden prolongaciones delgadas llamadas procesos dendríticos a través de los conductos calcóforos, finos canales que irradian desde las lagunas de los osteocitos y que están llenos de fluido óseo extracelular, para conectarse con los osteocitos vecinos y con la red de vasos sanguíneos y nervios en el hueso. Estos conductos permiten la comunicación entre osteocitos adyacentes y facilitan el transporte de nutrientes y desechos a través del tejido óseo duro. Esta red de conexiones es vital para el mantenimiento y la supervivencia de los osteocitos, y es fundamental para la regulación de la homeostasis mineral del hueso, permitiendo a los osteocitos detectar cambios en la presión mecánica y en la composición mineral del entorno óseo, y responder adecuadamente para mantener la salud y la resistencia del hueso.

Las prolongaciones citoplasmáticas de estas células se extienden a través de los conductos calcóforos o canaliculos óseos, que están llenos de fluido óseo extracelular (Figura 4). De esta forma, los OCTs se organizan formando un auténtico sincitio de células, que se comporta funcionalmente como una única estructura, existiendo una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, que asegura oxígeno y nutrientes. Los OCTs también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero su función principal es la de controlar el remodelado óseo y detectar las variaciones en los estímulos mecánicos, fenómeno denominado mecanotransducción(67).

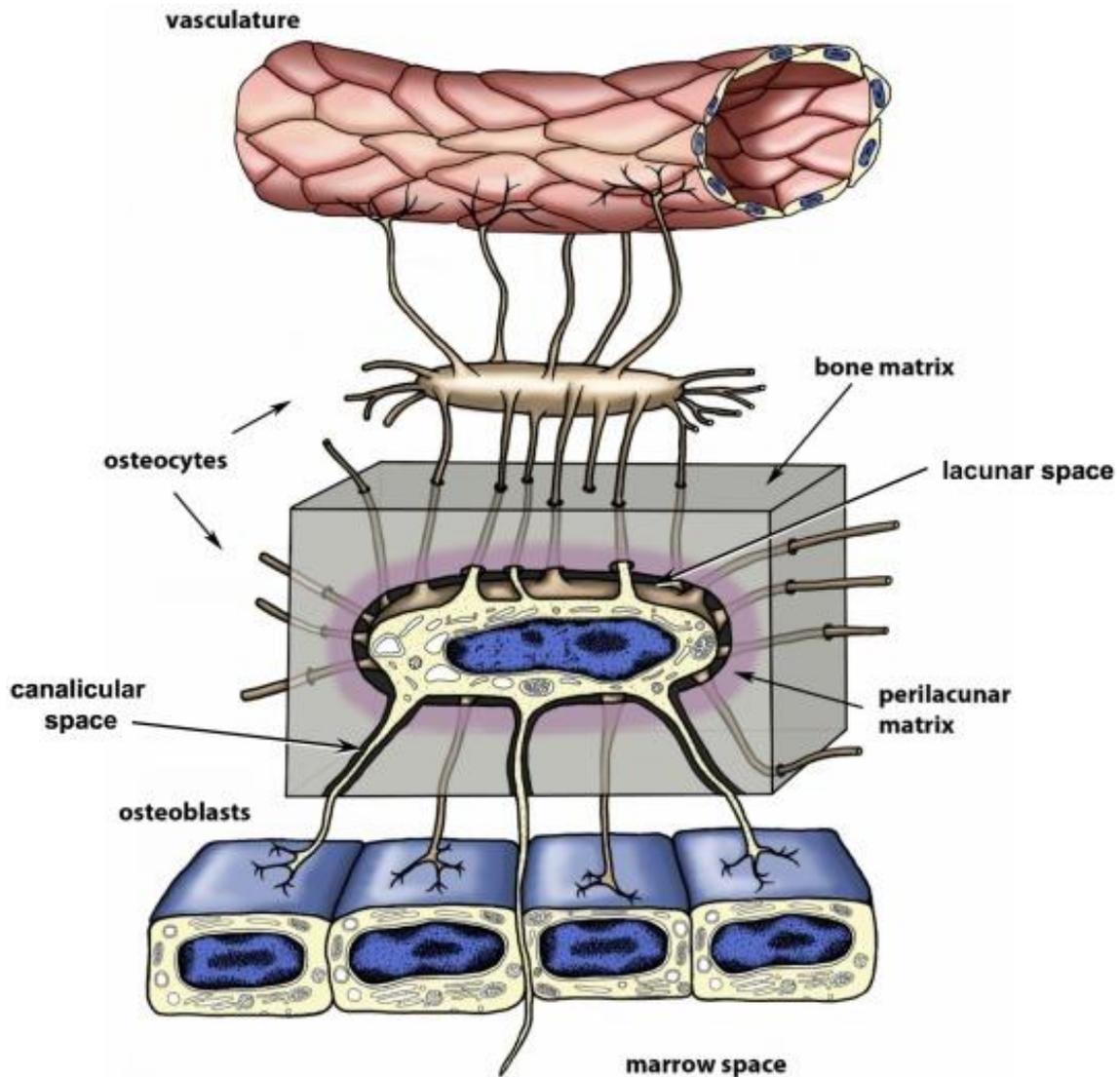


Figura 4. Representación esquemática de los osteocitos y del sistema lacunocanalicular. Osteocito incrustado dentro de su laguna, ilustrándose sus procesos dendríticos que atraviesan la matriz ósea (sombreado gris) dentro de estrechos túneles denominados canalículos. Los procesos dendríticos del osteocito se interconectan con otros osteocitos y osteoblastos superficiales. Obsérvese que algunos procesos osteocíticos pueden extenderse más allá de la capa de osteoblastos para interactuar potencialmente con células de la médula y que las dendritas de los osteocitos también están en íntimo contacto con la vasculatura. Tomado de: Tiede-Lewis LM, Dallas SL. Changes in the osteocyte lacunocanalicular network with aging. *Bone*. 2019 May;122:101-113.(68)

Los OCTs, representan el estadio final de diferenciación de la línea osteoblástica, son incapaces de renovarse. Estas células poseen los mismos marcadores que los OBLs, pero tienen como marcador específico el CD44, un receptor de membrana propio de los OCLs y células de revestimiento(39). El proceso de diferenciación osteoblasto-osteocito va acompañado de cambios morfológicos y ultraestructurales evidentes, por ejemplo, la reducción de tamaño del osteoblasto y del número de orgánulos (como el retículo endoplásmico, el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi) o el aumento en la relación núcleo-citoplasma, correspondiéndose con una disminución de

la síntesis y secreción de proteínas(69). En este proceso, se han propuesto cuatro etapas: osteoide-osteocito, pre-osteocito, osteocito joven y osteocito maduro.

Actualmente, existen evidencias que apuntan hacia un papel clave del OCT como detonante del proceso de remodelado óseo, marcando el lugar donde debe producirse la activación de los precursores osteoclasticos para iniciar la resorción(70). Es decir, los OCTs podrían actuar como sensores en situaciones inductoras del remodelado, como las diferentes fuerzas mecánicas, microfracturas, etc(65).

1.2.1.4 Los osteoclastos

Las células encargadas de la resorción ósea son los OCLs. Se trata de células grandes (100 μm), multinucleadas, ricas en vacuolas y mitocondrias. A diferencia de los otros tipos de células que hemos visto hasta el momento, de origen mesenquimal, los OCLs tienen su origen en las células madre hematopoyéticas. Los OCLs contienen fosfatasa ácida tartrato resistente, que permite la defosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto in vivo como in vitro(71). Frente a los OBLs, los OCLs proceden de células madre hematopoyéticas de la MO denominadas CFU-GM (Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos), precursoras de macrófagos y monocitos(72).

Los OCLs presentan dos regiones de membrana especializadas: donde tiene lugar la resorción, el borde en cepillo, y una zona clara, con integrinas (que sirven de anclaje), rica en microfilamentos. Para ejecutar la resorción ósea, los OCLs se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo mediante las integrinas. La integrina del OCL, en especial la $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp del colágeno y otras proteínas de la matriz osteoide(73). A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa, etc, que van a originar la resorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral más tarde(72). Los productos de esta degradación son endocitados a través del borde en cepillo y transportados al dominio funcional secretor de la membrana plasmática(63). El aumento anormal en la formación y actividad de los OCLs conduce a enfermedades óseas como la osteoporosis, en la que la resorción supera a la formación ósea, con el consiguiente aumento de las fracturas (Figura 5). En algunas condiciones patológicas como las metástasis óseas o las artropatías inflamatorias, la activación anormal de los osteoclastos provoca erosión periarticular y osteólisis(74).

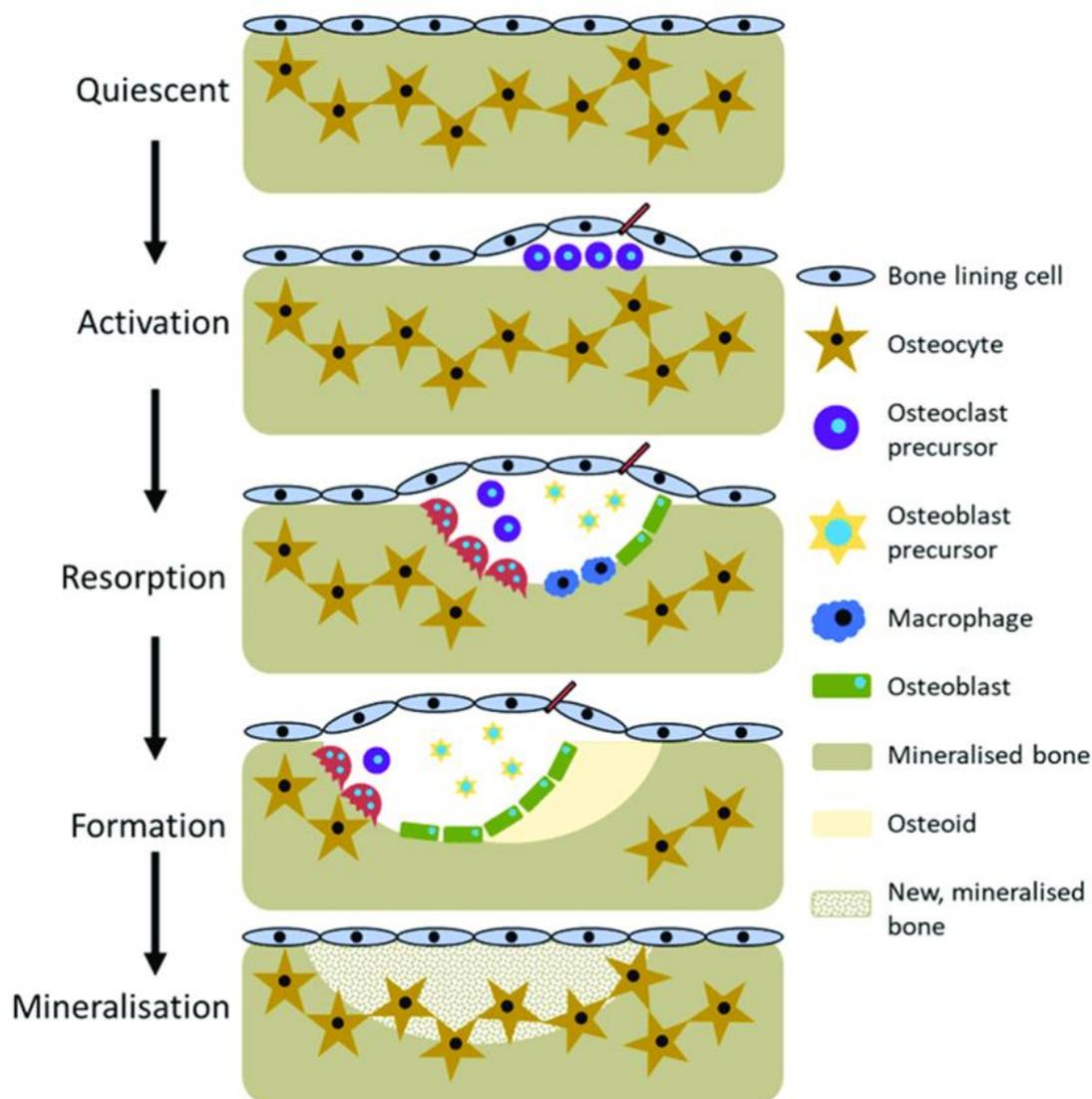


Figura 5. Las cinco fases del remodelado óseo. Tomado de: Owen R, Reilly G. *In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2018;6:134.(75)

Respecto a la osteoclastogénesis, este proceso está altamente conectado con la actividad tanto de OBLs como de OCLs. En la actualidad sabemos que los OBLs son fundamentales para la formación de OCLs. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los OBLs es imprescindible en las primeras fases de la osteoclastogénesis, que entraña la formación de células gigantes multinucleadas(38, 63). Se ha descrito que el proceso de regulación de la osteoclastogénesis se basa en tres moléculas clave: la Osteoprotegerina (OPG), una proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos, el receptor activador del factor nuclear κ beta (RANK) y su ligando (RANKL). El RANKL, previamente denominado osteoclast differentiation factor, es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF)(38). La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce la activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la resorción, mediante la expresión de genes como NFATc1, catepsina K, TRAP y DC-STAMP(76). Tanto in vivo como in vitro, los efectos del RANKL son inhibidos

por la OPG producida por OBLs y pre-osteoblastos, perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF(77). Cuando se unen OPG y RANKL, se inhibe la unión de RANKL a RANK y con ello la diferenciación osteoclástica. De este modo, OPG, RANK y RANKL son reguladores esenciales de la osteoclastogénesis(38).

1.2.2. Mecanismos moleculares que regulan la homeostasis ósea

En constante formación y resorción, el hueso es un tejido dinámico que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la regulación del metabolismo fosfocálcico. Estos fenómenos se denominan en conjunto remodelado óseo, y permiten la renovación anual de un 5% del hueso cortical y un 20 % del hueso trabecular. Hay que tener en cuenta que, aunque el hueso cortical constituye un 75% del total, el hueso trabecular presenta una actividad metabólica 10 veces mayor, en parte debido a la relación superficie-volumen (la superficie del hueso trabecular representa un 60% del total óseo). Como ya se adelantó, el remodelado óseo tiene lugar durante toda la vida del individuo, pero sólo hasta la tercera década de ésta se mantiene un balance netamente positivo. El balance entre la resorción y la formación óseas está influido por múltiples factores, interrelacionados entre sí, como son los factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales(78, 79). En la tabla 3 se sintetizan algunos de los mediadores químicos más relevantes en el remodelado óseo durante cada fase del proceso.

El remodelado óseo puede dividirse en las siguientes varias fases caracterizadas por la actividad de diferentes mediadores químicos (79, 80):

- **Fase de activación:** El primer proceso que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la resorción, mediante la retracción de las células de revestimiento o limitantes (OBLs maduros elongados presentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica mediada por las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce el reclutamiento de OCLs circulantes procedentes de los vasos cercanos.
- **Fase de resorción:** A continuación, los OCLs comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este fenómeno es terminado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento presentes en la matriz, principalmente TGF- β (factor de crecimiento transformante β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).
- **Fase de inversión:** Es el tiempo que separa el final de la reabsorción y el inicio de la formación para una zona determinada. El acoplamiento de estos dos procesos dura 1-2 semanas. Mediante una serie de estímulos aparecen los OBLs. Al microscopio se observa una laguna de Howship con ausencia de OCLs. Se pueden identificar fagocitos y preosteoblastos, que preparan la superficie para la formación del hueso. En este proceso intervienen los factores locales que asegurarán que los nuevos OBLs se agrupen en localización correcta y alineación adecuada
- **Fase de formación:** Sincrónicamente en las zonas reabsorbidas se produce el proceso de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz, que actúan como quimiotácticos y además favorecen su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos

días, los OBLs ya diferenciados van a secretar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

- **Fase de mineralización:** A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 90 días en el hueso trabecular y a los 130 en el hueso cortical.

FASE DEL REMODELADO	HORMONAS Y FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN
Fase de activación	Activación: PTH, IGF-1, IL-1, IL-6, PGE2, Calcitriol, TNF- α Inhibición: Estrógenos
Fase de reclutamiento de osteoclastos y resorción	Activación: RANKL, M-CSF, $\alpha\beta 3$, IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , retinoico, S1P Inhibición: OPG, GM-CSF, estrógenos, Calcitonina, IL-4, IL-18, TGF- β
Fase de inversión	TGF- β , IGF-1, IGF-2, BMPs, PDGF, ó FGF
Fase de reclutamiento de osteoblastos y formación	Activación: WNTs, BMPs, IGF-1, FGF-2, FGF-18, PDGFs, PTH, vitamina D3, Runx2, TGF- β , CT-1 Inhibición: PDGFs, corticoides, leptina, pirofosfato, Sema4D
Fase de finalización o mineralización	Señal de feedback de la expresión normal de esclerostina

Tabla 3. Hormonas y factores implicados en la secuencia de remodelado óseo. Adaptada de: Siddiqui JA, Partridge NC. *Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. Physiology (Bethesda). 2016 May;31(3):233-45.(81).*

El proceso de formación de hueso está meticulosamente gobernado por una red de vías de señalización, incluyendo las de BMP, Wnt y Hedgehog, entre otras y por la influencia moduladora de otros factores, como los microARNs (miARNs). Estos elementos no solo juegan roles críticos en la regulación de las células óseas como los osteoblastos y osteoclastos, sino que también reflejan la interacción y el equilibrio entre diversos sistemas de señalización en un contexto más amplio. En las siguientes subsecciones vamos a describir en detalle estos mecanismos regulatorios.

1.2.2.1 Principales rutas que regulan la homeostasis ósea

En el punto 1.2.1 de esta memoria, se expuso cómo la creación y resorción de hueso están orquestadas fundamentalmente por el equilibrio entre la función de OBLs y OCLs, y cómo las CMMs se diferencian a OBLs en respuesta a diversos estímulos que hacen posible el mantenimiento de la masa ósea. Ahora, profundizaremos en los mecanismos moleculares que hacen posible la transformación de las CMMs en OBLs, proceso clave en la homeostasis del hueso.

Existen diversas vías de señalización que controlan la diferenciación osteogénica de las CMMs, como las vías de las BMPs, Hedgehog, Notch, NELL (Neural Epidermal Growth Epidermal Growth factor-like 1 protein 1) y la vía de señalización Wnt/ β -catenina(41). Sin embargo, la vía de señalización BMP y la vía de señalización Wnt/ β -catenina son las más relevantes en lo que se refiere a la regulación de la diferenciación osteogénica de las CMMs

Vía de señalización de las Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs)

Las BMPs son factores de crecimiento con una gran capacidad de inducir la formación de hueso, cartílago y tejidos conectivos en general. A pesar de haberse caracterizado a principios de la década de 1990, el término “proteínas morfogenéticas óseas” fue utilizado por primera vez por Urist et al en 1971, casi seis años después de describirse sus efectos en la formación ósea(82). Las BMPs son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento TGF- β , y hasta la fecha se han identificado más de veinte BMPs. Además de su papel en la formación ósea, las BMPs también desempeñan funciones esenciales en la embriogénesis, la organogénesis, la homeostasis de los tejidos adultos y la proliferación y diferenciación celular.

Una vez sintetizadas, las proteínas precursoras de las BMPs sufren una serie de modificaciones post-transcripcionales, incluyendo la glicosilación y la dimerización antes de ser secretadas. Las moléculas de BMP maduras secretadas, pueden ser homo- o hetero-tetradímeros que funcionarían como intermediarios en diferentes vías de señalización y procesos celulares(83). Las BMPs, una vez secretadas, van a interactuar con receptores específicos que se encuentran en la superficie celular, lo que provoca una cascada de eventos moleculares en el interior de la célula que mediarán los efectos de la unión de esta proteína a su receptor. El reconocimiento de las BMPs se realiza mediante un receptor de membrana tipo I (BMPRI) y dos receptores BMP tipo II (BMPRII). Entre los BMPRI, también conocidos como *activin receptor-like kinase* (ALKs), se han descrito cuatro diferentes: ALKI, ALKII/ActRI, ALK3/BMPRIA y ALK6/BMPRIIB. Además, existen tres tipos de BMPRII conocidos: BMPRII2, ActRIIA y ActRIIB. Dependiendo de las combinaciones de todos estos receptores la afinidad por las diferentes BMPs variará, y, por tanto, su actividad. Estos BMPRI son proteínas transmembrana con un dominio extracelular rico en cisteína y un dominio cinasa intracelular encargado de iniciar la señalización intracelular tras el reconocimiento de la BMP (Figura 6). Una vez que la BMPRII reconoce la molécula de BMP, el dominio cinasa intracelular transfosforilará al BMPRI, formando el complejo receptor heterodimérico y desencadenando dos cascadas de señalización diferentes, una dependiente de SMAD y otra independiente de SMAD(84).

Las proteínas SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic) funcionan a nivel celular como segundo mensajero, y son proteínas centrales de la ruta canónica de señalización BMP. Existen nueve proteínas SMAD, que se pueden agrupar en tres tipos diferentes. La primera de las categorías es la que corresponde a las proteínas SMAD Receptoras (RSMAD), que incluye SMAD 1, SMAD 2, SMAD 3, SMAD 5, SMAD 8 y SMAD 9. Estas proteínas se activan mediante la fosforilación por parte de los receptores del tipo I de TGF- β o BMP. Dentro de esta categoría se encuentran SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD8. SMAD2 y SMAD3 están principalmente involucradas en la señalización de TGF- β , mientras que SMAD1, SMAD5 y SMAD8 participan en la señalización de BMP. En concreto, los SMADs1/5/8 actúan como mediadores en la vía BMP. La segunda categoría de SMADs son las SMAD comunes (Co-SMAD) que tiene un único miembro, SMAD4. SMAD4 funciona como un socio común para las R-SMADs. Después de la fosforilación de las R-SMADs, SMAD4 se une a ellas y el complejo resultante se transloca al núcleo donde afecta la transcripción de genes específicos. La última categoría corresponde a las SMAD Inhibidoras (I-SMAD) formado por SMAD6 y SMAD7. Las proteínas SMAD tienen dos dominios conservados, el dominio homólogo Mad 1 (MH1) y 2 (MH2). El dominio MH1 se localiza en la región N-terminal y es responsable de la unión de SMAD con el ADN, mientras que el dominio MH2, situado en el C-terminal, es clave para la interacción proteína-proteína(85, 86). Estas proteínas

actúan como antagonistas en la señalización de TGF- β y BMP al inhibir la fosforilación de las R-SMADs o al interferir con la formación del complejo SMAD4-R-SMAD.

Tras la interacción con la BMP, el BMPRI activado fosforilará uno de los R-SMADs (SMAD1/5/8), que a continuación se separará del receptor e interactuará con el Co-SMAD, SMAD4, formando un heterotrímero compuesto por dos R-SMAD más SMAD4 o un heterodímero formado con un solo R-SMAD y el Co-SMAD. A continuación, estos complejos SMAD migran al núcleo, donde regulan de forma positiva la expresión de factores de transcripción específicos, como RUNX2 y OSX(87) (Figura 6).

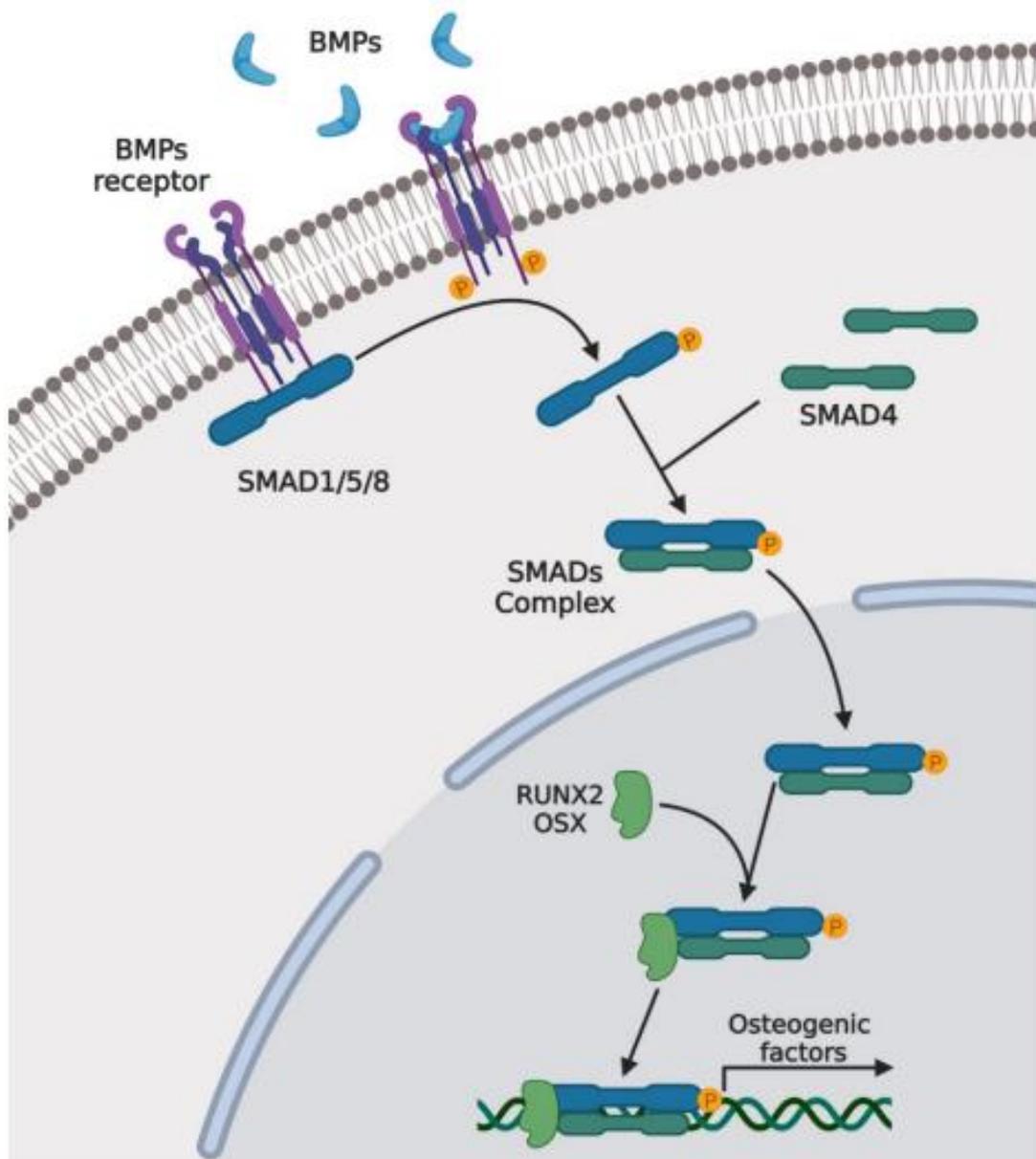


Figura 6. Vía de señalización canónica de las BMP. Los ligandos de BMP (azul) se unen a los receptores serín-treonina cinasa de tipo II, que reclutan y fosforilan a los receptores de tipo I. Tras la fosforilación por los receptores de tipo I, los SMAD regulados por receptores (R-SMADs, SMAD1/5/8) forman complejos con Co-SMAD (SMAD4), y luego se translocan al núcleo para regular la transcripción de genes diana a través de interacciones con factores transcripcionales

osteogénicos como *RUNX2* u *OSX*. Tomada de: García Sánchez D. *Specific Gapmers System Assay with Osteogenic Effect as a Therapy for the Treatment of Osteoporosis*. Tesis doctoral. Santander, España. Universidad de Cantabria, 2023. (Creado con Biorender.org) (88)

La vía de señalización de BMP no canónica e independiente de SMAD también puede activarse tras el reconocimiento de BMP por el BMPRI. El BMPRI activado inicia una serie de interacciones proteicas, incluyendo aquellas con las moléculas asociadas al receptor BMP 1 (BRAM1) o con el inhibidor de la proteína de la apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP), y las moléculas corriente abajo cinasa 1 activada por TGF β (TAK1) y la proteína de unión a TAK1 (TAB1). La señal descendente continuará por la acción de TAK1 y TAB1, que activarán vías descendentes dirigidas por cinasas como la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), la proteína cinasa p38 activada por mitógenos (p38 MAPK), la cinasa N-terminal de Jun (JNK) y las vías de señalización del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$).

Bien mediante la acción de antagonistas, o bien mediante la interacción con otras cascadas de señalización, el control de la vía de señalización por BMP se realiza a nivel extracelular e intracelular. A nivel extracelular, existen diferentes antagonistas de las BMPs, que muestran afinidad por moléculas BMP específicas. Estos antagonistas se caracterizan por contener un *cysteine knot* (o “nudo de cistina”, que es un motivo estructural de proteína que contiene tres puentes disulfuro) clave en la unión a las moléculas BMP. Los antagonistas de las BMPs pueden clasificarse en tres familias: la familia CAN, la familia Tsg (twisted gastrulation protein) y la subfamilia Chordin y Noggin(89). Actuando a un nivel diferente, la proteína BAMBI (BMP and Activin Receptor Membrane-Bound Inhibitor, o inhibidor de BMP y activina unido a membrana) también puede inhibir la vía de señalización de las BMP compitiendo con el BMPRI e impidiendo la formación del complejo receptor heterodimérico BMPRI(83).

Entre los antagonistas intracelulares de la vía BMP se encuentran: SMAD6 y SMAD7, pertenecientes a la categoría de los I-SMAD. Tras la activación de la vía canónica, estos I-SMAD, que se localizan normalmente en el núcleo, se translocan al citoplasma. Compiten con los R-SMADs por la unión con la región intracelular del BMPRI. Como I-SMADs carecen de MH1, bloquean la vía de señalización. Otros inhibidores bien conocidos de la cascada de señalización de las BMPs a nivel citoplasmático son los factores reguladores de la ubiquitinación de SMAD1 y 2 (SMURF1 y SMURF2) (90) (Figura 7). La acción de SMAD6 y SMAD7 facilita la actividad de ubiquitinación de los SMURF. La ubiquitinación de los R-SMAD, mediada por los SMURF inducirá su degradación por el proteasoma. De hecho, los modelos murinos SMURF $^{-/-}$ han mostrado un aumento de la masa ósea y una mayor actividad de los OBLs(91). Otro inhibidor intracelular de esta vía es TOB1, que forma parte de la familia TOB/BTG (Figura 7). TOB1 retiene el complejo R-SMAD/Co-SMAD en los cuerpos nucleares, bloqueando la acción del complejo SMAD y, por tanto, la expresión génica. También se ha descrito que TOB1 interfiere en la vía canónica de las BMP en el citoplasma celular mediante la estabilización del SMAD6-BMPRI. De acuerdo con este papel como inhibidor de la vía de señalización de BMP, se ha descrito que la deficiencia de TOB previene la pérdida de masa ósea al aumentar la actividad osteoblástica en modelos murinos de osteoporosis(92).

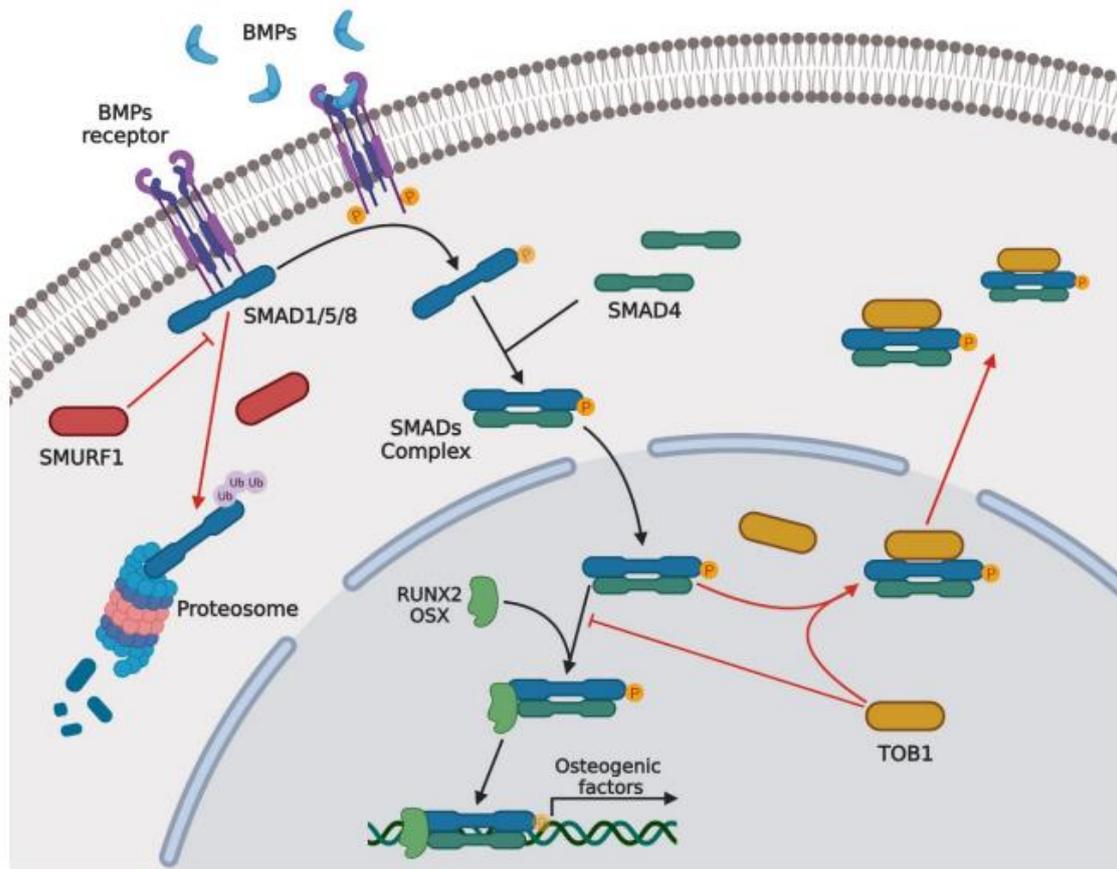


Figura 7. Vía de BMP con sus inhibidores (esquema simplificado). Tras el reconocimiento de BMP por el receptor de membrana, SMAD1/5/8 se fosforila y forma un heterodímero con Co-SMAD4. El complejo SMAD fosforilado entra en el núcleo donde interacciona con factores de transcripción induciendo la expresión de genes relacionados con la osteogénesis como RUNX2 y OSX. La inhibición de SMURF1 se realiza por ubiquitinación de SMAD1/5/8 induciendo su degradación, mientras que TOB1 compite con el factor de transcripción por el complejo SMAD, transportándolo fuera del núcleo. Tomada de: García Sánchez D. *Specific Gapmers System Assay with Osteogenic Effect as a Therapy for the Treatment of Osteoporosis*. Tesis doctoral. Santander, España. Universidad de Cantabria, 2023. (Creado con Biorender.org) (88).

Vía de señalización Wnt

A mediados de la década de 1930, Morgan et al. descubren la vía de señalización Wnt. El primer gen codificador de Wnt se denominó *Glazed* (Gla, -esmalado-), ya que estaba relacionado con un fenotipo de ojos vidriosos en *Drosophila melanogaster*. Sharma et al. describieron décadas después una mutación inducida del gen Wg. Esta mutación dio lugar a un fenotipo de *Drosophila* sin alas ("Wingless") (93). Estos dos genes, Gla y Wg resultaron ser alelos. El gen Int-1, un gen homólogo del anteriormente descrito en *Drosophila*, capaz de inducir la formación de tumores mamarios en modelos murinos fue descrito en 1982. Finalmente, en 1991, et al. propusieron el término Wnt, una mezcla de ambos genes, Wg e Int para referirse a toda la familia proteica de Int-1 (94).

Debido a su papel esencial en la autoregulación de las células madre, la determinación del destino celular, el desarrollo embrológico o la polaridad celular, la vía de señalización Wnt ha sido objeto de una intensa investigación. Prueba de la

importancia de esta vía de señalización son las diversas patologías vinculadas a sus alteraciones, entre las que se incluyen la espina bífida y el cáncer de mama, piel y colon(95).

Existe más de una vía de señalización Wnt, una vía Wnt canónica, dependiente de la β -catenina, y otras vías Wnt no canónicas, que son independientes de la β -catenina. Las vías no canónicas incluyen diferentes cascadas de señalización, dependiendo de los receptores de membrana implicados. En la vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina, la ausencia de señal Wnt conduce a la fosforilación de la β -catenina en el citoplasma (Figura 8). Esto se produce por un *complejo de destrucción* molecular, compuesto por la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), la caseína cinasa 1 (CK1), la proteína adenomatous polyposis coli (APC), la proteína andamio Axina y la proteína accesoria dishevelled (DVL)(96). La fosforilación de la β -catenina por este complejo marca la proteína para una posterior ubiquitinación por la ubiquitina ligasa B3 β -Trcp y su posterior degradación por el proteasoma. En ausencia de β -catenina en el núcleo, el factor de transcripción TCF/LEF (T-cell factor/lymphocyte enhancer factor) se asocia con Groucho e interactúa con histona deacetilasas, inhibiendo la expresión de los genes diana de Wnt/ β -catenina. El reconocimiento de Wnt se realiza mediante la familia de receptores transmembrana de las proteínas Flizzled (FZD) y correceptores como el LRP5/6 o el receptor huérfano 2 similar a la tirosina cinasa (ROR2). Tras el reconocimiento de Wnt por FZD, se induce la fosforilación del correceptor LRP5/6, seguida de la fosforilación de DVL, y así se forma un complejo heterotrimérico que interrumpe el *complejo de destrucción*. Como consecuencia de ello, la β -catenina se acumula en el citoplasma celular, hasta que finalmente se transloca al núcleo(97). Una vez en el núcleo, la β -catenina desplaza a Groucho y se une al factor transcripcional TCP/LEF. Este complejo recluta entonces la proteína del linfoma de células B-9 (BCL9), Pygopus y el modificador de histonas CBP, para inducir la expresión de los genes diana. En la vía canónica de Wnt, bajos niveles de actividad de esta se asocian a la autorrenovación de las CMMs, mientras que los niveles altos de dicha vía promueven la diferenciación osteogénica(98).

Tanto las mutaciones activadoras como las silenciadoras de proteínas necesarias para la señalización canónica de WNT han puesto de manifiesto la importancia de esta vía para el desarrollo normal del esqueleto. Sin embargo, aún no se han identificado los mecanismos transcripcionales específicos de cada tejido a través de los cuales la señalización WNT promueve la diferenciación de las células formadoras de hueso. La señalización canónica de WNT y el factor de transcripción relacionado con el hueso *RUNX2* son componentes funcionalmente vinculados de una vía necesaria para el inicio de la diferenciación de los OBLs. Se ha demostrado que, en el hueso del ratón knockout para *Sfrp1* (secreted frizzled-related protein-1), que presenta una señalización WNT activada y un fenotipo de masa ósea elevada, hay un aumento significativo de la expresión del factor de células T-1 (*Tcf-1*), *Runx2* y OCN. Mediante análisis mutacional se ha demostrado que en el promotor del gen *Runx2* reside un elemento regulador TCF que responde a la señalización canónica Wnt. Mediante inmunoprecipitación de cromatina se ha demostrado el reclutamiento de β -catenina y *Tcf-1* sobre gen *Runx2* endógeno. La coexpresión de *Tcf-1* con proteínas WNT canónicas resulta en una activación 2-5 veces mayor de la actividad promotora de *Runx2* y una inducción 7-8 veces mayor del ARNm endógeno en células mesenquimales y osteoprogenitoras pluripotentes de ratón. Este aumento es suprimido por SFRP. Así, existen pruebas de la regulación directa de *Runx2* por la señalización canónica WNT que sugieren que *Runx2* es una diana de β -catenina/TCF1 para la estimulación de la formación ósea. Se ha propuesto que la señalización WNT/TCF1, al igual que la

señalización de la proteína morfogenética ósea y el factor de crecimiento transformante beta, activa la expresión génica de Runx2 en las células mesenquimales para controlar la diferenciación de los osteoblastos y el desarrollo del esqueleto(99).

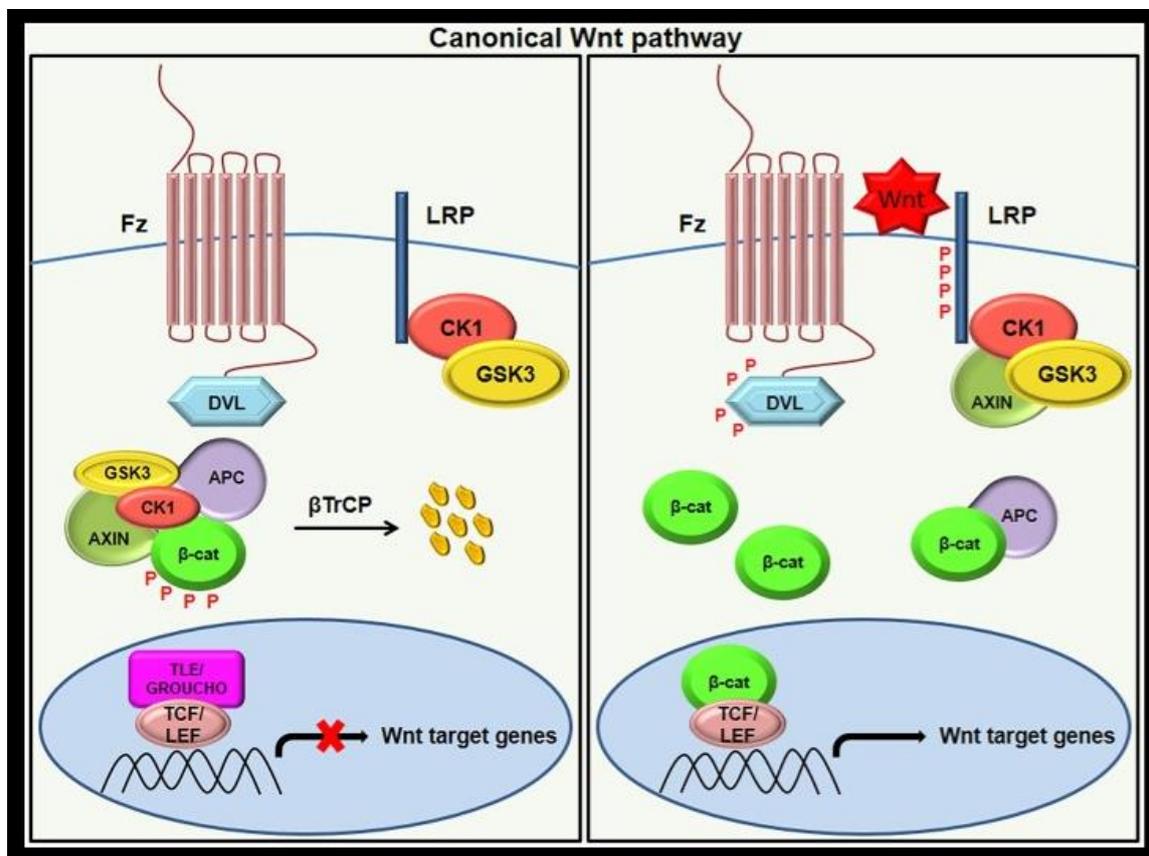


Figura 8. Señalización Wnt canónica. En ausencia de un ligando Wnt (izquierda), la fosforilación de β -catenina por el complejo de destrucción (compuesto por Axina, APC, CK1 y GSK3 β) conduce a su ubiquitinación por β -TrCP, que la destina a la degradación por el proteasoma. La ausencia de β -catenina en el núcleo provoca la unión del complejo represor que contiene TCF/LEF y TLE/Groucho al gen diana, reprimiendo así su actividad. Una vez que el ligando Wnt se une al receptor Frizzled y al correceptor LRP (derecha), los receptores LRP son fosforilados por CK1 y GSK3 β , lo que resulta en el reclutamiento de proteínas DVL a la membrana plasmática donde activan y estructuran el complejo de destrucción de β -catenina. El resultado es la acumulación de β -catenina en el citoplasma y su translocación al núcleo, donde forma un complejo con TCF/LEF y transcribe genes diana. Tomado de: Patel S, Alam A, Pant R, Chattopadhyay S. Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. *Front Immunol.* 2019 Dec 16;10:2872. (98).

La señalización Wnt no canónica comprende diferentes vías, de las cuales la más estudiada es la vía de la Planar Cell Polarity (PCP), además de la vía del Ca^{2+} . Las vías no canónicas de Wnt (Figura 9) se caracterizan por ser independientes de TCF/LEF. Junto con la FZD, los correceptores implicados en las vías PCP incluyen ROR1 y ROR2, con cascadas descendentes que implican GTPasas como Rho, Rac, Cdc42 y JNK. En la vía del Ca^{2+} , el reconocimiento de Wnt estimula la producción de diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-trifosfato (IP3). El IP3 induce la liberación intracelular de Ca^{2+} que activa la proteína cinasa C (PKC), la cinasa dependiente de calmodulina II (CAMKII) y la

calcineurina como moléculas efectoras. El factor de transcripción final de la vía del Ca^{+2} es el factor nuclear de células T activadas (NFAT), que conduce a la expresión de sus genes diana(100).

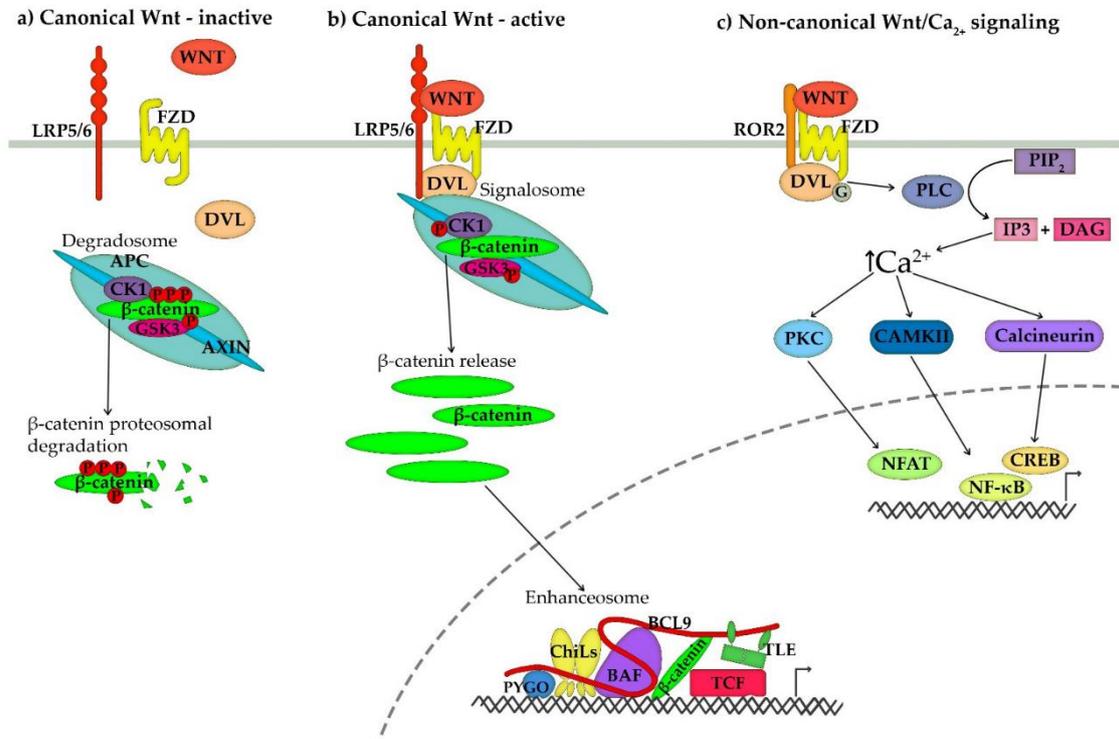


Figura 9. Representación esquemática de (a) la vía de señalización Wnt inactiva, (b) la vía de señalización Wnt canónica activada y (c) la vía de señalización Wnt/Ca²⁺ no canónica. La señalización Wnt no canónica se activa mediante la unión de un ligando Wnt no canónico al receptor Fzd y al ROR2. La dimerización del receptor recluta DVL a la membrana y activa las proteínas G heterotrímicas, que a su vez activan la PLC. La PLC escinde el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) unido a la membrana en IP₃ y 1,2DAG. El IP₃ induce la liberación de Ca²⁺ de las reservas intracelulares de calcio y la activación de enzimas sensibles al calcio, como la PKC, la CaMKII y la calcineurina. Estas proteínas activadas, a su vez, activan varios factores de transcripción, como el NF-κB, la proteína de unión a elementos sensibles al AMPc (CREB) y el NFAT. Tomado de: Lojk J, Marc J. Roles of Non-Canonical Wnt Signaling Pathways in Bone Biology. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 7;22(19):10840. (101)

La regulación de la señalización de la vía Wnt no solo se realiza a nivel intracelular, sino también a nivel extracelular. Entre los inhibidores extracelulares de esta vía se encuentran las proteínas secretas relacionadas con Frizzled (SFRPs) y las proteínas inhibidoras de Wnt. Ambas familias de proteínas son capaces de unirse a Wnt impidiendo así su unión a los receptores celulares. Además, algunas SFRPs son capaces de unirse al receptor FZD, compitiendo así con Wnt(102). Otros inhibidores descritos de Wnt son los pertenecientes a la familia Dickkopf (DKK). El DKK1 no sólo es capaz de interrumpir el heterotrímico formado entre Wnt y sus receptores, sino que también puede inducir la internalización y degradación del correceptor LRP6. El control de la vía también puede tener lugar en el núcleo de la célula durante la transcripción de β-catenina/LEF. Dos antagonistas nucleares, Chibby (CBY) e Icatibant (ICAT), interrumpen la interacción de β-catenina/LEF y promueven la exportación de β-catenina

fuera del núcleo. En concreto, el CBY compite con los factores de transcripción TCF/LEF por la β -catenina, formando un complejo molecular de CBY/ β catenina/chaperona 14-3-3, e induciendo la salida de β -catenina del núcleo al citoplasma(103).

1.2.2.2 Papel de los microARNs en la osteogénesis.

Los microARNs (miARN) son un grupo de pequeños ARNs (de 19 a 24 nucleótidos) no codificantes endógenos de cadena sencilla que modulan negativamente la expresión de ARN mensajero (ARNm) diana mediante su unión a la región 3' no traducida (3'-UTR) de dicho ARNm para regular su traducción y/o estabilidad. Los miARNs son transcritos primero como miARN primarios por la ARN Polimerasa II y luego son procesados antes de adquirir su conformación final madura (104).

La regulación de la expresión del ARNm por miARNs es específica de una célula u órgano y del estado metabólico del organismo. Varios mecanismos reguladores controlan no sólo la expresión de los miARNs, sino también su actividad y/o biodisponibilidad. Se han descrito varios mecanismos que modulan la acción reguladora de la expresión génica por parte de los miARNs. Entre estos mecanismos se encuentran los polimorfismos genéticos, la metilación de los promotores de dichos miARNs, la selección asimétrica de hebras de miARN, las interacciones con proteínas de unión a ARN (RBP) y con otros ARNs codificantes o no codificantes.

La vía de procesamiento de miARNs se ha considerado lineal y universal para todos los miARNs de mamíferos, e incluye la producción del transcrito primario de miARN (pri-miARN) por la ARN polimerasa II ó III y el corte del pri-miARN por el complejo microprocesador Drosha-DGCR8 (Pasha) en el núcleo (Figura 10). La horquilla precursora resultante, el pre-miARN, es exportada desde el núcleo hacia el citoplasma por Exportin-5-Ran-GTP. Ya en el citoplasma, la ARNasa Dicer, en complejo con double-stranded RNA-binding protein (TRBP), escinde la horquilla pre-miARN. La cadena funcional del miARN maduro se carga junto con las proteínas Argonauta (Ago2) en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde guía al RISC para silenciar los ARNm diana. Dicho silenciamiento se puede llevar a cabo mediante la escisión del ARNm, la represión de su traducción o la deadenilación, mientras que la cadena pasajera se degrada (Figura 10)(105).

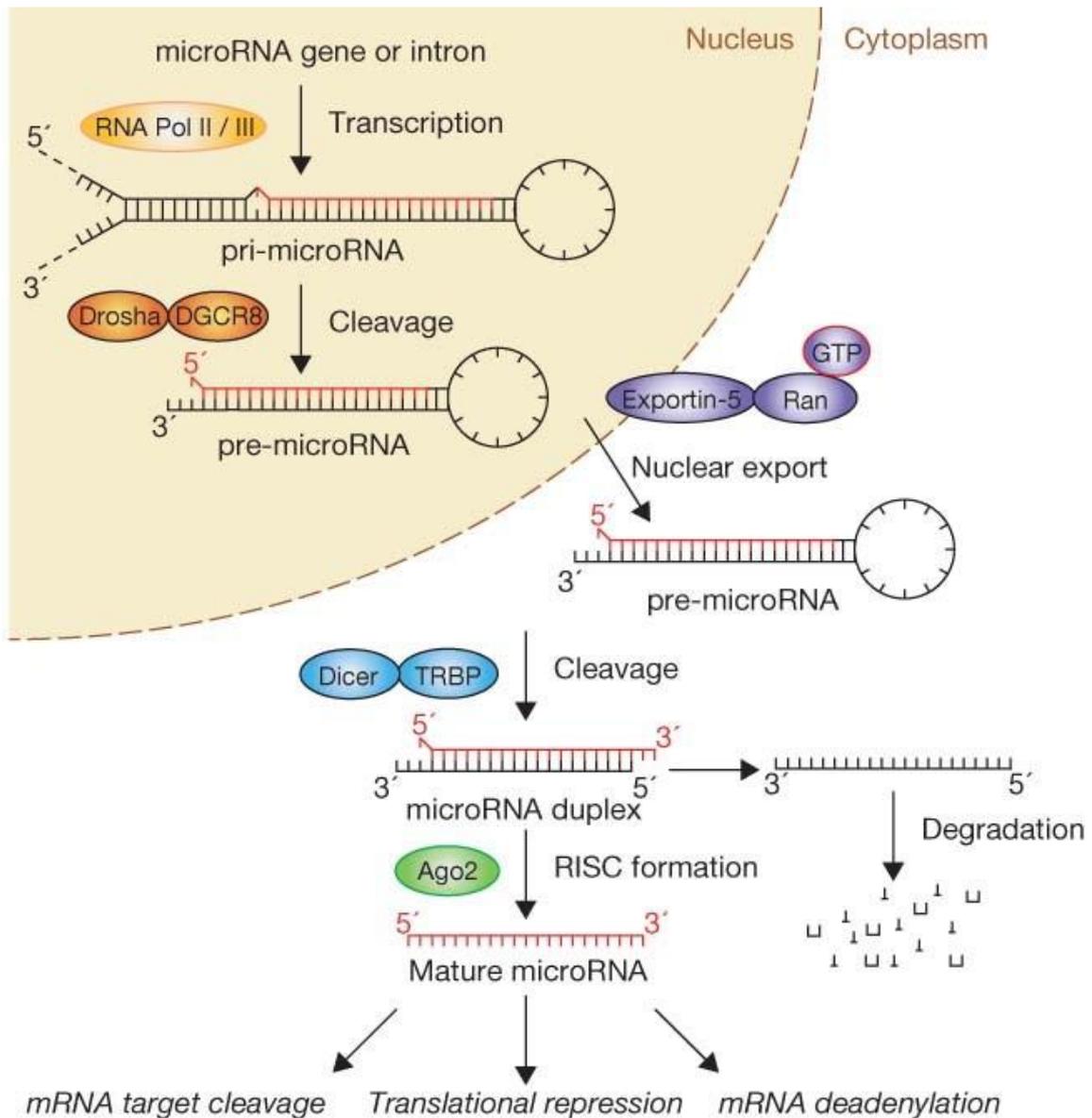


Figura 10. Vía canónica "lineal" del procesamiento de microARNs. Tomado de: Winter, J., Jung, S., Keller, S. et al. *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.* *Nat Cell Biol* 11, 228–234 (2009). (105)

Los miARNs funcionan como reguladores de la expresión génica al unirse a ARN mensajeros (ARNm) dianas y promover su degradación o al impedir su traducción en proteínas. Este mecanismo conduce a la disminución de la expresión de proteínas específicas, al mismo tiempo que facilita el incremento en la expresión de otras proteínas que están relacionadas con las inhibidas, estableciendo así una red de regulación compleja dentro de la célula. Este mecanismo indirecto permite a los miARN facilitar la regulación al alza de determinadas proteínas inhibiendo la expresión de sus reguladores negativos(106). Un miARN es capaz de modular varios genes diana, mientras que cada gen puede ser regulado a su vez por varios miARNs(107). Se sabe que los miARNs desempeñan un papel crucial en diversos procesos fisiológicos, como el desarrollo, la proliferación y diferenciación celulares, el metabolismo, la migración o la apoptosis. Cada vez existen más evidencias de que los miARNs regulan el desarrollo y la regeneración óseos, y están directamente implicados en la patogénesis de

numerosas afecciones del aparato locomotor, como la osteoartritis, la osteoporosis, la ONCF o los osteosarcomas(108).

Los miARNs desempeñan un papel destacado en la diferenciación tanto de OBLs como de OCLs, regulando la formación ósea a través de múltiples vías, y condicionando la diferenciación de las CMM óseas hacia preosteoblastos/osteoblastos (Figura 11). Se ha demostrado que la vía Wnt/ β -catenina potencia la actividad de la ALPL en las CMMs óseas humanas indiferenciadas para promover la osteogénesis(109). También se ha descrito la regulación de la osteogénesis de las CMMs óseas humanas por parte del miR-20 mediante la regulación a la baja de la señalización del PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) y de BAMBI(106). En otro estudio, se demostró que la regulación a la baja de miR-133 y miR-135 regula inversamente al alza los reguladores genéticos de la osteogénesis RUNX2 y SMAD 5. miR-133 y miR-135 pueden unirse a la región 3' no traducida (UTR) del ARNm CTGF, dando lugar a la regulación a la baja de la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)(110). Así, la regulación a la baja de CTGF por miR-133 y miR-135 puede afectar al equilibrio entre la formación y la resorción óseas, lo que influye en la diferenciación osteogénica y la mineralización ósea(111). También cabe destacar la acción de miR-346 sobre TCF/LEF. Otro ejemplo del papel destacado de los miARNs en la homeostasis ósea la acción de miR-15b sobre los OBLs actuando sobre Smurf1, un inhibidor de la ruta BMP y por lo tanto, aumentando la expresión de Runx2. miR-15b es un miARN específico expresado en OBLs que se une al ARNm de Smurf1 conduciendo esta unión a la regulación a la baja de la expresión de Smurf1. En cuanto a la expresión de Runx2, cuando miR-15b regula a la baja la expresión de Smurf1, conduce indirectamente a un aumento de la expresión de Runx2.

Por lo tanto, la regulación positiva y la negativa de la osteogénesis están mediadas, al menos en parte, por miARNs a través de la regulación de la expresión de factores de transcripción. Estos hallazgos sugieren que la administración exógena de determinados miARNs puede ser una potencial herramienta terapéutica en diversas patologías óseas(111).

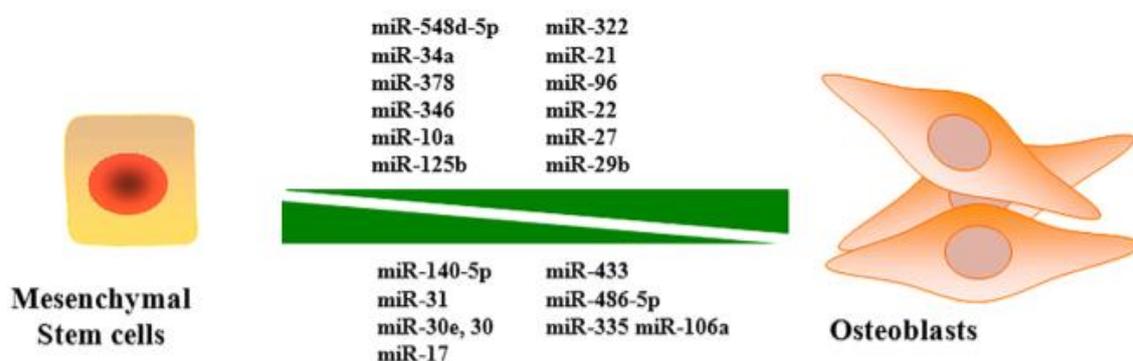


Figura 11. Control de los miARNs sobre la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales. Los miARNs situados encima del recuadro verde promueven la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales en osteoblastos; los miARNs situados debajo

del recuadro verde inhiben la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales en osteoblastos. Tomado de: Peng S, Gao D, Gao C, Wei P, Niu M, Shuai C. MicroRNAs regulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (Review). Mol Med Rep. 2016 Jul;14(1):623-9.(112).

Actualmente, se considera que la ONCF está asociada con la disfunción de las CMMs de la médula ósea, habiéndose demostrado una afectación a nivel de su capacidad de proliferación, una mayor apoptosis, una osteogénesis deficiente y una mayor adipogénesis(113). Además, se ha identificado una expresión génica aberrante en las CMMs de estos pacientes, que afectaría particularmente al equilibrio entre osteogénesis y adipogénesis. Por esta razón, se ha prestado cada vez más atención a la detección de nuevos factores que regulan la expresión génica en pacientes con ONCF, como los ARN no codificantes, especialmente los miARN. Así, se han encontrado diferencias significativas en la expresión de miARN entre los pacientes con ONCF no traumática y aquellos con fractura del cuello femoral(107). Por ejemplo, Xiang et al. Encontraron en 2019 un total de 129 miARNs expresados de forma aberrante en las CMMs de pacientes con ONCF(113). Estudiando el perfil de expresión de miARNs en la interfase reparativa de la cabeza femoral necrótica, Yuan et al. identificaron en 2015 un total de 2578 miARNs, con 17 de ellos consistentemente expresados de forma aberrante(114). En otro estudio realizado en 2021, Han et al. Identificaron 134 miARNs expresados de forma diferente en muestras de ONCF(115).

En resumen, se cree que los miARNs, como factores epigenéticos, desempeñan un importante papel regulador en el proceso de diferenciación osteogénica de las CMMs (Figura 11). Los miARNs regulan la diferenciación osteogénica actuando sobre genes osteogénicos como Runx2 y Osx, y sobre vías de señalización como Wnt, TGF- β /BMP, MAPK y Notch.

1.3 Fisiopatología de la osteonecrosis

La osteonecrosis, también conocida como necrosis aséptica, necrosis avascular o necrosis ósea isquémica, es un proceso patológico producido por la falta temporal o permanente de irrigación sanguínea al hueso, que conduce progresivamente a la muerte del tejido óseo y a la destrucción del hueso y/o de las superficies articulares. Aunque puede afectarse cualquier hueso del organismo, la forma más frecuente es la osteonecrosis de cadera, o ONCF, que es el tema del presente trabajo(8). La evidencia de las últimas décadas acerca de la fisiopatología de la ONCF destaca la vulnerable microcirculación de la cabeza femoral y las severas consecuencias de la oclusión microvascular, tanto por trombosis intravascular como por compresión extravascular (Figura 12). Se ha evidenciado que una reducción de 1,6 veces en el flujo sanguíneo de la cabeza femoral reduce la PaO₂ en un tercio, y tras dos horas de isquemia comienza a producirse la necrosis de los osteocitos(116). En estas condiciones, la necrosis de otras células de la MO como los adipocitos o las células hematopoyéticas tiene lugar antes que la de los osteocitos. La isquemia puede producirse por una interrupción mecánica debida a fracturas o luxaciones, por una oclusión intravascular provocada por trombos o émbolos de grasa o por una compresión extravascular asociada a hipertensión intraósea(117). A continuación, detallaremos la fisiopatología de la ONCF, tanto en sus formas postraumáticas como en las no traumáticas, que a su vez se clasifican en secundarias o en idiopáticas (sin causa conocida atribuible).

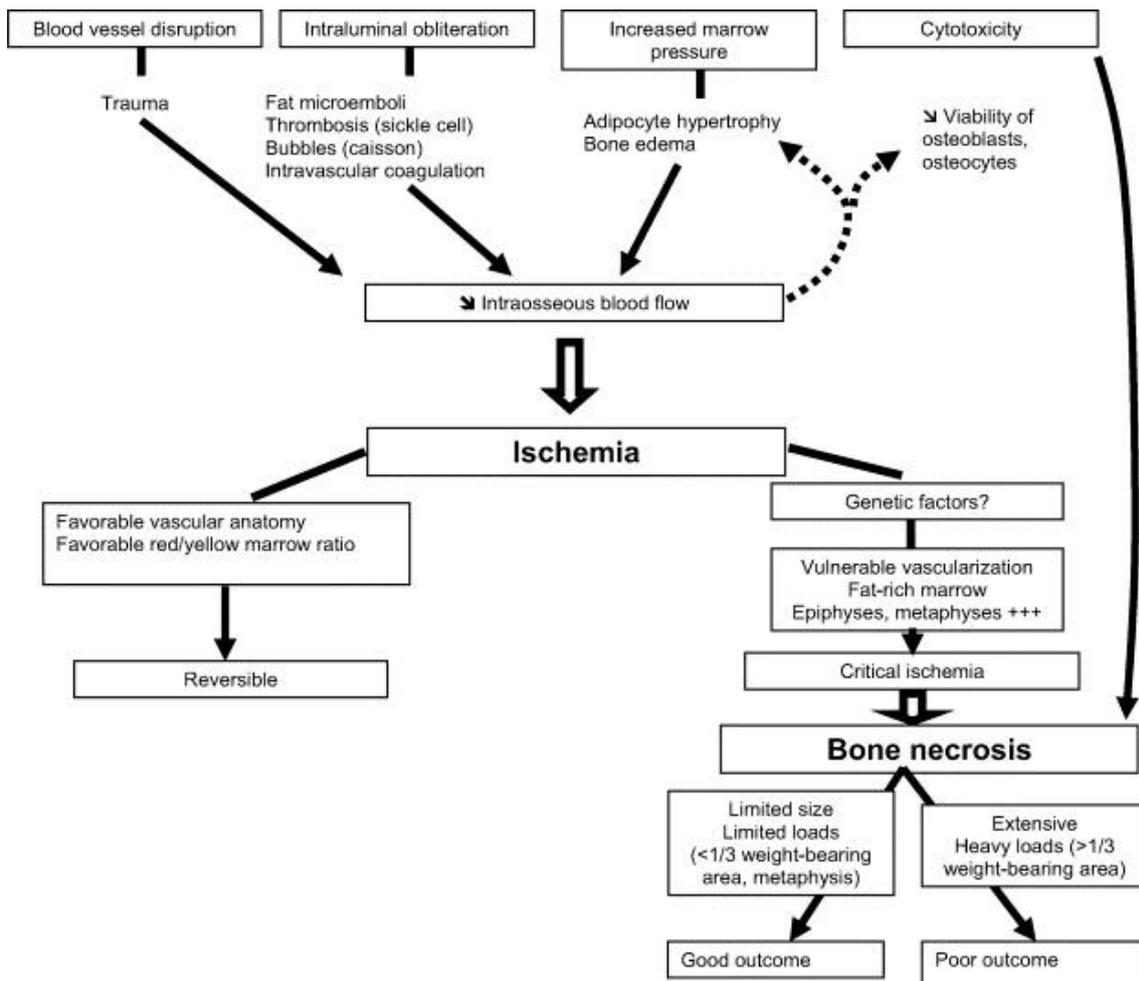


Figura 12. Fisiopatología general de la ONCF. La interrupción directa en el aporte vascular, la oclusión trombótica, la compresión extravascular o la citotoxicidad conducen a una isquemia que termina finalmente en la necrosis osteocitaria. Tomado de Lafforgue P. Pathophysiology and natural history of avascular necrosis of bone. *Joint Bone Spine.* 2006 Oct;73(5):500-7.(118).

1.3.1 Fisiopatología de la ONCF traumática

La patogénesis de la ONCF de causa traumática resulta obvia. Al tener lugar una fractura o luxación de la cadera se interrumpe la circulación de esta estructura, afectándose el suministro y/o el drenaje de sangre de la cabeza del fémur (Figura 13). En estos casos, se trata en la mayoría de las ocasiones de fracturas intracapsulares de cabeza femoral (15% a 50%), y de forma menos frecuente, en el contexto de una luxación de cadera (15% a 25% de los casos)(31).

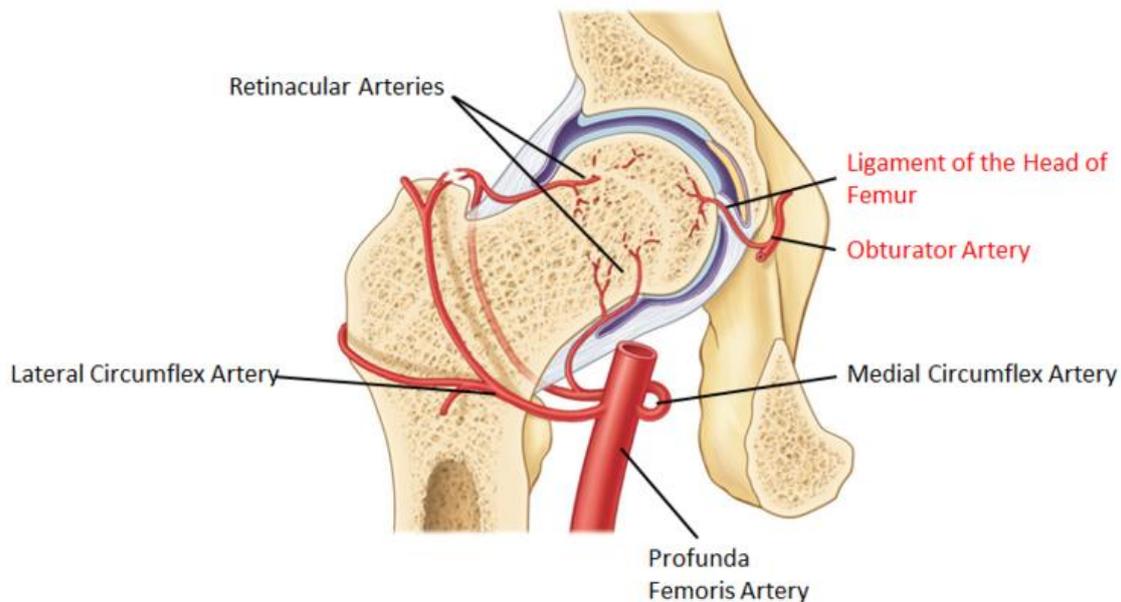


Figura 13. Vascularización de la cabeza femoral. La cabeza femoral es totalmente intracapsular, lo que conlleva trascendencia clínica. Un anillo vascular alrededor del cuello de la cabeza femoral se forma por las arterias circunflejas medial y lateral en la zona de unión de la cápsula fibrosa. Los vasos del ligamento, ramas acetabulares de la arteria obturatriz y de la circunfleja medial, proporcionan un pequeño aporte vascular a la cabeza femoral. La proximidad de los vasos retinaculares a la superficie del cuello femoral los hace vulnerables a las lesiones. Las ramas cervicales ascendentes, o vasos retinaculares, ascienden por la superficie del cuello femoral. Los vasos retinaculares laterales parecen ser los de mayor trascendencia, al aportar sangre a la porción lateral de la cabeza femoral. Las arterias epifisarias entran por la periferia de la porción no articular de la cabeza femoral. Tomado de: <https://doldmd.com/hip-conditions/avascular-necrosis-avn-of-the-femoral-head-hip-osteonecrosis/> Accedido el 20/12/2023(119)

La cabeza del fémur está irrigada por ramas de las arterias circunfleja femoral medial y circunfleja femoral lateral (ACFM y ACFL). Estas ramas penetran hasta la región metafisaria y en la porción no articular de la epífisis de la cabeza femoral. La rama profunda de la ACFM es considerada el aporte sanguíneo más importante de la cabeza femoral (Figura 13)(120). La localización de estos vasos los hace susceptibles de lesión directa en contextos traumáticos. Por ejemplo, las fracturas intracapsulares del cuello femoral pueden causar traumatismos directos en los vasos que irrigan el hueso subcondral, habiéndose reportado incidencias relativamente altas de ONCF en estas lesiones. El metaanálisis de Slobogean *et al.* en 2015 reportó una incidencia de ONCF en el 14,3% de estos pacientes(121). Liu *et al.* demostraron mediante angiografía por sustracción digital que la tasa de ONCF después de una fractura del cuello femoral estaba directamente relacionada con el número de vasos que cruzaban la línea de fractura(122).

También se ha estudiado la relación entre el tipo de fractura, la precisión de la reducción y el tiempo de reducción en el desarrollo de ONCF. Por ejemplo, en un estudio clásico, Garden demostró que la malreducción de fracturas subcapitales (basada en criterios radiológicos) conducía a esta enfermedad en el 65,4% de los casos, frente al 6,6% de pacientes en los que se consiguió una reducción aceptable(123). En otro emblemático estudio, esta vez prospectivo involucrando a más de mil pacientes con fractura de cuello femoral, Barnes y Garden encontraron una tasa de colapso de la

cabeza femoral del 16% en los casos de fracturas no desplazadas tipo I, frente a un 27% en los casos con fracturas desplazadas de tipo III-IV(124). Resultados similares se han confirmado, entre otras, en las series de Nikolopoulos et al. de 2003(125), de Wang et al. de 2014(126) y de Parker et al. de 2013(127). En relación al momento de tratamiento, el metaanálisis llevado a cabo por Papakostidis et al. de 2015 no consiguió demostrar la relación entre la incidencia de ONCF y el intervalo entre la lesión y la fijación interna definitiva(128). Con el fin de reducir la posibilidad de desarrollar una ONCF, se ha propuesto la descompresión de la cadera tras una fractura intraarticular de cuello femoral, al minimizar teóricamente la compresión intraósea de los vasos que nutren la cabeza femoral. Sin embargo, se encuentran en la literatura evidencias tanto a favor como en contra de esta teoría(31).

En relación con las fracturas de cadera extracapsulares que afectan a la región intertrocanterea, distales a la entrada de las arterias que nutren la cabeza femoral, la incidencia de ONCF es significativamente menor (del 1,37% en los dos primeros años post lesión). La severidad del traumatismo, la geometría de los fragmentos y el desplazamiento de la fractura han sido los principales factores de riesgo de ONCF reportados en estas fracturas(129).

Además de las fracturas, ya se ha comentado la luxación de cadera como causa traumática de ONCF, al interrumpir el aporte sanguíneo a la cabeza femoral. La rama profunda de la ACFM puede lesionarse durante la luxación posterior de cadera, ya que atraviesa la parte posterior del obturador externo y la parte anterior del cuadrado femoral(130). En relación con la luxación posterior de cadera, se ha reportado una incidencia de ONCF variable, con cifras entre el 5 y el 60%, dependiendo del tiempo hasta la reducción o de las lesiones asociadas(31). Hougaard et al., en su estudio clásico de 1986, encontró tasas de ONCF en estas lesiones del 4,8 frente al 52,9% en función de si la reducción se producía en las primeras 6 horas o posteriormente(131), resultados confirmados más recientemente en el trabajo de Lai et al. 2022(132). En referencia a las luxaciones anteriores de cadera, no existe hoy en día información extensa de la evolución a largo plazo, pero algunos trabajos sugieren el desarrollo de ONCF en el 10% de los casos(133).

1.3.2 Fisiopatología de la ONCF no traumática

Además de la interrupción del flujo sanguíneo debida a fracturas o luxaciones, ya tratada en el punto anterior, la alteración de la vascularización de la cabeza femoral puede deberse a la oclusión intravascular provocada por trombos y émbolos de grasa o por una compresión extravascular en el contexto de hipertensión intraósea. Cuando existe un claro factor etiológico atribuible al desarrollo de la ONCF, por ejemplo, los glucocorticoides, se habla de formas secundarias de la enfermedad, mientras que en ausencia de una causa conocida se emplea el término ONCF idiopática. A continuación, analizaremos la fisiopatología de las formas no traumáticas de la ONCF.

1.3.2.1 Hemoglobinopatías

La interrupción del flujo sanguíneo a la cabeza femoral puede deberse a una obstrucción intravascular. Diversas etiologías pueden ser la causa de esta obstrucción, como agregados de células falciformes, coágulos o trombos lipídicos(31). La anemia falciforme está causada por una mutación genética en la cadena beta de la hemoglobina que produce una hemoglobina anormal que se polimeriza bajo estrés fisiológico. La polimerización de múltiples moléculas de hemoglobina da lugar a glóbulos rojos que

adoptan el característico aspecto falciforme. La incidencia de ONCF en pacientes con anemia falciforme ha sido reportada entre un 11 y un 37%, aumentando además a medida que el paciente envejece, presumiblemente debido a la acumulación de lesiones vasculares(134). Se han observado en estos pacientes tanto elevadas tendencias a la progresión de la ONCF como cuadros de afectación bilateral(135). Se ha propuesto que microambientes con baja tensión de oxígeno provocan la precipitación de la hemoglobina alterada, lo que conduce a la deformación típica del hematíe de estos pacientes. Estas células falciformes tienen tendencia a adherirse unas a otras, llevando a la oclusión vascular, especialmente a nivel de zonas con bajo flujo, como ocurre en algunas áreas de la cabeza femoral(136).

1.3.2.2 Estados de hipercoagulabilidad

Los estados de hipercoagulabilidad y las trombofilias genéticas son cruciales en el desarrollo de la ONCF. Anomalías en la coagulación, como las observadas en trombofilias familiares, aumentan el riesgo de trombos intraóseos y han sido vinculadas a la ONCF. Jones et *al.* observaron que un 82% de los afectados por ONCF presentaban al menos una anomalía coagulante, en contraste con el 30% de los controles, y un 50% con múltiples alteraciones frente al 2,5% en controles (132). Las trombofilias hereditarias más frecuentes incluyen la mutación del factor V de Leiden y la del gen de la protrombina G20210A, así como las deficiencias de antitrombina III (AT-III), y proteínas C y S, y la mutación de la MTHFR (133). Zalavras et *al.* reportaron una mayor prevalencia de la mutación del factor V de Leiden en pacientes con ONCF comparado con controles (18% vs. 4,6%) (134), lo que indica una relación entre la hipercoagulabilidad y la ONCF.

Además, se han detectado niveles alterados de lipoproteína A, factor von Willebrand y proteínas C y S en pacientes con ONCF, lo que sugiere una regulación defectuosa de la coagulación y la fibrinólisis, favoreciendo la formación de trombos (135). La mutación G20210A del gen de la protrombina aumenta los niveles de protrombina, elevando la generación de trombina y el riesgo protrombótico, aunque su prevalencia varía entre grupos étnicos y su impacto en la ONCF es ambiguo, potenciando otros estados trombogénicos (133).

1.3.2.3 Hipofibrinólisis

El inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) es una proteína sintetizada y liberada por las células endoteliales que funciona como inhibidor serin proteasa. Es el principal inhibidor de los activadores del plasminógeno circulantes, como el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y la urocinasa. El PAI-1 ejerce sus efectos principalmente a través de la formación de complejos con el t-PA, reduciendo la capacidad de este para convertir el plasminógeno en plasmina. La supresión de la generación de plasmina conduce a la hipofibrinólisis y con ello a un estado relativo de hipercoagulabilidad. Dado que el PAI-1 es un inhibidor de la fibrinólisis, se han asociado niveles elevados de PAI-1 con la trombosis arterial y venosa, y también con la ONCF. La mayor parte de las evidencias encontradas en la literatura confirman la asociación entre el polimorfismo PAI-1 4G/5G y el riesgo de ONCF(137). Por ejemplo, la hipofibrinólisis secundaria a altos niveles de inhibidor del activador del plasminógeno se ha encontrado en un 31% de pacientes con ONCF, frente a un 3% de los controles(138). Sin embargo, un estudio llevado a cabo con la población japonesa no encontró tal asociación a nivel significativo, lo que enfatiza la importancia del sustrato genético en la posibilidad de desarrollar ONCF(139).

1.3.2.4 *Compresión extravascular*

La cabeza femoral puede conceptualizarse de forma análoga a un Resistor de Starling, un aparato de laboratorio que simula el flujo de sangre a través de un vaso sanguíneo y permite la medición de la resistencia vascular (Figura 14). Consiste en un tubo largo y estrecho, generalmente hecho de material como el vidrio, que se utiliza para modelar la resistencia al flujo que la sangre encuentra al pasar por los vasos pequeños. Al variar la presión en el tubo y medir el flujo, los investigadores pueden estudiar la relación entre la presión y el flujo sanguíneo, lo que es fundamental para entender cómo se regula la presión sanguínea y cómo se distribuye la sangre a través de los tejidos. En este caso, la vasculatura ósea representaría los tubos compresibles y el espacio extravascular intraóseo representa el espacio extra-tubular de la cámara (Figura 14). Las elevaciones de la presión dentro del espacio extravascular intraóseo podrían disminuir el flujo sanguíneo en los pequeños vasos que lo atraviesan(31).

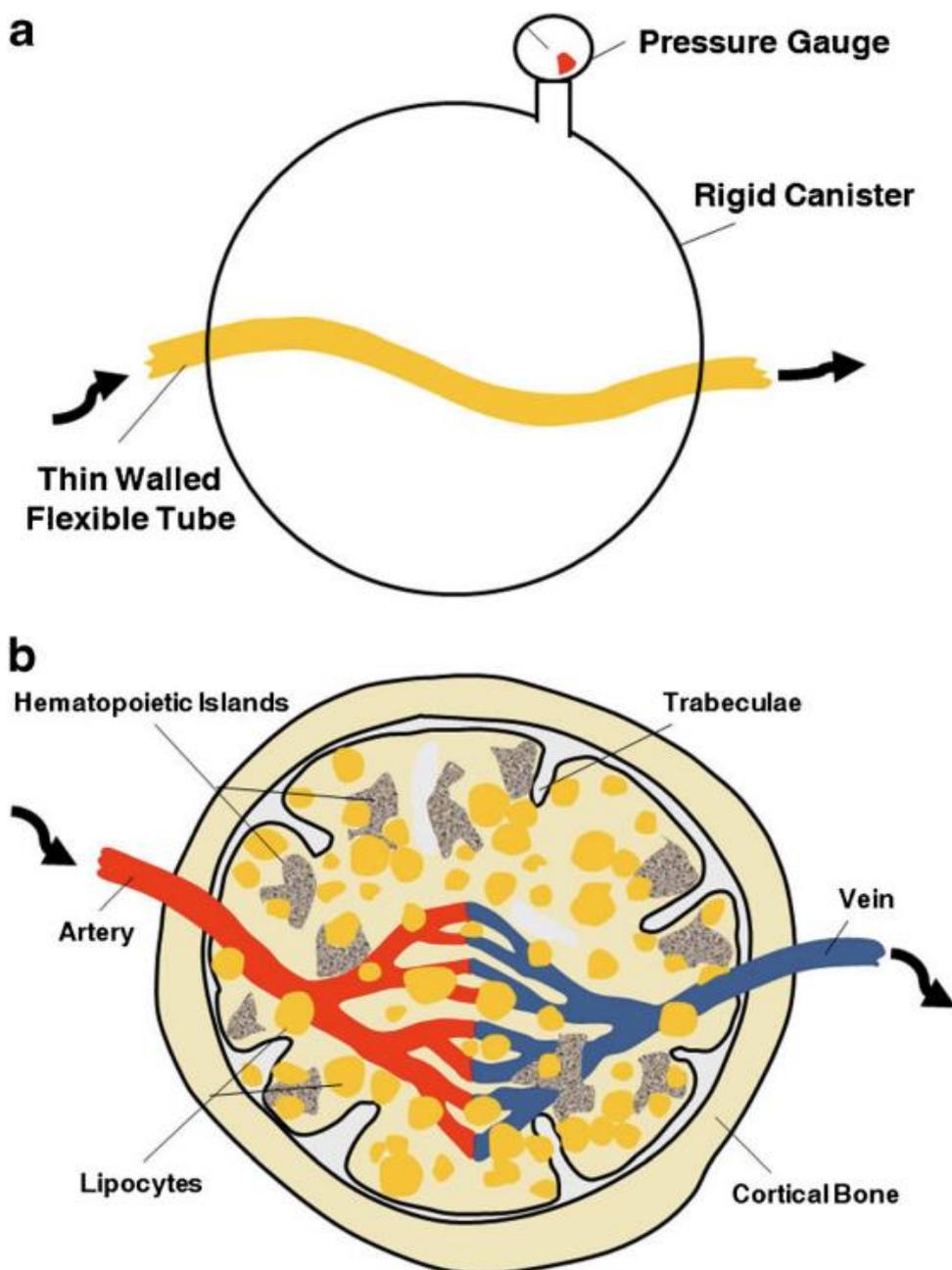


Figura 14. Concepto del “Resistor de Starling” aplicado a la microcirculación ósea. A) El aumento de la presión en una cámara de paredes rígidas puede disminuir el flujo de fluido en un tubo de paredes flexibles que atraviesa la cámara. B) En el caso del hueso, el compartimento extravascular intraóseo puede funcionar como una cámara de paredes rígidas. La hipertensión intraósea o el tejido ocupante de espacio pueden restringir lo suficiente el flujo sanguíneo microcirculatorio como para producir isquemia. Tomada de: Shah KN, Racine J, Jones LC, Aaron RK. Pathophysiology and risk factors for osteonecrosis. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015;8(3):201-9.(31).

El depósito de lípidos y la hipertrofia adipocitaria en el espacio medular son las dos condiciones clínicas predominantes por las que la presión extravascular intraósea podría reducir la circulación. A menudo asociado a la ingesta de corticosteroides o alcohol, el aumento de la presión extravascular se ha hipotetizado como causante de una obstrucción del flujo, tanto arterial o como de salida venoso, que conduce a la

isquemia de los elementos medulares y osteocitos de la cabeza femoral. Se ha demostrado que tanto el alcohol como los corticosteroides aumentan el tamaño de los adipocitos, pero, además, alteran el metabolismo lipídico y promueven la transformación celular de linaje osteocítico hacia uno adipocítico(140, 141).

Así, la elevación de la presión crítica en la MO puede deberse a la hipertrofia de los adipocitos (relacionada con el tratamiento con glucocorticoides, el abuso del alcohol o la dislipidemia), pero no es la única causa. Otras situaciones ocupantes de espacio en la MO, como el edema, la hemorragia o las burbujas de nitrógeno (enfermedad de Caisson), pueden conducir al aumento de la presión intraósea. Además, los cuadros infiltrativos de la MO, como leucemias y linfomas, o enfermedades de depósito, como la enfermedad de Gaucher, pueden tener las mismas consecuencias, favoreciendo el desarrollo de ONCF(118).

1.3.2.5 Corticosteroides

Debido a su mecanismo multifactorial en el desarrollo de la ONCF, a su prevalencia y a su trascendencia clínica, dedicaremos un apartado de la fisiopatología de la osteonecrosis de cadera a los corticosteroides. En 1953, Pietrogrande y Marino fueron los primeros en comunicar la necrosis isquémica de la cabeza femoral asociada al uso de corticosteroides desde que se comenzaron a utilizar estos fármacos(142). Según estudios retrospectivos, la osteonecrosis de cadera inducida por esteroides (ONCFIE) está implicada entre el 10 y el 30% de los casos de ONCF(31). Los corticosteroides se utilizan en diversas enfermedades, como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el asma, el trasplante de órganos o la vasculitis. Aunque en el desarrollo de la ONCF ha sido difícil separar el efecto del uso de corticosteroides de la enfermedad subyacente, un metaanálisis clásico llevado a cabo por Felson et al. no encontraron ninguna asociación entre la enfermedad subyacente y la ONCF(143). Se ha realizado hasta el momento un importante esfuerzo para establecer qué componente de la dosis (la dosis media diaria, la dosis acumulada o la duración) se asocia con el desarrollo de ONCF. Estudios prospectivos de cohortes han sugerido que una dosis media diaria de >20 mg/día se asocia a un riesgo significativo de ONCF. El citado metaanálisis de Felson et al. determinó un aumento de incidencia de ONCF de 4,6 veces por cada aumento de 10 mg/día en la ingesta de corticosteroides orales(143). Las conclusiones clínicas sobre la relación entre el consumo de corticosteroides y la ONCF se han obtenido en gran medida a partir de estudios retrospectivos y transversales que establecen la prevalencia del consumo de corticosteroides en pacientes con ONCF. Estos estudios no establecen la incidencia de ONCF en pacientes que utilizan corticosteroides y no establecen el riesgo causal de los estos, sino que informan sobre la fracción de pacientes con ONCF que también los utilizan(144, 145). Los trabajos que han analizado con estudios de cohortes prospectivas la incidencia de ONCF en pacientes que utilizan corticosteroides informan de una tasa del 4 al 7 % (146).

En un reciente artículo de revisión, Wang et al. enumeraron cinco teorías principales sobre la patogénesis de la ONCFIE: trastornos del metabolismo lipídico; disminución del potencial de osteogénesis; aporte sanguíneo insuficiente; apoptosis celular; y polimorfismo génico. Los autores concluyeron que la ONCFIE es el resultado final de la acción combinada de múltiples mecanismos relacionados con el consumo de esteroides(142).

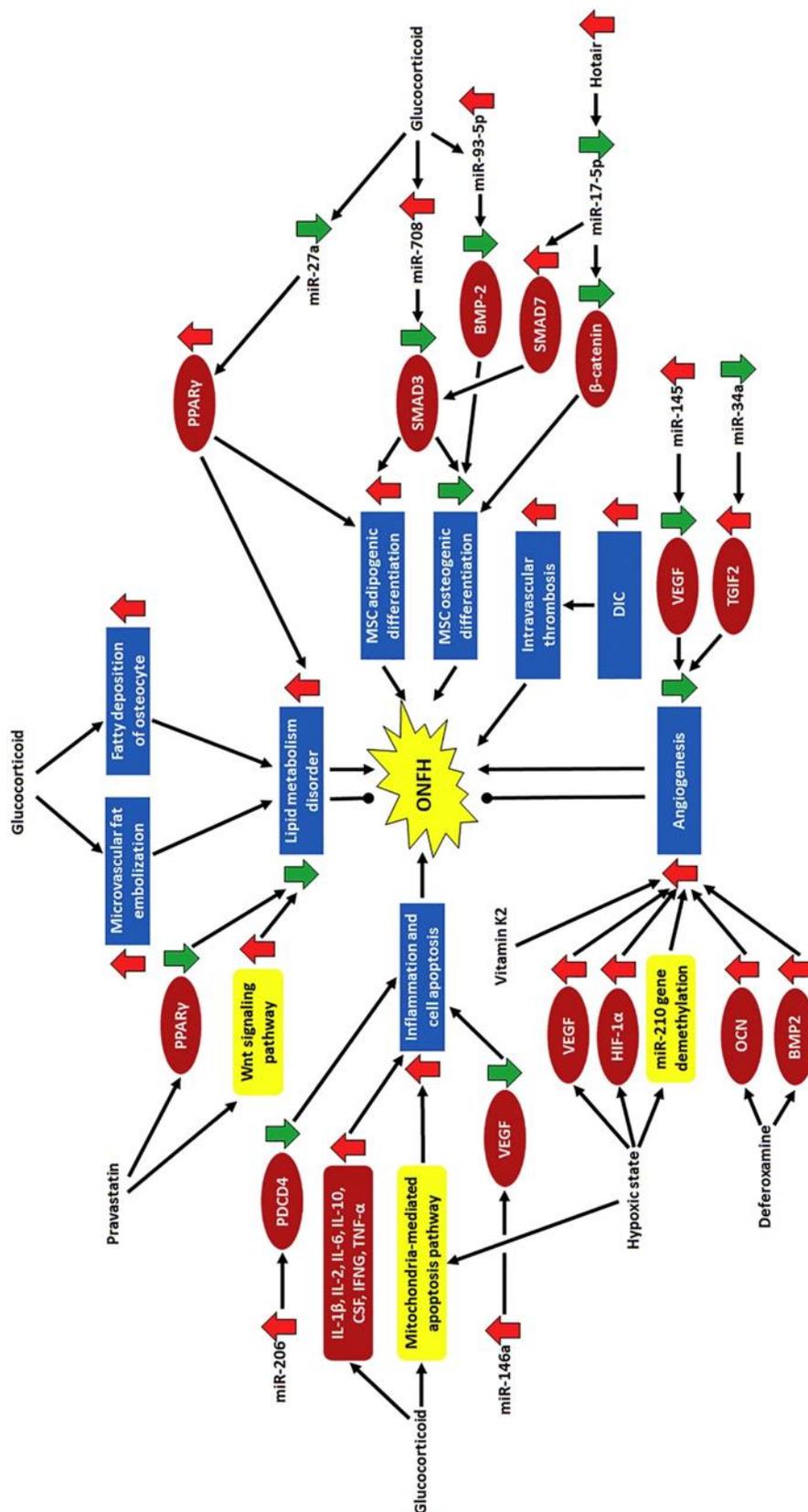


Figura 15. Patogénesis de la ONCFIE. Tomada de: Wang A, Ren M, Wang J. The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A systematic review of the literature. *Gene*. 2018 Sep 10;671:103-109.

Existen dos mecanismos principales de la ONCFIE derivada del trastorno en el metabolismo lipídico inducido por hormonas: la embolización grasa microvascular y el depósito de grasa en los osteocitos. Con el uso de glucocorticoides aumenta la

movilización de grasa subcutánea. A medida que se prolonga la duración de la administración, los niveles de lípidos en sangre tienden a aumentar, lo que a su vez provoca una distribución anormal de los lípidos, embolismo graso dentro de los microvasos, acumulación de grasa en la cavidad medular, aumento del volumen de las células adiposas y aumento de la presión en la cavidad medular.

En la década de 1970, Rose propuso la teoría de la coagulación intravascular diseminada como causa de la necrosis ósea, considerándose esta como la causa directa de la ONCFIE(147). El examen anatomopatológico de la cabeza femoral ha encontrado trombosis intravascular en muchos pacientes con ONCFIE(148). Además, se ha observado que la heparina inhibe la aparición y el desarrollo de la ONCFIE(149). Hoy se sabe que esta disfunción endotelial y de la hemostasia es un factor clave en la patogenia de la ONCFIE (Figura 16). Las células endoteliales óseas y sus precursoras, las células progenitoras endoteliales, desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura y función normales de los vasos sanguíneos. La angiogénesis alterada, la apoptosis anormal, la trombosis y la embolia grasa causadas por la disfunción de las células endoteliales óseas están implicadas en la aparición y progresión de la ONCFIE(150).

Los corticosteroides también pueden afectar a la microcirculación en el hueso mediante el depósito intracelular de lípidos en las células óseas, contribuyendo al aumento de volumen y presión intraóseos(151). Por otra parte, se ha demostrado que, cuando se exponen a los corticosteroides, las CMMs tienen una mayor tendencia a diferenciarse hacia linaje graso respecto a óseo. Además, la exposición crónica a estos fármacos provoca una disminución del número de CMMs, debido al aumento del número de estas células diferenciadas en adipocitos. Estos hallazgos se ven corroborados por el aumento de MO adiposa observado en las imágenes de resonancia magnética de la cabeza femoral de pacientes con ONCFIE(152).

Se ha demostrado un aumento de la apoptosis de OBLs y OCTs en ratones y humanos que reciben glucocorticoides. Además, la apoptosis de OCTs inducida por glucocorticoides podría alterar de forma única la función mecanosensorial de la red de OCTs e iniciar así la secuencia de acontecimientos que conducen al colapso de la cabeza femoral(153). Por ejemplo, los niveles de expresión génica de *BCL2* y *BAX*, que regulan la vía de la apoptosis mediada por las mitocondrias, son diferentes en entornos de dexametasona y anóxicos(154). El proceso apoptótico en pacientes con ONCFIE se articula mediante la vía de la caspasa 3 y el activador de la transcripción 1 (STAT-1)(142).

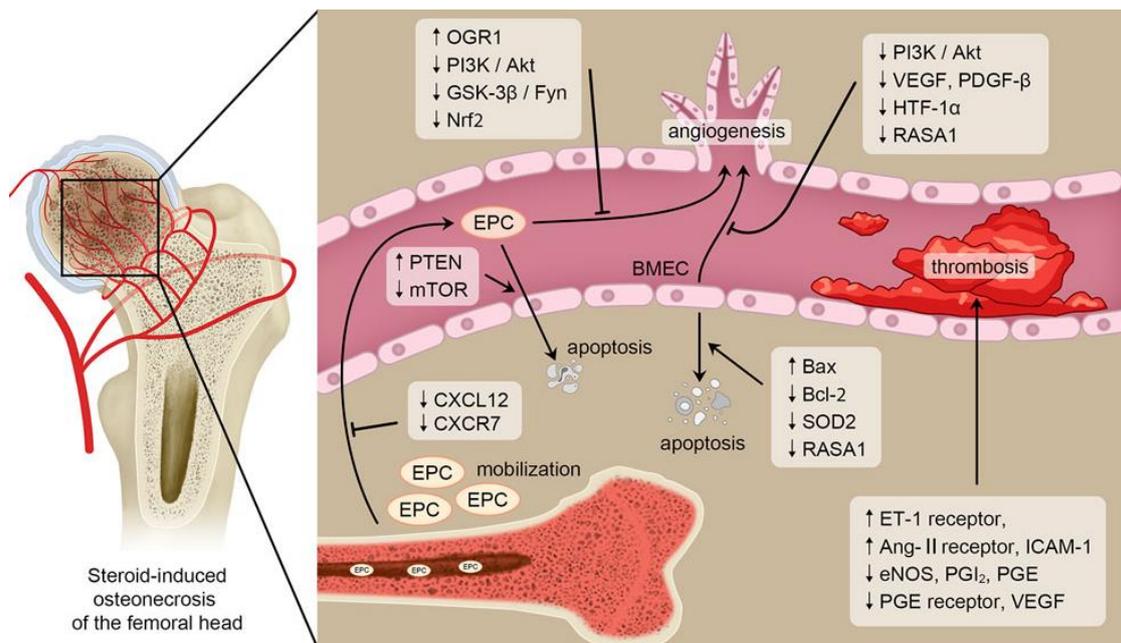


Figura 16. Patogénesis de la ONCFIE relacionada con las células endoteliales óseas. Los vasos sanguíneos desempeñan un papel fundamental en la aparición y progresión de la ONCF, y las células endoteliales óseas son esenciales para mantener la homeostasis vascular y la angiogénesis. Por lo tanto, las células endoteliales óseas son factores reguladores clave en la patogénesis de la ONCF. Los glucocorticoides regulan la movilización, la angiogénesis, la apoptosis y la trombosis de las células endoteliales óseas a través de varias vías de señalización o citoquinas como PI3K/Akt, GSK-3β/Fyn, Bcl-2 y Bax. Tomado de: Huang C, Wen Z, Niu J, Lin S, Wang W. Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head: Novel Insight Into the Roles of Bone Endothelial Cells in Pathogenesis and Treatment. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:777697. (150).

Se han investigado genes potencialmente involucrados en la osteonecrosis en la ONCFIE, cuya expresión diferencial podría influir en la aparición o progresión de la enfermedad. Lin et al. identificaron en ratas 59 genes con regulación al alza, vinculados sobre todo a la inmunidad, como *Fcer1a* e *Ii7r*, y 156 genes con regulación a la baja, principalmente asociados con la función muscular, como *Tnni2*, *Myipf* y *My11* (155). Huang et al. (2017) revelaron que cinco genes regulados al alza, incluyendo *Pth1r* (receptor 1 de la hormona paratiroidea), *Vdr* (receptor de la vitamina D), *Col2a1* (colágeno tipo II α1), *Pcsk6* (proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 6) y *Zfp354c* (proteína zinc finger 354C), estaban asociados con la ONCFIE (155).

1.3.2.6 Consumo excesivo de alcohol

Al igual que sucede con los corticosteroides, el papel del abuso del alcohol en el desarrollo de la ONCF merece un apartado propio. El consumo excesivo de alcohol se ha asociado a la ONCF en un 10-40 % de los casos. En el trabajo clásico de Matsuo et al. se observó que los individuos que consumían más de 400 ml de alcohol a la semana tenían un riesgo 9,8 veces mayor de desarrollar ONCF que los que no consumían nada. Este riesgo se multiplicaba por 17,9 en los individuos que consumían más de 1.000 ml de alcohol a la semana (156). El alcohol desencadena mecanismos fisiopatológicos similares a los propuestos para la osteonecrosis inducida por corticosteroides, como el deterioro de la capacidad de diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales óseas, el aumento en la apoptosis y la acumulación desordenada de adipocitos en la grasa subcondral (157). Se sabe que el alcohol altera la vía de

señalización Wnt/ β -catenina, clave en la diferenciación de los osteoblastos y la síntesis de la matriz ósea. Además, mediante efectos indirectos como la malnutrición, la reducción en los niveles de la vitamina D, hormonas sexuales o IGF-1, el alcohol condiciona negativamente la homeostasis ósea (Figura 17)(158).

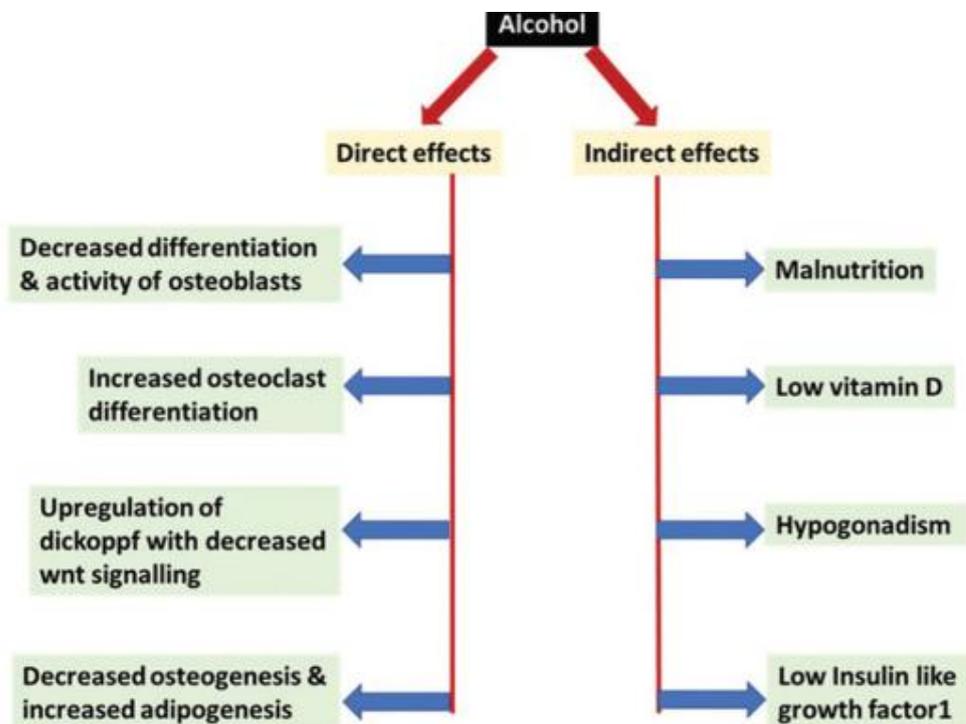


Figura 17 . Efectos directos e indirectos del alcohol en la fisiología ósea. La reducción en la actividad y diferenciación de los OBLs, el aumento en la diferenciación hacia osteoclastos, la sobrerregulación de dickkopf y la reducción en la vía Wnt, y la alteración del balance en la diferenciación adipogénica-osteogénica son algunos de los efectos negativos que el alcohol ejerce sobre el hueso. Además, mediante efectos indirectos como la malnutrición, la reducción en los niveles de la vitamina D, hormonas sexuales o IGF-1, el alcohol condiciona negativamente la homeostasis ósea. Tomado de: Johnson JT, Hussain MA, Cherian KE, Kapoor N, Paul TV. Chronic Alcohol Consumption and its Impact on Bone and Metabolic Health - A Narrative Review. *Indian J Endocrinol Metab.* 2022 May-Jun;26(3):206-212.(158).

1.3.2.7 Inflamación y autoinmunidad

La asociación entre conectivopatías y ONCF es bien conocida. Más allá de los tratamientos o condiciones concomitantes en estas enfermedades, la inflamación crónica parece desempeñar un papel clave en el desarrollo de osteonecrosis en estos pacientes. El sexo masculino, el lupus eritematoso sistémico, el alcoholismo, una dosis media diaria de corticosteroides > 7,5 mg y una dosis total acumulada de corticosteroides de 0 a 5 g se asocian de forma independiente con un mayor riesgo de ONCF en personas con procesos inflamatorios crónicos(159).

La reparación del tejido óseo depende de la eliminación satisfactoria de los estímulos nocivos y de la regulación adecuada de la inflamación. Una respuesta inflamatoria incontrolada, ya sea de forma excesiva o insuficiente, es perjudicial para la reparación ósea. En caso de inflamación excesiva, se produce una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS), y se activan proteasas que dañan los tejidos. Los

niveles persistentemente elevados de inflamación inhiben una respuesta osteogénica normal. En la fase inicial de la lesión ósea, la señalización transitoria por TNF- α e IL-6 es necesaria para el reclutamiento de los progenitores de osteoblastos que dirigirán la regeneración ósea, sin embargo, si los niveles elevados de TNF- α e IL-6 persisten, éstos inhiben la osteogénesis y dañan aún más el tejido óseo (Figura 18). La inflamación excesiva también estimula la diferenciación y activación de los osteoclastos, lo que provoca la llamada osteólisis inflamatoria.

Los DAMPs, o Patrones Moleculares Asociados al Daño (del inglés, "Damage-Associated Molecular Patterns"), son moléculas liberadas por células dañadas que no necesariamente están infectadas por patógenos. Actúan como señales que el sistema inmunitario puede reconocer y a las que puede responder. Los DAMPs pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, o incluso componentes celulares como el ATP o el ácido úrico, que, cuando se encuentran fuera de la célula debido a daño o estrés celular, pueden activar respuestas inmunitarias y promover la inflamación. Cuando se produce una respuesta inflamatoria insuficiente a la lesión ósea, los restos de células muertas locales y los restos óseos no se eliminan por completo, lo que permite que los DAMPs persistan en el microambiente, ejerciendo un efecto negativo sobre la regeneración.

En conclusión, una reacción inflamatoria excesiva o insuficiente acaba traducándose en una inflamación crónica, que actúa como puente entre la lesión ósea y la ONCF(160).

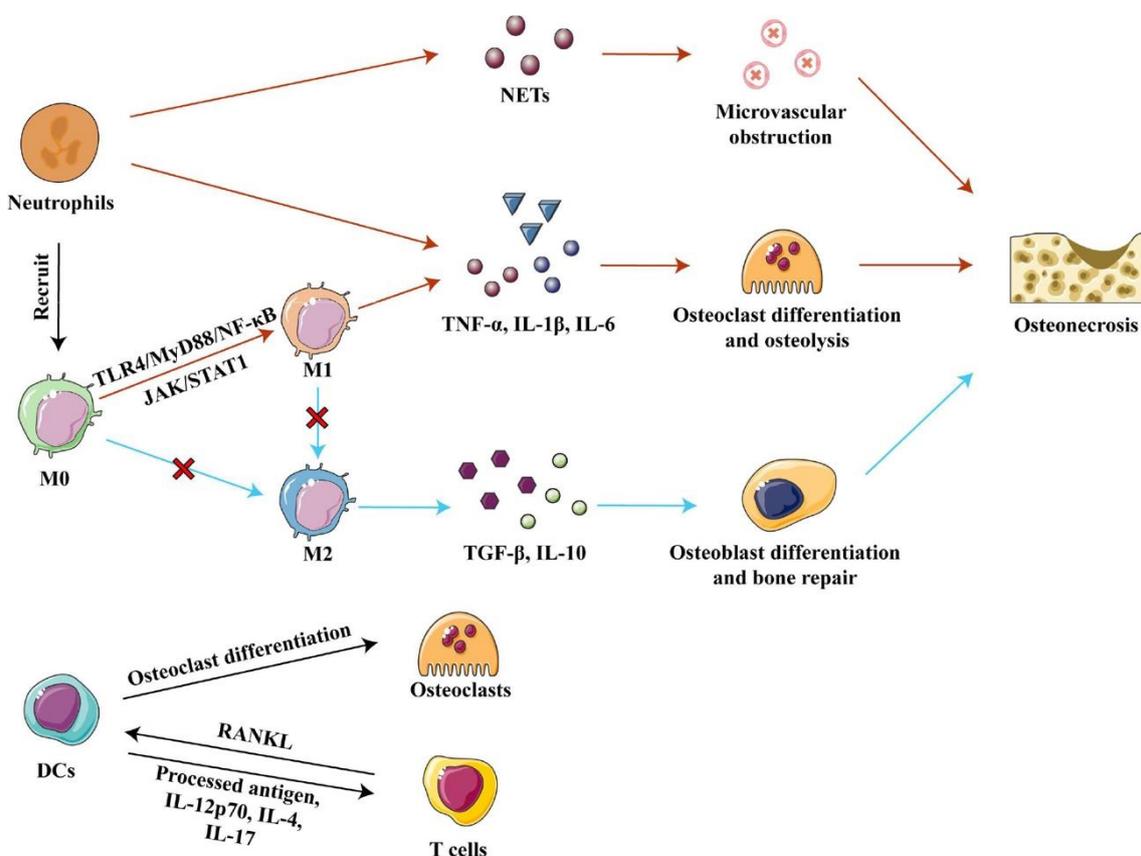


Figura 18. Células de la inmunidad innata en la osteonecrosis. Los neutrófilos provocan la obstrucción microvascular y la osteólisis mediante la secreción, respectivamente, de NET y

*factores proinflamatorios, lo que da lugar a la osteonecrosis de la cabeza femoral. La activación de las vías TLR4/MyD88/NF- κ B y JAK/STAT1 polariza a los macrófagos hacia el fenotipo M1, secretando factores inflamatorios TNF- α , IL-1 β e IL-6 que favorecen la diferenciación osteoclástica y la osteólisis. En la osteonecrosis, la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2 está bloqueada, lo que dificulta aún más la reparación ósea. Las CD pueden diferenciarse en osteoclastos y participar en la remodelación ósea bajo el estímulo del RANKL secretado por las células T. Las CD presentan antígenos procesados y secretan factores inflamatorios que afectan a la diferenciación de las células T. Tomada de: Zheng J, Yao Z, Xue L, Wang D and Tan Z (2022) The role of immune cells in modulating chronic inflammation and osteonecrosis. *Front. Immunol.* 13:1064245.(160).*

1.3.2.8 Otras formas de ONCF no traumática

Analizados los mecanismos fisiopatológicos mejor caracterizados en la ONCF, procedemos ahora a realizar un repaso breve de aquellas formas de la enfermedad que, por su relevancia clínica, su trascendencia histórica o su perspectiva futura, merecen al menos ser mencionadas en este apartado, como son las enfermedades de Caisson y Gaucher, la ONCF en el VIH o las formas de la enfermedad de posible causa genética-hereditaria.

La osteonecrosis disbárica, o enfermedad de Caisson, aparece típicamente en buceadores que sufren cambios bruscos de presión, lo que favorece los embolismos gaseosos intravasculares, que pueden ocluir la circulación menor. La prevalencia de esta enfermedad es altamente variable, siendo mayor en Hawái, Corea, Japón o Turquía. Se han identificado como factores predictores del cuadro una profundidad de buceo mayor de 35 metros, edad superior a 40 años, índice de masa corporal superior a 25,5 kg/m², tiempo de buceo mayor de 40 minutos o retraso en el tratamiento hiperbárico por encima de las seis horas. Hoy en día, debido a las medidas de seguridad adoptadas, la osteonecrosis disbárica es anecdótica (161).

En la enfermedad de Gaucher, el déficit de betaglucocerebrosidasa conlleva una acumulación de glucocerebrósidos en los lisosomas de los macrófagos, que pasan a llamarse entonces células de Gaucher. La acumulación de estas células en la medula ósea conlleva un aumento de presión que compromete la circulación e incluso provoca la isquemia crítica que desencadena la osteonecrosis. La presencia de anemia y la esplenectomía se han reportado como factores de riesgo de ONCF en esta enfermedad. Se ha encontrado una incidencia de ONCF en estos pacientes del 46%(162).

Múltiples estudios muestran una incidencia creciente de ONCF en pacientes con VIH, con un riesgo casi tres veces superior al de la población general. Algunos trabajos han encontrado también una asociación entre la terapia antirretroviral de alta actividad y el desarrollo de osteonecrosis. La asociación con el alcohol, la hiperlipidemia o los recuentos nadir bajos de CD4 se han reportado como factores de riesgo en estos pacientes (163).

Aunque se han encontrado variantes familiares de osteonecrosis y algunos genes asociados, no se ha conseguido identificar un único gen responsable. Un gen candidato a este puesto podría ser una mutación en el colágeno de tipo II, aunque no se ha conseguido establecer una causalidad definitiva. Se han encontrado niveles elevados de OPG y una expresión disminuida del RANK/RANK-L en las regiones necróticas en comparación con el hueso sano, lo que podría sugerir un posible papel de los genes reguladores de los osteoclastos. Las mutaciones del factor V Leiden y las mutaciones de la protrombina se han asociado a pacientes con osteonecrosis en

múltiples estudios, lo que sugiere un posible papel de las alteraciones de la coagulación. Los estudios de asociación de todo el genoma de poblaciones seleccionadas han identificado varios loci de interés, incluidos grupos de variantes cerca de genes receptores de glutamato en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, osteonecrosis inducida por corticosteroides y varios loci de significado desconocido, que pueden estar relacionados con las vías de coagulación, el metabolismo de los lípidos o el consumo de alcohol (164).

1.4 Alteraciones celulares en la ONCF

Habiéndose analizado previamente el funcionamiento normal de las células que participan en la homeostasis ósea, nos detendremos ahora en los cambios celulares conocidos hasta el momento a nivel de CMMs, OBLs y OSTs en la ONCF.

1.4.1 Alteraciones de las CMMs en la ONCF

Las CMMs de la MO son células presentes en el tejido óseo sin potencial hematopoyético pero con otros múltiples potenciales de diferenciación y capacidad para secretar factores tróficos. Existe evidencia de que estas CMMs desempeñan un papel vital en la reparación de la osteonecrosis, ya que invaden la zona necrótica, se diferencian y forman hueso nuevo. La patogénesis de la ONCF está estrechamente asociada a una disminución de la actividad y el número de las CMMs, así como una alteración en su capacidad de diferenciación(165).

Wang *et al.*, evidenciaron una reducción en la capacidad replicativa de las CMMs en la ONCFIE(166), hallazgo no evaluado hasta el momento en la ONCF idiopática.

Lee *et al.* encontraron que la capacidad de diferenciación osteogénica de las CMMs de los pacientes con ONCF, tanto inducida por alcohol como idiopática, era significativamente menor que en pacientes con artrosis de cadera (AC). Observó además que la capacidad de diferenciación adipogénica de las CMMs no se modificó significativamente en los pacientes con enfermedad inducida por el alcohol, idiopática y ONCFIE en comparación con los pacientes con AC(167). Por el contrario, sí se ha reportado en varias ocasiones un aumento en la diferenciación adipogénica de las CMMs en la ONCFIE, con evidencia de que la vía de PPAR γ está involucrada en este proceso(168)

Trabajos como el de Houdek *et al.* o Weinstein *et al.* también han encontrado una reducción en la capacidad de diferenciación osteogénica de las CMMs de los pacientes con ONCFIE frente a controles(152, 169). Dicha disminución en la diferenciación osteogénica se ha comprobado además en modelo animal de conejo de ONCFIE(170).

1.4.2 Alteraciones en células de estirpe ósea en la ONCF

Además de las CMMs, las células óseas maduras presentan alteraciones descritas en la ONCF, tanto inducida por corticoesteroides como idiopática. Tanto la disminución en la replicación como el aumento en la apoptosis de estas células contribuyen a la reducción en el pool celular óseo, ya disminuido por la necrosis.

El estudio de Gangji *et al.* reveló que la capacidad replicativa *in vitro* de OBLs obtenidos de la zona intertrocanterica en la ONCF estaba significativamente reducida en comparación con los pacientes con AC. Esta anomalía se limitó a la zona intertrocanterica, sin observarse en la cresta ilíaca. Sin embargo, el fenotipo de los

osteoblastos no se modificó. La disminución de la capacidad proliferativa se observó no sólo en la ONCFIE, sino también en la ONCF debida a otras causas(171).

Calder et *al.* demostraron que el metabolismo del óxido nítrico se altera en los osteoblastos y osteocitos durante el desarrollo de la ONCF no traumática, con un aumento de la tasa de apoptosis de las células óseas(117). El aumento de la apoptosis de OBLs y OCTs en la ONCFIE también ha sido reportado por Weistein et *al.*(169).

1.5 Evaluación médica y diagnóstico en la ONCF

Los pacientes pueden ser asintomáticos al principio de la enfermedad. Sin embargo, cuando aparecen los síntomas, generalmente se trata de dolor de cadera que puede irradiarse a la ingle o al muslo. El dolor suele agravarse con actividades como caminar y subir escaleras, y se alivia con el reposo. A menudo, el dolor persiste incluso en ausencia de movimiento. Algunos ejemplos de hallazgos de la exploración física indicativos de osteonecrosis de la cabeza femoral son la restricción de la amplitud de movimiento, el dolor a la abducción y la rotación interna, y la sensibilidad a la palpación de la región de la cadera(172).

En la ONCF, la identificación precoz puede influir significativamente en la evolución del paciente. El diagnóstico se realiza combinando la exploración y anamnesis clínicas con el diagnóstico por imagen. El diagnóstico por imagen puede incluir radiografías, tomografía axial computarizada (TAC), gammagrafía ósea y resonancia magnética (RM). El uso de imágenes en el contexto de los síntomas del paciente puede ayudar además a guiar el tratamiento adecuado. Hoy en día, la radiografía simple de cadera constituye la prueba complementaria básica en el diagnóstico de esta patología, siendo la RM la prueba de elección por su mayor sensibilidad y especificidad. Una vez realizadas las pruebas de imagen, la ONCF puede ser diagnosticada y estadificada. Estos aspectos se abordarán con mayor detalle en el siguiente apartado. El diagnóstico de certeza de la ONCF es el estudio histológico de la cabeza femoral, no realizado en nuestro medio de forma rutinaria. El análisis anatomopatológico se lleva a cabo en el espécimen obtenido tras las artroplastias de cadera, no estando indicada la toma de biopsias si se sospecha esta enfermedad(4). Sin embargo, si se realiza una biopsia, los hallazgos histológicos característicos serán necrosis trabecular (más del 50% de lagunas osteocíticas vacías) y médula hematopoyética necrótica sin evidencia específica de inflamación, células tumorales o sepsis. Del mismo modo, los estudios angiográficos no se realizan de forma rutinaria, aunque proporcionan una buena visualización de la vasculatura y pueden contribuir a la investigación y comprensión de la patología de la enfermedad(173).

Debe realizarse una analítica para ayudar a descartar otras causas de dolor de cadera, así como para evaluar factores comórbidos en pacientes con sospecha de osteonecrosis. Puede ser necesario analizar el hemograma completo, el perfil lipídico, la velocidad de sedimentación globular (VSG), la proteína C reactiva, el factor reumatoide (FR), los anticuerpos antinucleares (ANA), el anticuerpo antipéptido cíclico citrulinado (anti-PCC) y la electroforesis de hemoglobina. Los ANA y/o FR elevados indicarían un proceso autoinmune activo, pero son inespecíficos. Tanto la VSG como la proteína C reactiva están elevadas en los procesos inflamatorios, pero también son inespecíficas. Los anticuerpos anti-PCC elevados son específicos de la artritis reumatoide, mientras que en la electroforesis de la hemoglobina podría descartar una anemia falciforme. Un hemograma que muestre anemia normocítica o microcítica con

un recuento elevado de reticulocitos también sería compatible con el diagnóstico de anemia falciforme. La artritis reumatoide y la drepanocitosis son dos afecciones que pueden precipitar el desarrollo de ONCF y pueden causar dolor de cadera incluso sin osteonecrosis(173).

1.5.1 Diagnóstico por imagen

Debido a su disponibilidad, bajo riesgo, bajo coste y potencia, el diagnóstico de la ONCF se basa actualmente en la imagen médica, reservándose las pruebas de medicina nuclear para casos seleccionados. El estudio anatomopatológico, que proporciona el diagnóstico de certeza, no se emplea de rutina en la práctica clínica. A continuación, profundizaremos en cada una de las técnicas del diagnóstico por imagen en esta patología.

1.5.1.1 Radiografía simple

Para la valoración radiográfica, se toman radiografías anteroposteriores de la pelvis y de la cadera centradas en la cadera afectada, con las caderas internamente rotadas de 15 a 20 grados. La posición de pie es preferible porque permite evaluar la anchura real del espacio articular, que se reduce en caderas con osteoartritis al soportar peso, a diferencia de las caderas sin artritis. Posteriormente, se realiza una radiografía lateral en posición de decúbito supino, utilizando la proyección de pata de rana. Para una evaluación más precisa del espacio articular anterosuperior y del grado de cobertura anterior de la cabeza femoral, se emplea la proyección de falso perfil. Esta se adquiere con el paciente de pie, la pelvis rotada 65 grados y la pierna afectada paralela al detector de imágenes(174).

La radiografía convencional sigue siendo el pilar de la exploración diagnóstica inicial de los pacientes con dolor de cadera debido a su alta disponibilidad, seguridad y bajo coste. Sin embargo, en las últimas décadas se ha considerado que las radiografías simples son insensibles a los cambios tempranos de la ONCF y, por lo tanto, una herramienta diagnóstica subóptima, especialmente en las fases iniciales de esta afección. Paradójicamente, los signos radiológicos presentes en las radiografías suelen ser característicos. En primer lugar, puede identificarse una esclerosis ósea rodeada de osteopenia (Figura 19a). No obstante, los rasgos radiográficos típicos son las áreas parcheadas de lucencia y esclerosis (Figura 19b). El aspecto esclerótico es característico dentro del borde de la lesión, mostrando con frecuencia una morfología ondulada o "serpentina", más común en las lesiones metadiafisarias, y traduce la respuesta del hueso que las alberga cercando las zonas necróticas. Las radiografías convencionales también pueden revelar zonas tempranas de colapso articular en la ONCF, que afectan especialmente a la epífisis anterior y anterolateral de la cabeza femoral. El colapso articular suele comenzar en la confluencia del borde esclerótico serpenteante y la superficie articular, donde tiene lugar la máxima tensión mecánica. El hundimiento progresivo puede generar la arquetípica lucencia subcondral semilunar o "signo de la media luna", que traduce el colapso del hueso subcondral y la separación del cartílago suprayacente y del hueso subcondral adherido (Figura 19c). En consecuencia, suele producirse una fragmentación articular, un colapso progresivo de la cabeza femoral y una enfermedad articular degenerativa secundaria (Figura 19d). (175).

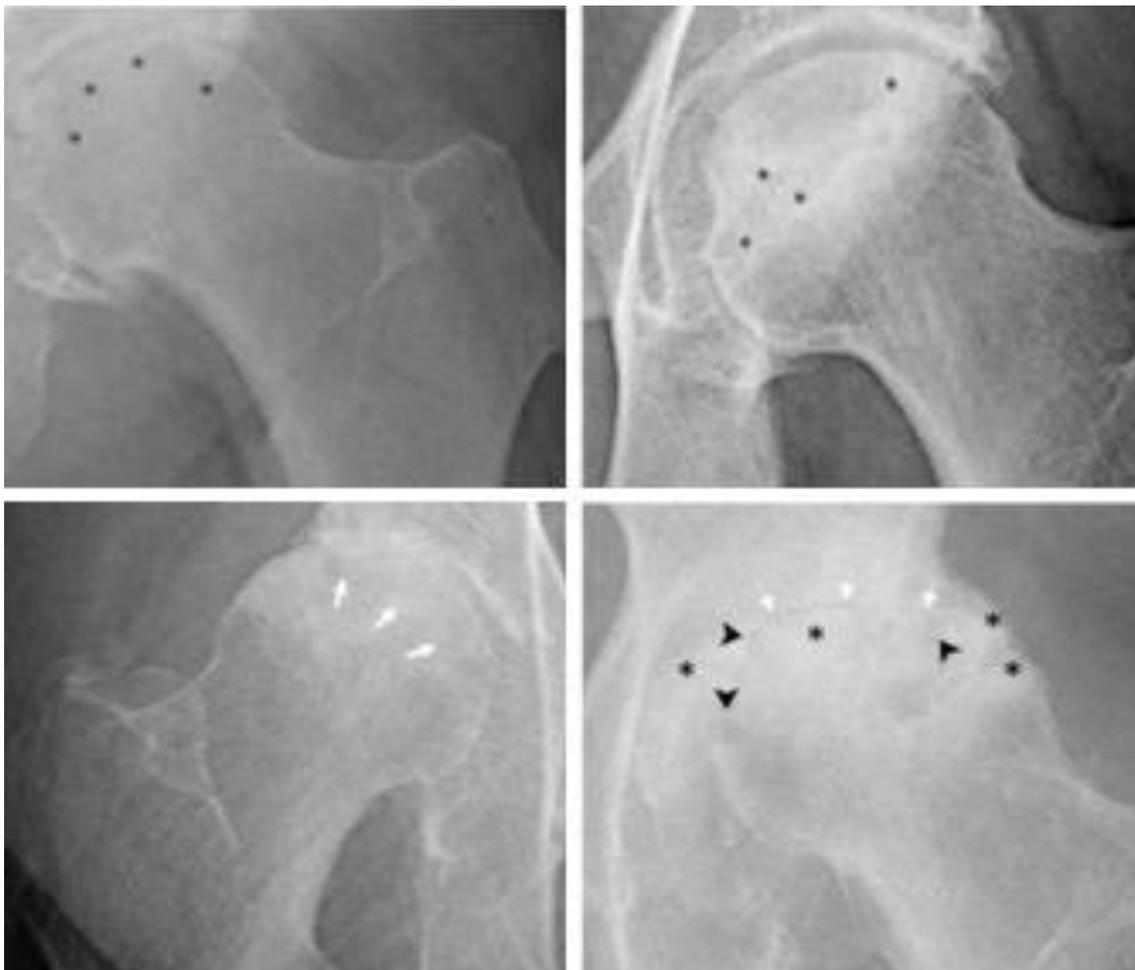


Figura 19. Radiografías AP. a) Cadera izquierda con la típica hipodensidad y borramiento de las trabéculas óseas de la cabeza femoral en las fases iniciales de la ONCF. La región de interés está marcada con asteriscos; b) Cadera izquierda mostrando la esclerosis parcheada característica de la cabeza femoral en los estadios iniciales de la ONCF. La región de interés está marcada con asteriscos. c) Cadera derecha con una característica línea hipodensa subcondral o signo de la media luna, con alteración de la esfericidad de la cabeza femoral y pérdida del espacio articular. La región de interés está marcada con flechas blancas. d) Cadera izquierda donde se observa la pérdida de la esfericidad de la cabeza femoral y enfermedad articular avanzada. El estrechamiento del espacio articular se indica con flechas blancas; las geodas se indican con puntas de flecha, y la esclerosis con asteriscos. Imágenes tomadas de Cardín-Pereda et al., *Diagnostic Reliability of Plain Radiography in Osteonecrosis of the Femoral Head: General Radiological Features Revised*, *Current Medical Imaging* 2024; 20. (175).

1.5.1.2 Resonancia magnética nuclear

La RM es la modalidad de elección en la ONCF, con una sensibilidad del 71-100% y una especificidad del 94-100%(176). Se han descrito, por ejemplo, la presencia de hallazgos radiológicos en RM de animales de experimentación con ONCF inducida al cabo de una semana de generarse las lesiones. Por el contrario, los casos de ONCF con RM normales son anecdóticos(23). Dos características de las imágenes de RM que aumentan el riesgo de desarrollo de ONCF son una cicatriz fisaria gruesa y la conversión temprana a médula ósea amarilla(177).

Dado que las lesiones suelen ser bilaterales, el examen debe incluir ambas caderas. El patrón de imagen de RM más común observado en la ONCF es un área de

médula ósea amarilla rodeada por un contorno de baja intensidad de señal en todas las secuencias. Este aspecto en imagen se corresponde con la patología subyacente asociada a una periferia de las zonas necróticas constituida por una zona de esclerosis, es el llamado *walling off* esclerótico (sclerotic rim). La intensidad de la señal de RM en la médula amarilla se mantiene porque los tejidos adiposos viables y desvitalizados tienen un aspecto intrínseco idéntico en las imágenes de RM(23).

En las imágenes de ponderación T1 se observan zonas de baja señal que representan edema, que pueden estar delimitadas por una línea hiperintensa que representa una zona hemorrágica. En las imágenes de ponderación T2, a veces es visible una segunda línea interna hiperintensa entre la médula normal y la isquémica (Figura 20); este signo es patognomónico de necrosis ósea y se conoce como "signo de la doble línea". Se observa en el límite entre el hueso viable y el no viable. Se aprecia mejor en las secuencias T2 y T2 con saturación grasa y, por tanto, consta de dos líneas serpenteantes: una línea interior de hiperseñal que representa el tejido de granulación de reparación y una línea exterior de hiposeñal que representa el hueso esclerótico adyacente. La línea externa es siempre continua, mientras que la interna puede ser discontinua o estar ausente. Este signo se ha descrito en el 80-85% de los casos. No debe confundirse con un fragmento osteocondral rodeado de líquido articular, que indica que el fragmento es potencialmente inestable(178).

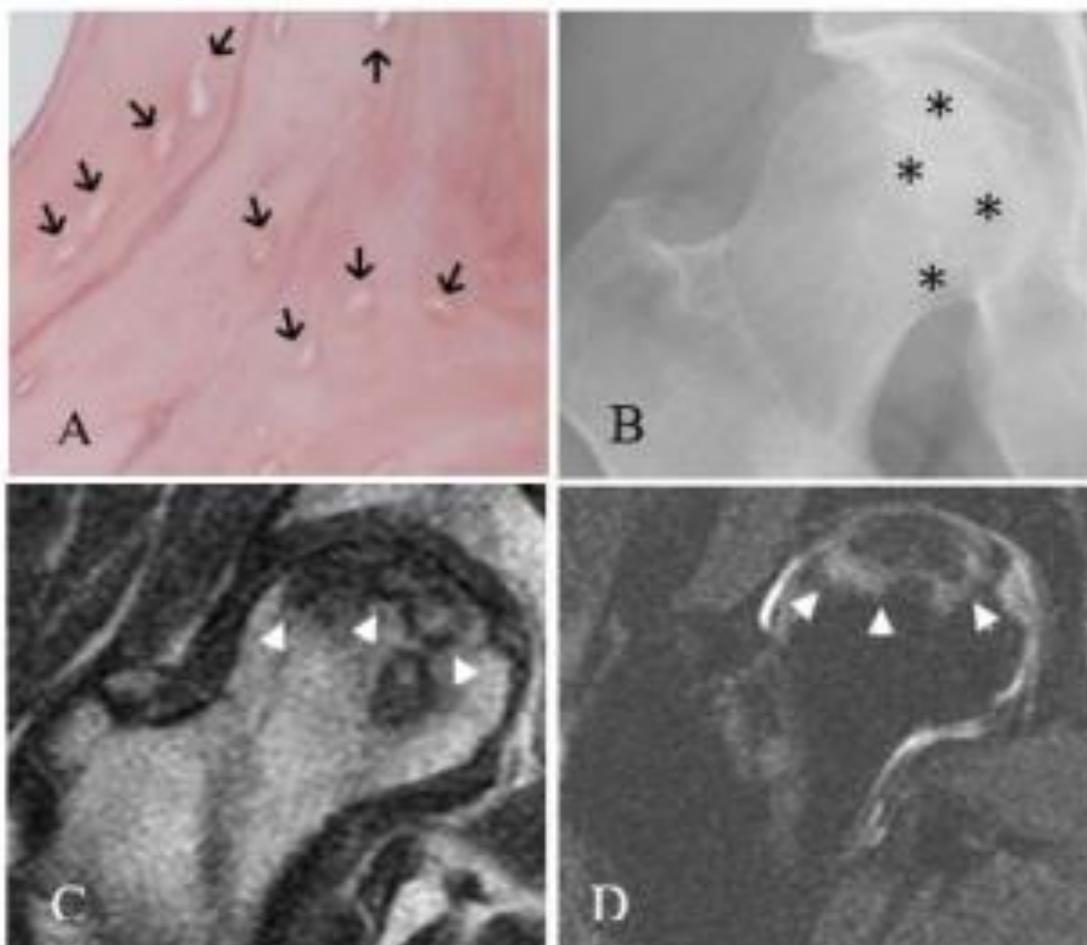


Figura 20. Hallazgos histológicos y radiológicos de la ONCF en el mismo paciente. A) Cortes teñidos con hematoxilina/eosina que muestran trabéculas parcialmente necróticas: el hueso

presenta lagunas osteocíticas vacías (flechas) (obj. 40x). B) Radiografía AP de cadera derecha que presenta alteraciones características de radiodensidad y trabeculación (asteriscos), con preservación de la esfericidad de la cabeza femoral. C) Vista coronal de RM de una imagen ponderada en T1 que muestra las típicas líneas serpiginosas de baja intensidad (flechas blancas). D) Corte coronal de RM de una imagen ponderada en T2 que muestra las típicas líneas serpiginosas de alta intensidad (flechas blancas). Tomada de: Cardín-Pereda Adrian, García-Sánchez Daniel, Terán-Villagrà Nuria, Alfonso-Fernández Ana, Fakkas Michel, Pérez-del Barrio Amaia, Marín-Díez Elena, Fernández-Lobo Víctor, Sanz-Bellón Pablo, Montes-Figueroa Enrique, Lamprecht Yasmina and Pérez-Campo María Flor, Diagnostic Reliability of Plain Radiography in Osteonecrosis of the Femoral Head: General Radiological Features Revised, Current Medical Imaging 2024; 20. (175).

El uso de un medio de contraste no suele ser necesario, aunque algunos estudios en animales han demostrado un aumento de la sensibilidad para detectar la osteonecrosis de la cabeza femoral, ya que el tejido necrótico no aumenta tras la inyección(23). También se han propuesto secuencias de difusión, mapeo T2 o mapeo del coeficiente de difusión aparente (CDA) para evaluar la osteonecrosis. Por ejemplo, los valores de CDA en las zonas necróticas son significativamente más altos que en la médula ósea normal, pero no existen diferencias significativas entre las lesiones necróticas en diferentes estadios; por lo tanto, el mapeo de CDA tiene un valor limitado en esta patología(179).

Se hace imprescindible en este apartado analizar brevemente el concepto de edema de médula ósea (EMO), un tema de interés creciente en la literatura, con relevancia clínica y trascendencia en el diagnóstico por imagen de la ONCF. Desde el punto de vista fisiopatológico, el EMO se ha relacionado con la lesión capilar, independientemente de la causa, a nivel de la médula ósea. El daño a la microcirculación ósea conduce a un aumento de la permeabilidad capilar, con aumento de la presión intraósea. En las imágenes de RM, el EMO representa un hallazgo diagnóstico frecuente en pacientes con dolor de cadera. Se trata de un término descriptivo, que define un área de médula ósea de baja intensidad de señal en secuencias ponderadas en T1, de alta intensidad de señal en secuencias sensibles a los fluidos, y que suele carecer de márgenes nítidos. Dada su naturaleza inespecífica, para que el EMO pueda atribuirse a un trastorno clínico específico es necesaria su correlación con la historia clínica, la exploración física y los datos de laboratorio. La presencia de EMO en la RM nos obliga a descartar una osteoporosis transitoria de la cadera, una osteoporosis migratoria regional, lesiones por estrés, patología infecciosa-inflamatoria y, por supuesto, una ONCF (Figura 21). La asociación del EMO con la ONCF ha sido objeto de controversia durante mucho tiempo en la literatura. Inicialmente, se sugirió que el EMO representa la manifestación más temprana de la ONCF y que podría evolucionar hacia patrones típicos de la enfermedad. En publicaciones esporádicas se ha sugerido que el EMO reversible asociado a síndromes agudos de EMO puede evolucionar a ONCF. La distinción entre el EMO irreversible relacionado con ONCF, y el EMO reversible (con frecuencia autolimitado) es de suma importancia en términos de tratamiento y pronóstico(180). Actualmente, está ampliamente aceptado que el EMO indica un estadio avanzado de la ONCF, es esperable durante la evolución de una lesión conocida y se considera un signo de mal pronóstico. No puede encontrarse antes de la aparición del signo de la doble línea, que representa el cambio más precoz y patognomónico de la ONCF, mientras que su aparición se correlaciona con la presencia de fractura subcondral o colapso articular, el volumen de la zona necrótica y el empeoramiento del dolor(181).

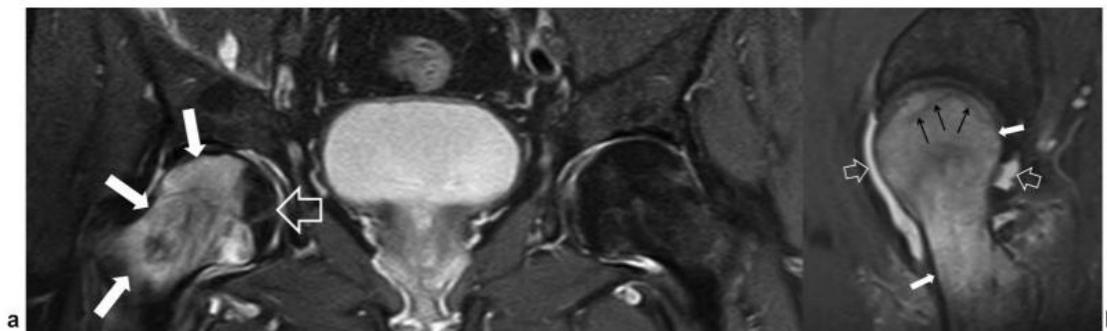


Figura 21. Edema de médula ósea. (a) Imagen coronal de RM secuencia short tau inversion recovery que muestra edema de médula ósea (flechas blancas) en un varón de 59 años 3 semanas después del inicio de los síntomas. El signo de "sparing" (preservación) se muestra en la cabeza femoral medial (flecha abierta). (b) Imagen sagital de RM secuencia proton density con supresión grasa en un varón de 56 años 4 semanas después del inicio de los síntomas que muestra un extenso edema de médula ósea (flechas), una fractura subarticular microtrabecular por insuficiencia (flechas finas negras) y derrame articular (flechas abiertas). Tomado de: Vassalou EE, Spanakis K, Tsifountoudis IP, Karantanas AH. MR Imaging of the Hip: An Update on Bone Marrow Edema. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2019;23(3):276-88.(180).

En relación con las limitaciones de la RM, muchos dispositivos como marcapasos cardíacos o clips intracraneales impiden su realización. Tampoco se puede realizar esta técnica en pacientes con claustrofobia. En los niños, una ligera oblicuidad pélvica puede hacer que el cartílago de crecimiento normal, de apariencia oscura, aparezca en el mismo corte axial que la epífisis contralateral de aspecto brillante. En tales casos, la placa de crecimiento normal puede parecer anormal en la RM. Los niños pueden necesitar sedación debido a los largos tiempos de obtención de imágenes que requiere la RM. Puede ser difícil detectar la necrosis avascular después de una intervención quirúrgica para reparar una fractura de cadera debido a la presencia de elementos ortopédicos, que distorsionan mucho la imagen.

En relación al umbral de detección de la RM en la necrosis avascular, debe tenerse en cuenta que las células de la MO son más resistentes a la isquemia que las células hematopoyéticas o los osteocitos. De este modo, dado que las imágenes de RM reflejan los cambios en la intensidad de la señal de la grasa de la médula, los hallazgos de RM de necrosis avascular pueden no verse hasta 5 días después del evento isquémico, cuando las células grasas de la médula han muerto. En este contexto, es necesaria la RM con contraste(182).

1.5.1.3 Tomografía axial computarizada

La alta resolución espacial y de contraste de la TAC permiten analizar las características morfológicas de la cadera con gran precisión. La tomografía es el método más sensible para la detección de fracturas subcondrales de la cabeza femoral (Figura 22)(183), y también es una herramienta importante para la planificación quirúrgica de una artroplastia, así como para la valoración de la extensión de las lesiones. Sin embargo, la tomografía computarizada no se recomienda para la detección precoz de la osteonecrosis debido a su menor sensibilidad en comparación con la gammagrafía ósea o la resonancia magnética(178). El documento de consenso de la clasificación ARCO

revisada de 2019 para la ONCF no exige la TAC para el diagnóstico y la estadificación de la ONCF. No obstante, hay algunos autores que creen que la TAC es necesaria para una estadificación precisa(184).

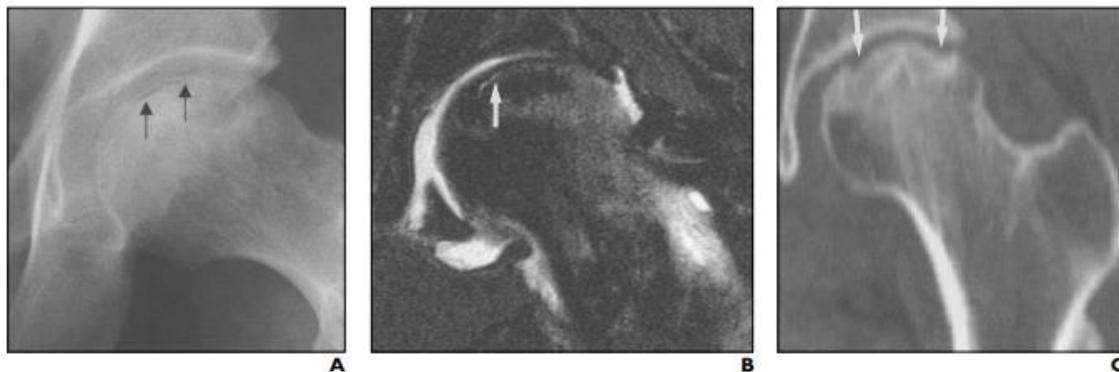


Figura 22. Paciente con osteonecrosis de cadera izquierda. A) Radiografía lateral que muestra el signo de la semiluna (flechas). B) RM ponderada en T2 con saturación grasa que muestra una línea semilunar de alta intensidad de señal (flecha). C) La TAC coronal muestra fractura subcondral con colapso de la superficie articular (flechas blancas). Tomada de: Stevens K, Tao C, Lee SU, Salem N, Vandevenne J, Cheng C, Neumann G, Valentin-Opran A, Lang P. Subchondral fractures in osteonecrosis of the femoral head: comparison of radiography, CT, and MR imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 2003 Feb;180(2):363-8. (183).

Aunque la TAC puede detectar alteraciones sutiles de la densidad ósea cuando la radiografía simple es normal, la RM y la gammagrafía SPECT son mucho más sensibles para evaluar las primeras manifestaciones de la enfermedad, siendo excelente para detectar el colapso de la cabeza femoral, la enfermedad articular degenerativa temprana y la presencia de cuerpos articulares sueltos. La TAC puede mejorar la precisión de la estadificación radiográfica utilizando cortes de grosor fino e incorporando la reconstrucción multiplanar (23).

1.5.1.4 Medicina nuclear en el diagnóstico de la ONCF

En el campo del diagnóstico por imagen mediante medicina nuclear en la ONCF, las modalidades existentes son la gammagrafía ósea planar, la tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT, de las siglas en inglés "Single Photon Emission Computed Tomography"), la combinación SPECT/TAC y la tomografía por emisión de positrones (PET, de las siglas en inglés "Positron Emission Tomography") asociada al TAC (PET/TAC) (Figura 23).

En los últimos tiempos, la RM ha sustituido en gran medida a la gammagrafía ósea con radionucleidos debido a su mayor sensibilidad (hasta el 100%, frente al 90% de la gammagrafía ósea con radionucleidos). La gammagrafía ósea sigue siendo una alternativa válida en caso de fractura del cuello femoral con un dispositivo de fijación metálico. Además, también es útil cuando se sospecha la afectación de múltiples localizaciones en pacientes con factores de riesgo como la anemia falciforme(185).

El empleo del SPECT puede mejorar la precisión de la gammagrafía con radionucleidos en el diagnóstico de la osteonecrosis. Si se va a realizar una gammagrafía ósea, el método sugerido para llevar a cabo el estudio es utilizar colimación esteno-peica y SPECT con corrección de la dispersión y algoritmos de

reconstrucción iterativa. Más recientemente, se ha defendido la SPECT/TC, en comparación con la SPECT sola, para el diagnóstico de la ONCF(185). En la población pediátrica, el uso de imágenes nucleares es ahora menos común, debido a la preocupación por la exposición a la radiación(186).

En relación con la gammagrafía tipo PET, la PET con fluoruro de F^{18} presenta varias ventajas con respecto a la gammagrafía ósea con Tecnecio-99 metaestable (Tc-99m). El fluoruro de F^{18} tiene una extracción de primer paso en el hueso de aproximadamente el 100%, lo que permite estimar el flujo sanguíneo óseo. Además, su captación ósea es dos veces superior a la del Tc-99m, no se une a las proteínas, lo que acelera su eliminación de la sangre y mejora la relación blanco/fondo. Debe añadirse que las imágenes PET/TAC tienen mayor resolución que las SPECT/TC, lo que permite apreciar mejor la región fotopénica característica en PET/TC. Por lo tanto, la gammagrafía ósea con fluoruro de F^{18} tiene una alta sensibilidad en comparación con la gammagrafía ósea con Tc-99m. La cuantificación es otra ventaja técnica de las imágenes PET/TAC. Las características adicionales de la TAC dan lugar teóricamente a una alta especificidad de la PET/TAC con fluoruro de F^{18} en la ONCF(185).



Figura 23. Imágenes de medicina nuclear en la ONCF. SPECT coronal (A), TAC coronal (B) y las imágenes fusionadas de SPECT/TAC mostrando defectos fotopénicos bilaterales a nivel de la cabeza femoral en un paciente con ONCF. Tomada de: Agrawal K, Tripathy SK, Sen RK, Santhosh S, Bhattacharya A. Nuclear medicine imaging in osteonecrosis of hip: Old and current concepts. *World J Orthop.* 2017 Oct 18;8(10):747-753.(185).

1.5.1.5 Estadificación por imagen de la ONCF

Los sistemas de clasificación de la ONCF son excelentes herramientas basadas en datos de imagen que se utilizan ampliamente para estratificar la gravedad y el pronóstico, así como para guiar la estrategia de tratamiento. Existen varios sistemas de estadificación que se han desarrollado para la evaluación de la ONCF en adultos. Entre ellos se incluyen las clasificaciones de Ficat y Arlet, Marcus, Steinberg, Association Research Circulation Osseous (ARCO), el sistema de clasificación del China-Japan Friendship Hospital (CJFH) y el del Japanese Investigation Committee classification (JIC).

El sistema de estadificación de Ficat y Arlet fue la primera clasificación utilizada para la ONCF, descrita en los años 60. A pesar de crearse antes del empleo de la RM es el sistema de estadificación más reportado en la literatura, y el más empleado en la práctica clínica. También se ha modificado en múltiples ocasiones. Sin embargo, la versión de cuatro estadios ha sido la más ampliamente adoptada. El estadio I se define

por el aspecto radiográfico normal de la cabeza femoral. En este estadio, puede existir un aumento de la captación del trazador en la gammagrafía ósea o un aumento de la señal de la médula ósea con edema en la RM. El estadio II se define por la presencia de esclerosis difusa y quistes que representan la reparación ósea y un estadio previo al colapso. El estadio III se caracteriza por fracturas subcondrales que a veces pueden imitar una media luna cerca de la corteza articular; de ahí que se conozca como el signo de la media luna. El colapso es evidente y en este estadio puede empezar a tener lugar un aplanamiento de la cabeza. El estadio IV se caracteriza por un mayor colapso, aplanamiento y destrucción de la cabeza femoral. Comienzan a producirse cambios osteoartroticos secundarios, como estrechamiento del espacio articular, formación de osteofitos y quistes óseos subcondrales. En 1985 se introdujo una modificación de este sistema para incluir el estadio 0 y un estadio de transición (Tabla 4). El Ficat y Arlet es un sistema sencillo y fácil de utilizar. Sin embargo, ha sido criticado por no incorporar específicamente los hallazgos de la RM. Asimismo, existe controversia sobre si las caderas que muestran un signo de media luna sin aplanamiento condral deben agruparse con las que muestran un aplanamiento macroscópico de la cabeza femoral. Además, múltiples estudios han cuestionado la fiabilidad interobservador e intraobservador del sistema de clasificación(187).

Stage	Radiographic signs	Clinical features
0	findings	0 ("silent hip")
I	Inconspicuous findings or minor changes (slight patchy osteoporosis blurring of trabecular pattern, subtle loss of clarity)	+
II A	Diffuse/ocal radiological changes (osteoporosis, sclerosis, cysts)	+
II B	Subchondal fracture ("crescent sign") segmental flattening of femoral head ("out-of-round appearance")	+
III	Broken contour of femoral head, bone sequestrum, joint space normal	++
IV	Flattened contour of femoral head, decreased joint space, collapse of femoral head, acetabular osteoarthritic changes	+++

Tabla 4. Clasificación de Ficat y Arlet para la ONCF. Se basa actualmente en seis estadios, del cero al cuatro, con una subdivisión del segundo. Tomado de: Sultan AA, Mohamed N, Samuel LT, Chughtai M, Sodhi N, Krebs VE, et al. Classification systems of hip osteonecrosis: an updated review. *Int Orthop.* 2019;43(5):1089-95.(188).

En 1973, Marcus et al. clasificaron la ONCF en seis estadios según los hallazgos radiográficos de la cadera. Su principal característica es la sencillez, pero debido a las limitaciones de las técnicas de imagen en aquella época, las zonas y rangos de necrosis no podían evaluarse y estadificarse con precisión. Por lo tanto, esta clasificación ya no se utiliza. En 1977, Ficat et al. desarrollaron un sistema de clasificación para la ONCF, en el que se clasificaban cuatro estadios según los síntomas clínicos, la radiografía, la RM y la gammagrafía ósea isotópica. Aunque este sistema de clasificación es más detallado y preciso que el de Marcus, tampoco se han incluido las zonas y rangos de necrosis, que son bastante importantes para la selección de la evaluación de la progresión de la enfermedad y el tratamiento elegido(1).

En 1995, Steinberg propuso un nuevo sistema de clasificación. Este sistema es el primero que incorpora las medidas del tamaño de la lesión como parte de un sistema completo. Este sistema de clasificación proporciona un método de estadificación más

detallado, que resulta mucho más útil para la selección del tratamiento clínico y para mejorar el pronóstico (Tabla 5). Sin embargo, los métodos de evaluación de este sistema de clasificación son demasiado tediosos, no hay una buena reproducibilidad para la determinación del estadio III, y la distinción entre el estadio V y el estadio VI es imprecisa(189).

Stage	Criteria	Subdivision
0	Normal radiograph, bone scan, and MR images.	
I	Normal radiograph. Abnormal bone scan and/or MR images	A: Mild (< 15% of femoral head affected) B: Moderate (15 to 30% of femoral head affected) C: Severe (> 30% of femoral head affected)
II	Cystic and sclerotic changes in femoral head.	A: Mild (< 15% of femoral head affected) B: Moderate (15 to 30% of femoral head affected) C: Severe (> 30% of femoral head affected)
III	Subchondral collapse without flattening (crescent sign)	A: Mild (< 15% of articular surface) B: Moderate (15 to 30% of articular surface) C: Severe (> 30% of articular surface)
IV	Flattening of femoral head	A: Mild (< 15% of surface and < 2 mm of depression) B: Moderate (15 to 30% of surface and 2 to 4 mm of depression) C: Severe (> 30% of surface and > 4 mm of depression)
V	Joint narrowing or acetabular changes	A: Mild B: Moderate C: Severe
VI	Advanced degenerative changes	

Tabla 5. Sistema de estadificación de la ONCF propuesto por Steinberg. Consta de seis estadios, con una subdivisión de cuatro de ellos en "leve", "moderado" o "severo", en función de la extensión de la enfermedad. Adaptado de: Steinberg ME, Hayken GD, Steinberg DR. A quantitative system for staging avascular necrosis. *J Bone Joint Surg Br.* 1995;77(1):34-41.(189)

El sistema de clasificación de la Association Research Circulation Osseous (ARCO) es más detallado que el sistema de clasificación de Steinberg y tiene en cuenta las zonas necróticas y su extensión (Tabla 6). El sistema ARCO tiene su origen en la clasificación de Steinberg, y se han introducido varias modificaciones a lo largo de los años. Este sistema no proporciona un método para evaluar las lesiones prerradiográficas ni las lesiones en las que están implicadas la línea articular o el acetábulo. La localización de la lesión osteonecrótica se detecta y la información relativa se añade a cada estadio en el sistema ARCO como complemento, pero su valor específico es poco claro. El sistema de clasificación ARCO es más favorable para la orientación del tratamiento clínico y la evaluación de la evolución y el pronóstico de la ONCF. Sin embargo, su desventaja es que los criterios de evaluación de esta clasificación son demasiado detallados y complejos para su uso generalizado en la práctica clínica(188).

Stage	Findings	Techniques	Subclassification	Quantitation
0	None	Radiography. CT. scintigraphy. MR	No	No
1	Radiography and computed tomography normal At least ONE of the other techniques is positive	Scintigraphy. MR	Location of lesion Medial Central Lateral	Area of involvement (percentage) A: Minimal (<15%) B: Moderate (15 to 30%) C: Extensive Length of crescent A: 15% B: 15 to 30% C: 30% Surface collapse and dome depression A: < 15% and <2 mm B: 15 to 30% and 2 to 4 mm C: > 30% and > 4 mm
2	Sclerosis, osteolysis, focal osteoporosis	Radiography. CT. scintigraphy. MR	Same as stage 1	Same as stage 1
3	Crescent and/or flattening of articular surface	Radiography. CT	Same as stage 1	Same as stage 1
4	Osteoarthritis acetabular changes joint destruction	Radiography only	No	No

Tabla 6. Sistema de estadificación ARCO para la ONCF. Se proponen cinco estadios, con una subdivisión de tres de ellos en función de la extensión, la lesión crescent sign y el colapso articular-pérdida de la esfericidad. Adaptado de: Sultan AA, Mohamed N, Samuel LT, Chughtai M, Sodhi N, Krebs VE, et al. Classification systems of hip osteonecrosis: an updated review. *Int Orthop.* 2019;43(5):1089-95.(188).

En 2001, surge el sistema de estadificación *Japanese Investigation Committee* (JIC). La clasificación JIC, adoptada por el Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar japonés, utiliza imágenes de RM para clasificar la osteonecrosis en función de la localización de la lesión necrótica. El principio, exclusivo de este sistema de clasificación, es que la localización de la lesión necrótica en relación con la región acetabular que soporta el peso puede ser un factor importante que determine el pronóstico final(190). Esto es especialmente cierto si en las primeras fases de la enfermedad las lesiones son pequeñas. Independientemente del tamaño, la localización de la lesión se convierte en un factor pronóstico importante, ya que las lesiones situadas en una zona que soporta peso pueden evolucionar rápidamente hacia el colapso y, a la inversa, las situadas en una zona que no soporta peso pueden no evolucionar hacia el colapso hasta más tarde. Por lo tanto, el sistema de clasificación propone tres estadios (Figura 24). En el estadio A, las lesiones ocupan el tercio medial o menos de la porción que soporta el peso. En el estadio B, las lesiones ocupan dos tercios o menos de la porción medial que soporta el peso. En el estadio C, las lesiones ocupan más de los dos tercios mediales de la porción que soporta el peso. Este estadio tiene dos subcategorías; en el estadio C1, las lesiones no se extienden lateralmente, y en el estadio C2, las lesiones se extienden lateralmente hasta el borde acetabular. Una característica exclusiva del sistema de clasificación JIC es su mayor fiabilidad interobservador e intraobservador. Takashima et al. compararon las clasificaciones JIC con otros sistemas de clasificación y examinaron simultáneamente la fiabilidad interobservador e intraobservador. La fiabilidad interobservador del JIC demostró ser sustancial, con una fiabilidad superior a la de las clasificaciones de Steinberg y Kerboul. La fiabilidad

intraobservador también fue notablemente alta para la JIC. Los autores informaron de que ninguna de las caderas designadas como JIC tipo A se colapsó o requirió PTC, concluyendo que la clasificación JIC era más fiable y eficaz que otros sistemas de clasificación más comúnmente utilizados(191).

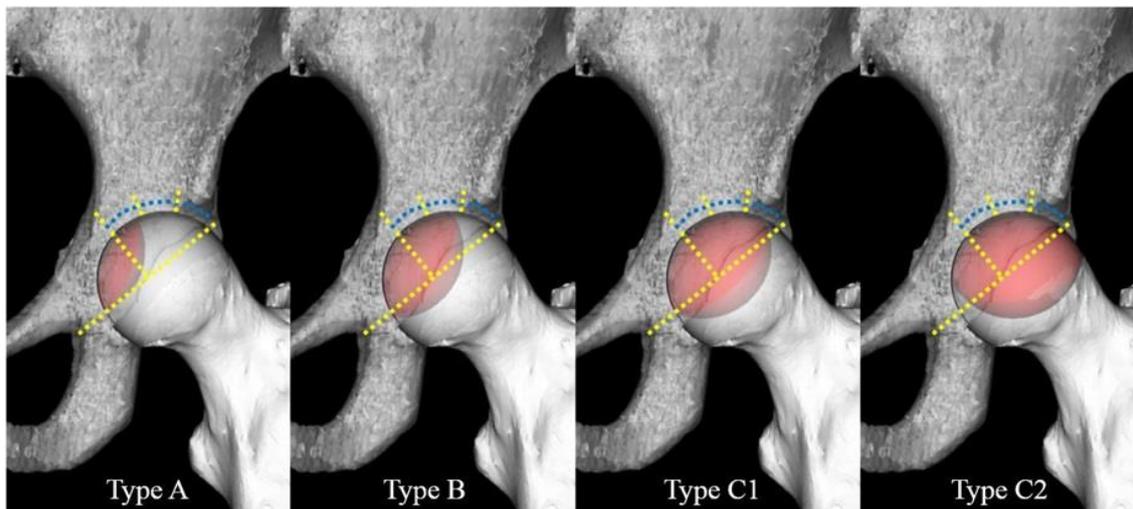


Figura 24. Sistema de estadificación de la ONCF de la JIC. Las lesiones de tipo A ocupan un tercio medial o menos de la porción de soporte de peso, las lesiones de tipo B ocupan dos tercios mediales o menos, las lesiones de tipo C1 y C2 ocupan ambas más de dos tercios mediales; sin embargo, mientras que las lesiones de tipo C2 se extienden lateralmente hasta el borde acetabular y las de tipo C1 no. La parte que soporta el peso (líneas de puntos azules) se define como la zona lateral a la línea media vertical de la línea que pasa por el borde acetabular y el fondo en forma de lágrima (líneas de puntos amarillos). Tomado de: Takashima K, Sakai T, Hamada H, Takao M, Sugano N. Which Classification System Is Most Useful for Classifying Osteonecrosis of the Femoral Head? Clin Orthop Relat Res. 2018 Jun;476(6):1240-1249.(191)

En 2013, el profesor Li Zirong propuso un nuevo sistema de clasificación basado en la estructura de tres pilares de la cabeza femoral: la clasificación del Hospital de la Amistad China-Japón (CJFH), también conocida como clasificación de Li. Según la sección media coronal en RM (estadios I y II) y TC (estadios II y III), la sección coronal de la cabeza femoral se dividió en tres pilares mediante dos líneas paralelas al eje del cuello femoral: pilares lateral (30 %), central (40 %) y medial (30 %) (Figura 25). La patogenia de la ONCF se identificó con su localización en estos pilares. La preservación del pilar lateral es la piedra angular para evitar el colapso de la cabeza femoral(1). El sistema de clasificación CJFH es un modelo de evaluación sencillo y directo para la ONCF con una considerable fiabilidad interobservador e intraobservador(192).

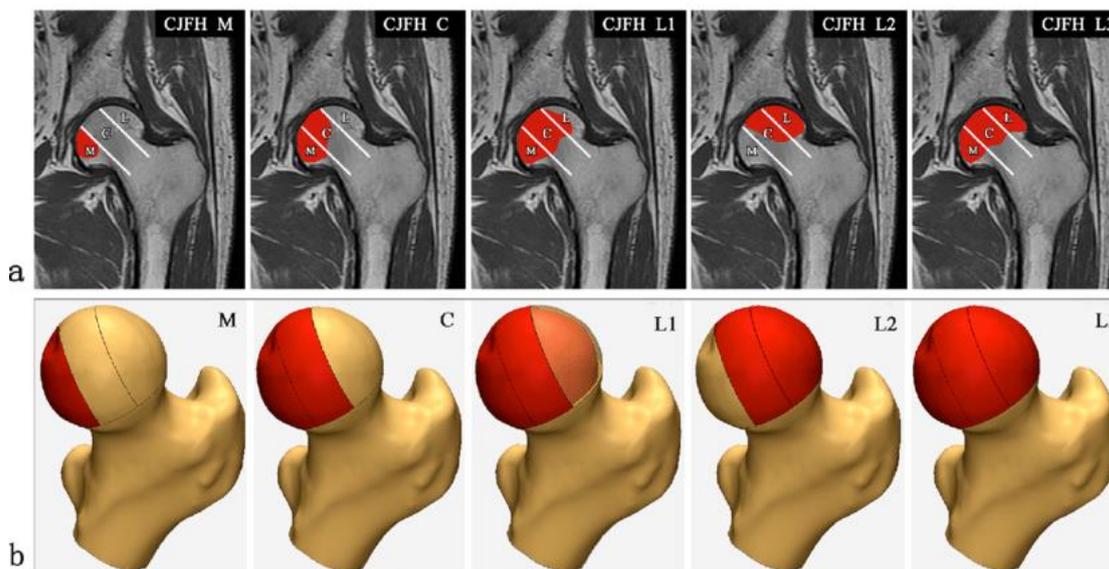


Figura 25. Diagrama esquemático de la clasificación del Hospital de Amistad China-Japón (CJFH) para la osteonecrosis de la cabeza femoral (ONCF). a) Resonancia magnética de la clasificación CJFH para ONCF basada en la estructura de tres pilares. Tipo M: la necrosis afectó al pilar medial. Tipo C: la necrosis afectó tanto al pilar medial como al central. Tipo L1: la necrosis afectó a los tres pilares pero se preservó una parte del pilar lateral. Tipo L2: la necrosis afectó todo el pilar lateral y una parte del pilar central. Tipo L3: la necrosis afectó a los tres pilares incluyendo el hueso cortical y la médula. b) Cinco modelos tridimensionales de la clasificación CJFH de ONCF. La zona necrótica de la cabeza femoral se muestra en rojo. Tomado de: Wen P, Zhang Y, Hao L, Yue Ja, Wang J, Wang T, et al. *The effect of the necrotic area on the biomechanics of the femoral head - a finite element study.* BMC Musculoskeletal Disorders. 2020;21.(193)

1.5.2 Diagnóstico histológico

La ONCF es un proceso evolutivo que implica necrosis medular y osteocítica en la cabeza femoral, un proceso reparativo alrededor de la zona necrótica y el colapso de la superficie articular, seguido de artrosis degenerativa de la cadera (Figura 26). Según la gravedad y el estadio de la enfermedad, el lugar afectado y los factores que estimulan su patogenia y progresión, la anatomía macroscópica y la histopatología de la osteonecrosis presentan un aspecto diferente(194). A pesar de los diferentes factores de riesgo y mecanismos asociados postulados, se acepta que las características anatomopatológicas de la ONCF son homólogas, independientemente de la etiología. Las características histopatológicas de necrosis y reparación son similares en la ONCFIE y en la ONCF no inducida por esteroides, a pesar de encontrarse una evolución más rápida de las alteraciones patológicas en la ONCFIE(195).

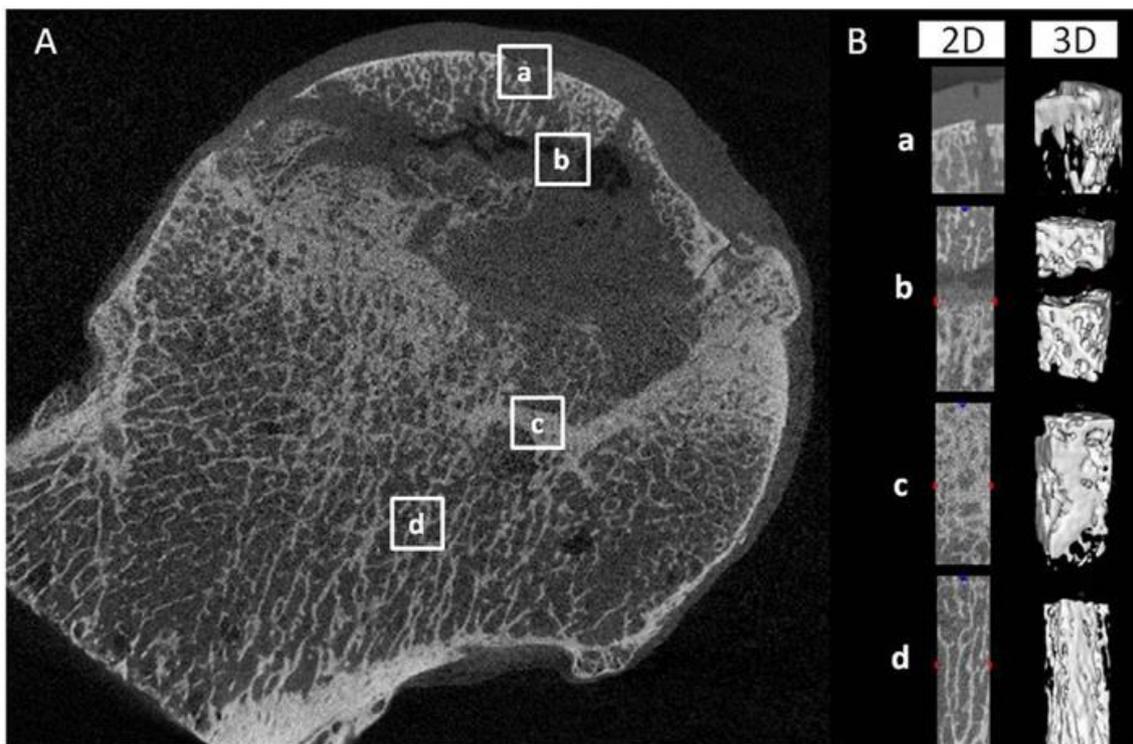


Figura 26. Cortes bidimensionales y reconstrucción tridimensional de imágenes de micro-TAC de la cabeza femoral. (A) Cortes bidimensionales de imágenes de micro-TAC del hueso subcondral (a), regiones necróticas (b), escleróticas (c) y sanas (d), distinguidas según la densidad de la línea de carbono. (B) Imagen reconstruida bidimensional y tridimensionalmente de las regiones de la caja blanca. Tomada de: Wang C et al. Bone microstructure and regional distribution of osteoblast and osteoclast activity in the osteonecrotic femoral head. *PLoS One*. 2014 May 6;9(5).(196)

1.5.2.1 Histopatología de la osteonecrosis

La osteonecrosis se caracteriza por un patrón típico de muerte celular y un complejo proceso de resorción y formación ósea. Las primeras características patológicas de la osteonecrosis son la necrosis de las células hematopoyéticas y los adipocitos, seguida de edema intersticial de la médula ósea. La necrosis de los osteocitos se produce tras 2 a 3 h de anoxia, pero los signos histológicos de la muerte de los osteocitos no aparecen hasta 24 a 72 h después de la privación de oxígeno. La necrosis osteocitaria se refleja inicialmente por la picnosis de los núcleos y posteriormente por la presencia de lagunas osteocíticas vacías (Figura 27). La hiperemia reactiva y la revascularización capilar en la periferia de la zona necrótica inician un proceso de reparación consistente tanto en la reabsorción como en la producción de hueso que sustituye de forma incompleta el hueso muerto por hueso vivo. El nuevo hueso vivo forma láminas sobre las trabéculas muertas, con una reabsorción parcial del hueso muerto. En las trabéculas subcondrales, la reabsorción ósea supera a la formación, lo que conduce a la eliminación neta de hueso, la pérdida de integridad estructural de las trabéculas, la fractura subcondral y la incongruencia articular. No es la necrosis en sí, sino el proceso de reparación y, en particular, el componente de resorción, lo que provoca la pérdida de integridad estructural y la fractura subcondral. La modelización por elementos finitos ha demostrado que es la pérdida de integridad estructural de las trabéculas subcondrales y no la placa subcondral la responsable de la fractura subcondral. Estos cambios histopatológicos se reflejan en el aspecto

radiográfico de la cabeza femoral produciendo la aparición de esclerosis y lucencia. Las áreas de lucencia reflejan resorción ósea, mientras que las áreas de esclerosis están compuestas tanto de hueso vivo reparador como de trabéculas muertas(31).

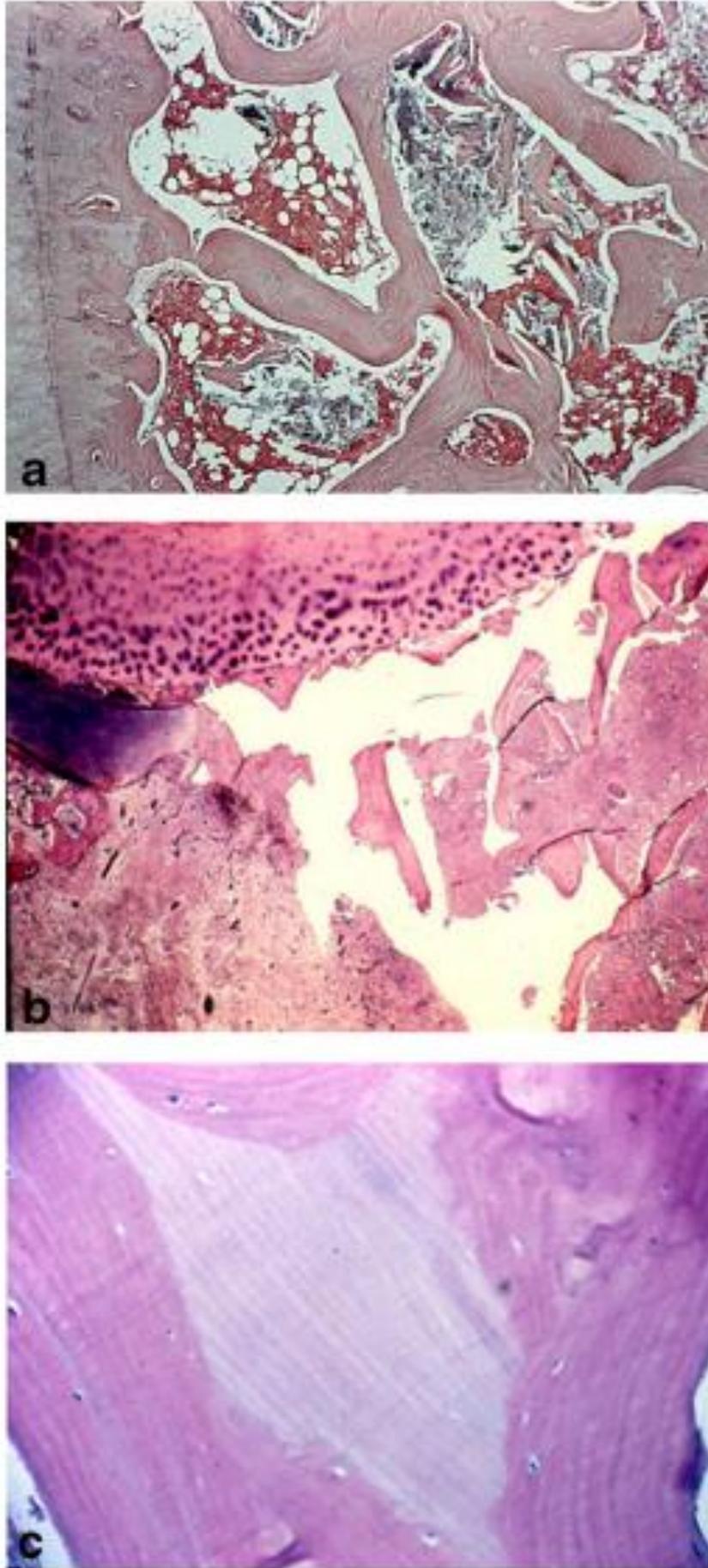


Figura 27. Características histopatológicas de la osteonecrosis. A) Médula ósea necrótica, con edema intersticial y lagunas vacías que indican osteocitos necróticos. B) Fractura subcondral a través de trabéculas parcialmente reabsorbidas. C) Laminación en hueso muerto. Los osteocitos están presentes en las lagunas del hueso viable, pero no del muerto. Tomada de: Shah KN, Racine J, Jones LC, Aaron RK. Pathophysiology and risk factors for osteonecrosis. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015;8(3):201-9.

De acuerdo con los trabajos de Catto et *al.*, se ha propuesto un sistema de cuatro estadios para ilustrar las alteraciones patológicas y microarquitectónicas en la ONCF, que ha sido ampliamente reconocido (tabla 7). En los últimos 60 años, se han realizado varios trabajos para aclarar los cambios patológicos en cada estadio, a pesar de los escasos avances en el pronóstico de la ONCF(197).

Estadio	Descripción
I	Plasmotaxis medular inespecífica, con algunas células espumosas y áreas focales de necrosis granular eosinofílica. Sin lesiones estrictamente óseas.
II	Necrosis medular. Espacios medulares reemplazados por necrosis eosinofílica granular, edema, hemorragias, fibrosis reticular, necrosis hematopoyética y extensión progresiva de las lesiones focales.
III	Estadio 2 + necrosis trabecular (50% de osteocitos muertos)
IV	Estadio 3 + fibrosis y <i>creeping substitution</i> (reabsorción de hueso muerto e incorporación de nuevo hueso).

Tabla 7. Clasificación histológica de la ONCF. Estadios uno al cuatro. Adaptada de: Mukisi-Mukaza M, Gomez-Brouchet A, Donkerwolcke M, Hinsenkamp M, Burny F. Histopathology of aseptic necrosis of the femoral head in sickle cell disease. *Int Orthop.* 2011 Aug;35(8):1145-50.(198)

1.5.2.2 Estadio histológico I

En la primera fase de la ONCF, la cabeza femoral no suele presentar manifestaciones macroscópicas, y se limita a alteraciones microscópicas. La fase inicial de la osteonecrosis consiste en la muerte celular, la interrupción de la actividad enzimática y la pérdida de la dinámica metabólica celular. Sin embargo, las células que componen el hueso difieren en su capacidad para resistir la lesión isquémica. Las células hematopoyéticas son las más sensibles y mueren en un plazo de 6-12 h. En consecuencia, los primeros signos indicativos de isquemia ósea se han observado en los espacios de la médula, donde hay pérdida de la tinción nuclear de las células medulares. Las células estrictamente óseas (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos) pueden sobrevivir de 12 a 48 h. Los condrocitos, por el contrario, están normalmente adaptados a una tensión de oxígeno relativamente baja y no se desvitalizan de forma temprana(199). Varios autores han descrito los cambios macroscópicos e histológicos del cartílago sin evidencia radiográfica de degeneración. En este primer estadio histológico, la radiología estándar tiene un valor limitado, y sólo las alteraciones anormales de los tejidos blandos (como la plasmotaxis y la alteración de los adipocitos) son observables en la resonancia magnética. La RM no siempre detecta con precisión la lesión labral o el daño condral, y la artroscopia sigue siendo el patrón oro para la detección y estadificación de las lesiones condrales(200). Ruch et *al.* encontraron una correlación deficiente entre la evaluación radiográfica y artroscópica del cartílago de la cabeza femoral en pacientes con ONCF postcolapso precoz, ya que la evaluación artroscópica reveló lesiones osteocondrales que no se habían observado en la radiografía ni en la RM(201). El trabajo de Mukisi-Mukaza et *al.* en 2011 encontró que no existe correspondencia entre la histopatología y el estadio radiológico en pacientes con ONCF(198).

En la fase inicial de la ONCF, encontramos edema medular en el hueso subcondral y en el hueso esponjoso profundo, lo que indica una disminución del riego sanguíneo en esta región. Una característica importante en la patogénesis de la ONCF es la obstrucción del flujo venoso intraóseo de salida, en particular en la zona transicional, en el borde del secuestro(202).

Como se comentó anteriormente, las CMMs residentes son células multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en una amplia gama de células especializadas y ofrecen una fuente de osteoblastos a la lesión afectada, desempeñando un papel importante en la osteogénesis y reparación del defecto necrótico. Las CMMs no sólo ofrecen las células precursoras para la reparación, sino que también secretan factores de crecimiento y factores proangiogénicos como la BMP-2 y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que estimulan los procesos de reparación local en la ONCF. Es en esta primera fase de la enfermedad cuando el potencial de regeneración tisular de las CMMs y su papel en la homeostasis ósea resultan de mayor trascendencia, pues las lesiones isquémicas pueden aun estabilizarse(203).

En relación con la estructura tridimensional del hueso en al ONCF, existen pruebas de que las modificaciones de la actividad de remodelación ósea y el debilitamiento de la estructura ósea con formación de microfracturas están implicadas en la patogenia y el desarrollo de la ONCF. Wang et *al.* especularon que la alteración de la actividad de osteoblastos y osteoclastos provoca una reducción de la resistencia mecánica macroscópica(196).

El tratamiento no quirúrgico, que incluye la reducción de la carga de peso, la farmacoterapia y la fisioterapia, podría seleccionarse para los pacientes con ONCF en estadio histológico I. Por otro lado, la descompresión es actualmente el procedimiento quirúrgico más común en los estadios iniciales de la ONCF, y muestra una tasa de éxito significativamente superior a la del tratamiento no quirúrgico(1).

1.5.2.3 Estadio histológico II

El aspecto macroscópico de la cabeza femoral no cambia considerablemente en el estadio II (Figura 28). Debido a la progresión de los procesos reparativos, la zona necrótica subarticular aparece mejor delimitada en sección anatomopatológica, y radiológicamente puede apreciarse un reborde o anillo periférico de esclerosis(194).

La superficie articular permanece inalterada, como en el estadio I. En un modelo animal de babuino, la interrupción del contacto entre el cartílago articular y el hueso subcondral vascularizado provocó la degeneración del cartílago, que tarda tres años. La interfase entre el hueso subcondral y el cartílago calcificado contiene numerosos canales vasculares, que penetran en el hueso subcondral y permiten la comunicación entre el hueso y el cartílago(204). Trabajos realizados en especímenes articulares postmortem demostraron que tanto la interfase osteocondral como el cartílago calcificado son permeables a los solutos de bajo peso molecular. Es probable que las moléculas de señalización atraviesen el hueso y el cartílago por medios vasculares y de otro tipo, incluida la red osteocítica lacunar-canalicular del hueso. La zona de cartílago calcificado forma una importante interfase entre el cartílago y el hueso para transmitir la fuerza, fijar el cartílago al hueso y limitar la difusión desde el hueso a las capas más profundas del cartílago(205). La rigidez y la dureza del cartílago calcificado son frecuentemente inferiores a las del hueso subcondral para un mismo contenido mineral. Entre el cartílago calcificado y cortical ósea terminal no se interponen fibras de colágeno. En consecuencia, la unión osteocondral se considera una zona de debilidad. Por el

contrario, la zona que separa el cartílago calcificado del cartílago articular, está atravesada por fibrillas de colágeno, lo que da lugar a una conexión bastante fuerte entre estas dos regiones. Se ha planteado la hipótesis de que las alteraciones del cartílago calcificado pueden comprometer su función mecánica como tejido conectivo y amortiguador, lo que conduce a la degeneración del cartílago articular suprayacente(1).

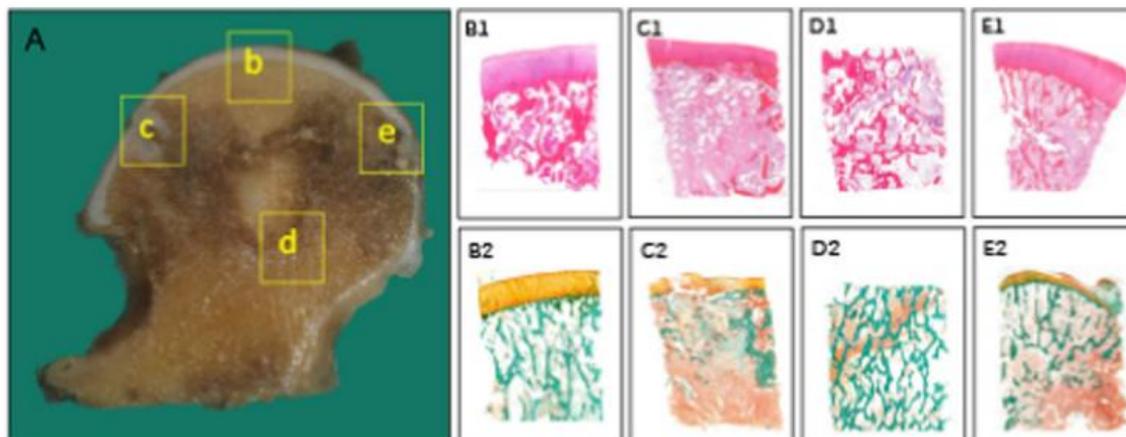


Figura 28. Alteraciones histopatológicas de las cabezas femorales osteonecroticas en estadio II. (A) Espécimen macroscópico seccionado coronalmente. La superficie articular no está alterada considerablemente, como en el estadio I (b, B1, B2). Zona necrótica: Hay una acumulación de restos celulares de médula ósea y trabéculas óseas que muestran lagunas vacías, conteniendo ocasionalmente algunos núcleos picnóticos de osteocitos (c, C1, C2). Zona transicional lateral: Aumento de la vascularización y reacción de la médula con infiltrado inflamatorio fibrovascular, lo que conduce a la formación de un quiste subcondral (d, D1, D2). Zona transicional inferior: Los capilares proliferantes y los fibroblastos se extienden a la zona necrótica, y los osteoblastos regeneran nuevo tejido óseo viable, dando lugar al reborde esclerótico (e, E1, E2). Zona transicional medial: Nuevos vasos sanguíneos se propagan en la región periférica de la lesión necrótica y los osteoclastos eliminan las trabéculas óseas muertas. Tinción: hematoxilina-eosina (B1-E1), tricrómico de Goldner (B2-E2). Aumento x 10. Tomado de: Chen Y, Miao Y, Liu K, Xue F, Zhu B, Zhang C, et al. Evolutionary course of the femoral head osteonecrosis: Histopathological - radiologic characteristics and clinical staging systems. *J Orthop Translat.* 2022;32:28-40. (1)

El tejido adyacente a la zona necrótica muestra un aumento de la vascularización y una reacción medular con un aumento de la infiltración inflamatoria fibrovascular(206). Los capilares proliferantes y los fibroblastos se extienden a la zona necrótica, y las trabéculas óseas muertas son eliminadas por los OCLs y sustituidas por otras nuevas viables, depositadas por los OBLs, lo que da lugar al reborde esclerótico. Utsunomiya et al. especularon con la posibilidad de que la concentración de tensión aumente en asociación con el aumento de la actividad osteoblástica en el límite lateral de la zona necrótica, y se ha demostrado que, tanto la tensión como el cizallamiento tienden a concentrarse en las trabéculas óseas engrosadas del límite de la lesión, junto con la progresión de los cambios escleróticos(207). Con frecuencia, los nuevos vasos sanguíneos sólo pueden propagarse a la región periférica de la lesión necrótica, y el nuevo tejido óseo que rodea la región necrótica desarrolla con el tiempo una banda esclerótica, que impide aún más que los vasos sanguíneos crezcan hacia el centro de la zona necrótica. En consecuencia, esta zona no puede repararse con éxito en la mayoría de los casos y finalmente se produce la fractura subcondral, que conduce al colapso de la cabeza femoral en una fase avanzada. El pico de tensión del borde esclerótico puede ser un factor principal que induce la formación de una lesión quística

en la ONCF a través de un mecanismo similar al de la artrosis. Además, se ha descrito que los cambios escleróticos provocan fracturas subcondrales en el margen lateral de la lesión(208).

En el tratamiento de los pacientes con ONCF en estadio histológico II se emplean regímenes terapéuticos combinados, que incluyen tratamientos no quirúrgicos y procedimientos de rescate articular. Los procedimientos más utilizados son la descompresión central y el injerto óseo vascularizado. No obstante, a la hora de decidir las intervenciones terapéuticas para la ONCF en estadio precoz, debe realizarse un examen más exhaustivo de los factores de riesgo, los estadios patológicos y de imagen, y los síntomas(209).

1.5.2.4 Estadio histológico III

En esta fase se produce una alteración evidente del aspecto de la cabeza femoral debido a las fracturas subcondrales y al posterior colapso del hueso necrótico. A medida que se desarrolla la ONCF, aparecen dichas fracturas, distribuyéndose inicialmente entre las zonas necróticas y escleróticas, causadas por la distribución anormal de la presión y la reabsorción osteoclástica. El tamaño de la lesión necrótica parece contribuir a la distribución de las fracturas subcondrales, siendo el factor más importante en el pronóstico de la osteonecrosis el porcentaje estimado de superficie de carga comprometida(210).

La fractura subcondral consiste en la fisura de la placa ósea subcondral y las trabéculas subcondrales subyacentes. En cuanto a la fractura en las trabéculas subcondrales, se caracteriza por un trazo fino lineal o ligeramente serpiginoso de baja intensidad de señal en todas las secuencias paralelas a la superficie articular en RM. La fractura trabecular específica suele localizarse justo por debajo del nivel de la placa ósea subcondral, o con menor frecuencia dentro de la zona esponjosa necrótica más profunda o en su periferia. La fractura inicial de la placa subcondral, que en la mayoría de los casos se localiza en la región entre el tejido óseo necrótico y esclerótico (Figura 29), se considera el punto de partida para desencadenar posteriormente el colapso de la cabeza femoral(210).

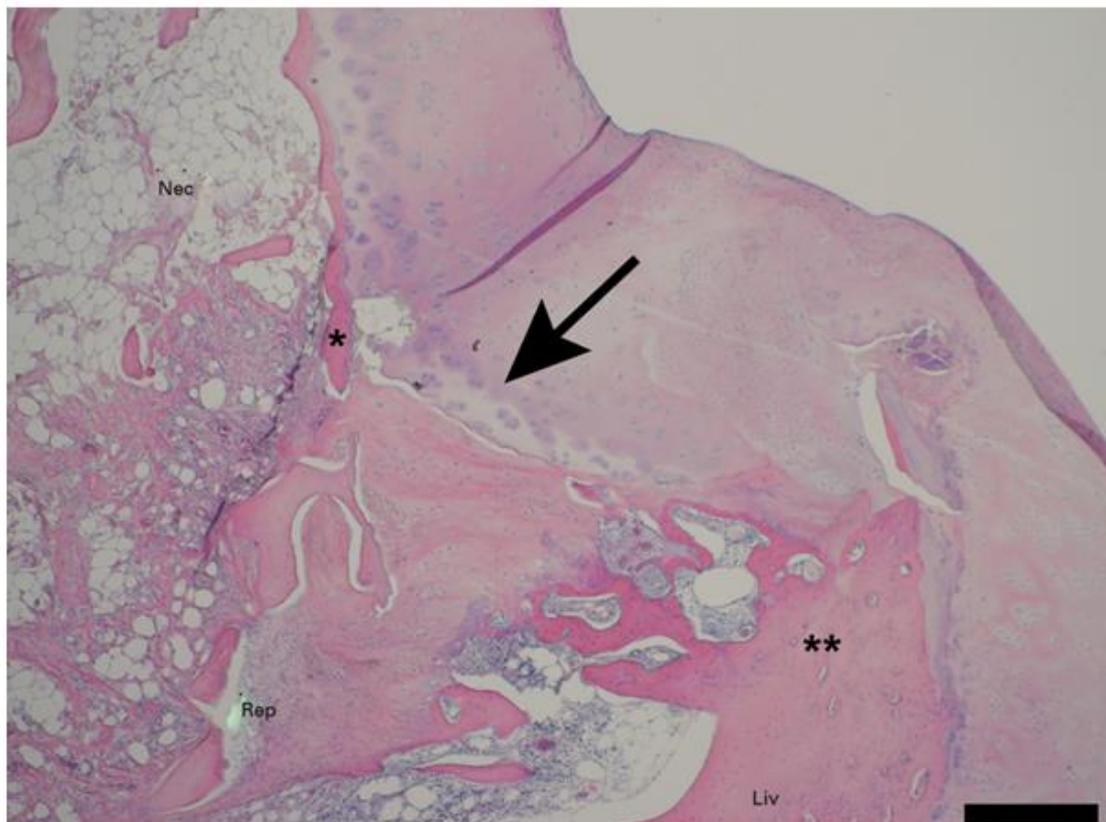


Figura 29. Microfotografía que muestra fractura en la unión (flecha) entre las trabéculas engrosadas (**) asociadas a la formación de hueso aposicional y las trabéculas óseas necróticas (*) (Nec, zona necrótica; Rep, zona reparativa; Liv, zona viva; hematoxilina y eosina $\times 20$; barra negra 500 μm). Tomada de: Motomura G, Yamamoto T, Yamaguchi R, Ikemura S, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. Morphological analysis of collapsed regions in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 2011 Feb;93(2):184-7.(210).

En la fase de colapso precoz de la ONCF, las grietas de fractura iniciales se producen entre regiones de reabsorción ósea a nivel de la porción anterosuperior de la cabeza femoral. Un daño leve recurrente puede provocar microfRACTURAS subcondrales, lo que permite que al líquido sinovial de la cavidad articular infiltrarse en el hueso subcondral subyacente, elevando la presión intraósea. El aumento de la presión intraósea afecta a la microcirculación local y esto desencadena un círculo vicioso que, en última instancia, provoca la formación de quistes subcondrales y el colapso articular. La lesión quística en la ONCF desempeña un papel importante en el desarrollo del colapso de la cabeza femoral. La osteonecrosis complicada con lesiones quísticas tiene más probabilidades de causar microfRACTURAS, colapso y el signo de la media luna, que son indicativos de la inestabilidad estructural de la cabeza femoral. La ausencia de inmovilización, así como la carga constante de peso, podrían acabar provocando un mayor colapso subcondral y daños en el cartílago(208).

Zhang et al. propusieron una nueva definición del estadio peri-colapso de la ONCF, que se refiere a un periodo continuo en el desarrollo de la ONCF desde la aparición de la fractura subcondral hasta el colapso temprano (<2 mm). El estadio peri-colapso, con características clínicas y de imagen distintas, proporciona una última oportunidad para la aplicación de técnicas de preservación articular. Es necesario

separar el estadio peri-colapso como un estadio independiente para evaluar la progresión natural de la ONCF y seleccionar un algoritmo de tratamiento adecuado(211).

El colapso de la cabeza femoral influye enormemente en la estadificación y el pronóstico de la ONCF. En cuanto a su patogenia, Bullough y DiCarlo propusieron las tres causas potenciales siguientes: 1) el efecto acumulativo de las microfracturas inducidas por la fatiga dentro de la zona necrótica; 2) la debilidad de las trabéculas en el frente reparativo como resultado de la actividad osteoclástica; 3) la concentración focal de tensión en la unión entre las trabéculas escleróticas engrosadas de la zona reparativa y las trabéculas necróticas. Al igual que los hallazgos mecánicos en la fase inicial, se ha observado que el colapso afecta sistemáticamente en la fase final de la ONCF en el límite lateral de las fracturas subcondrales(1).

La interfase reparativa experimenta una remodelación progresiva en su unión con la zona necrótica. La osificación endocondral es la forma fisiológica de formación ósea cuando los extremos de la fractura están bien vascularizados, fenómeno que también puede observarse en la interfase reparativa. Phemister et *al.* acuñaron el término "sustitución progresiva" (*creeping substitution*) para indicar la lenta sustitución del hueso muerto aséptico(199). El procedimiento de acumulación osteoblástica de hueso aposicional, a menudo sobre trabéculas muertas, y de resorción osteoclástica de hueso desvitalizado, tiene lugar en la interfase reparativa y en torno a ella. En cuanto a la remodelación ósea relacionada con la zona necrótica, Fan et *al.* establecieron con éxito un modelo de colapso de ONCF en emú, en el que se reconstruyó la extensa estructura trabecular y se absorbió la trabécula original(212).

Las alteraciones en la remodelación del tejido óseo pueden contribuir a la progresión de la osteonecrosis de varias maneras, por ejemplo, induciendo un defecto de cicatrización de las microfracturas y facilitando así las fracturas subcondrales que, en última instancia, conducen al colapso de la cabeza femoral. Cabe destacar que puede producirse necrosis focal del tejido de reparación alrededor de la zona de colapso de la fractura, que no debe interpretarse como osteonecrosis recurrente, ya que probablemente no esté correlacionada con una isquemia recurrente sino con la propia fractura. Desde el punto de vista histológico, la zona de interfase reparativa es una mezcla de trabéculas óseas fragmentadas y cartílago con tejidos reparativos, incluidos hueso, tejido reactivo, cartílago metaplásico, tejido fibroso vascularizado y tejido de granulación (que es la apariencia de una fractura inestable en cualquier otra parte del esqueleto). A pesar del proceso reparador y de las trabéculas óseas reactivas en la zona, la fractura subcondral no se repara por completo en la ONCF(213).

Los procedimientos de preservación articular, incluidos el injerto óseo vascularizado y la osteotomía, son muy recomendables para los pacientes con ONCF en la fase inicial del estadio III histológico, que suele denominarse estadio peri-colapso. En cuanto a los pacientes en la fase tardía del estadio III, con un colapso más grave de la cabeza femoral, los procedimientos de preservación articular siguen siendo dignos de probar en los jóvenes, mientras que la artroplastia articular está indicada para las personas más mayores (>55 años)(209).

1.5.2.5 Estadio histológico IV

Debido al desprendimiento progresivo de fragmentos osteocondrales de la zona infartada, la forma de la cabeza femoral se deforma gravemente en esta fase (Figura 30). El cartílago degenerado por la deformación de la cabeza femoral provoca a su vez daños en el cartílago acetabular y la ONCF evoluciona hacia una artrosis secundaria.

Pueden detectarse restos osteocondrales en los tejidos capsular y sinovial. Cuando los cambios osteoartríticos están plenamente desarrollados, puede que no sea posible reconocer que la causa inicial fue la necrosis avascular subarticular. Los condrocitos próximos a la lesión necrótica conservan la integridad de su morfología, pero cuando ésta progresa hacia la capa superficial del cartílago, los condrocitos varían en su forma y estructura(194).

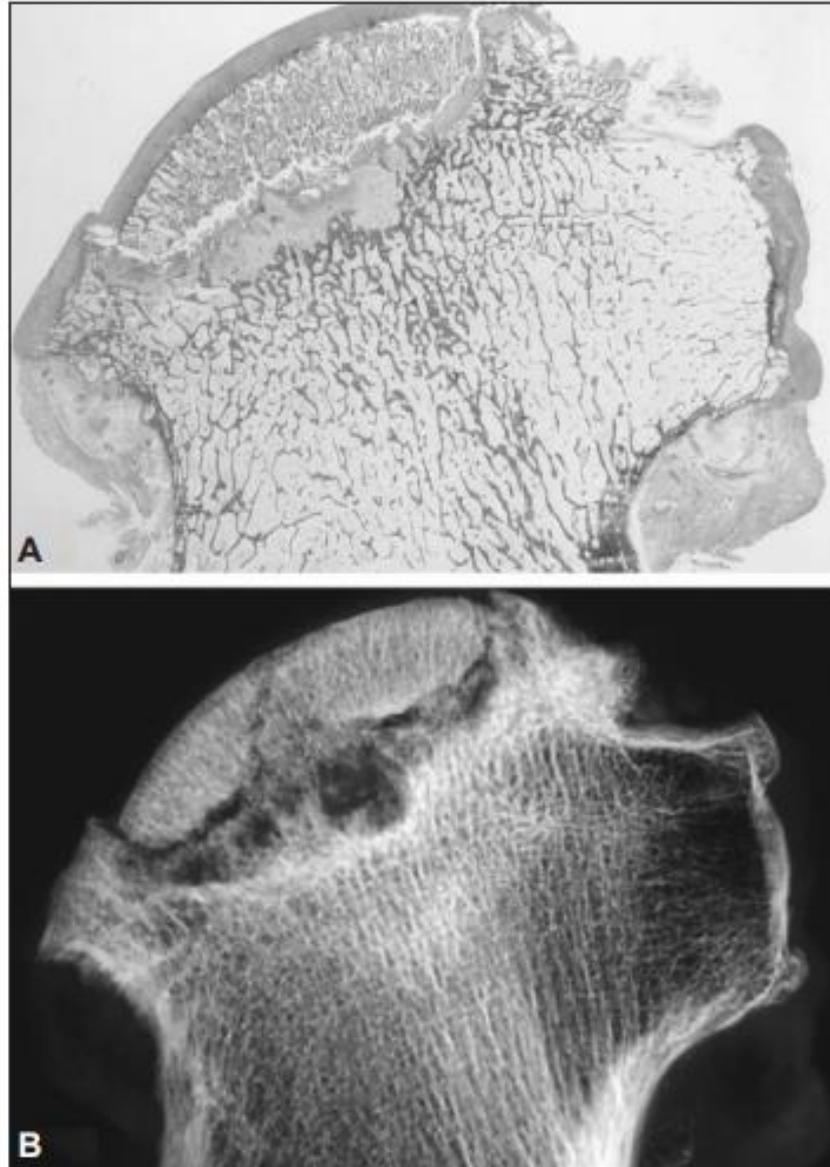


Figura 30. Sección frontal de una cabeza femoral infartada; A -corte histológico, teñido con hematoxilina y eosina. En la periferia de la zona infartada se observa una fractura subcondral que ha provocado el colapso de la superficie articular. Las trabéculas del hueso viable adyacente al infarto están engrosadas. B - Radiografía de la misma muestra, mostrando la línea de fractura y el borde de esclerosis ósea en la periferia del infarto. Tomada de: Fondi C, Franchi A. Definition of bone necrosis by the pathologist. Clin Cases Miner Bone Metab. 2007;4(1):21-6.(194)

La celularidad del tejido óseo disminuye a medida que la enfermedad se encuentra en una fase más avanzada. En la fase tardía de la ONCF, se produce hiperplasia endotelial arterial, disminuye el diámetro arterial y se agrava la alteración de la estructura arterial, lo que conduce a una oclusión arterial completa, que lleva a la artrosis de la articulación de la cadera. En este estado isquémico la penetración neovascular ocupa el hueso subcondral dañado, y el colapso sobreviene cuando la zona de soporte de peso de la cabeza femoral es sustituida por tejido fibroso. El aplanamiento de la cabeza puede entenderse fácilmente como un episodio secundario al colapso. En esta fase suele tener lugar una pérdida grave de la función de la cadera o un agravamiento del dolor, por lo que debe optarse por la sustitución articular(209).

1.5.3 Diagnóstico diferencial

Los síntomas de la ONCF se solapan con otras etiologías que son importantes a la hora de realizar un diagnóstico diferencial. Una de ellas es el EMO, también conocido como osteoporosis transitoria (ya abordado en el apartado de diagnóstico por imagen), que suele tener lugar como respuesta reactiva a una lesión, al aumento de la actividad física o a la artrosis. Esta afección se presenta como un dolor de cadera de aparición rápida, a veces atraumático, autolimitado y suele resolverse en un año. La RM suele revelar un edema de MO generalizado, que da a la enfermedad su nombre. Otra condición que puede confundirse con la ONCF es una fractura subcondral, que suele tener lugar tras un traumatismo menor en personas de edad avanzada, en el contexto de una osteoporosis que conduce finalmente a una insuficiencia subcondral. A la osteoporosis transitoria y la fractura subcondral debe añadirse la osteocondritis disecante, que, aunque típica de la infancia, es otra entidad a descartar. Esta, es una enfermedad articular en la que el hueso que subyace bajo el cartílago de una articulación muere debido a la falta de aporte sanguíneo. Dichos hueso y cartílago pueden desprenderse, lo que causa dolor e impotencia funcional. El síndrome de dolor regional complejo, la sinovitis vellonodular pigmentada, los infartos metafisarios o la artrosis de cadera también deben incluirse en el diagnóstico diferencial de la ONCF(176). Especialmente complicado puede ser discriminar si nos encontramos ante un caso de AC primaria o una ONCF en su estadio final (tabla 8).

El diagnóstico por imagen de la ONCF presenta múltiples trampas, o *pitfalls*, como la persistencia de médula roja hematopoyética, la fóvea central o las fosas de herniación sinovial, así como la existencia de procesos patológicos que pueden simular una osteonecrosis, como los quistes subcondrales, la osteomielitis, las lesiones osteocondrales o las metástasis(214).

Hallazgo	AC	ONCF	ACRP
Presentación	Desarrollo lento	Dolor temprano	Dolor tardío
Historia	Dolor al movimiento	Dolor en reposo	Dolor en reposo y movimiento
Edad (años)	>60	30-50	60-70
Sexo (M:H)	1.6:1	Similar	10:01
Bilateralidad	10-30%	70-80%	5-30%
Otras articulaciones	Sí (20%)	Sí	No
Necrosis	Secundaria	Primaria	Secundaria
Incidencia	Común	Intermedia	Rara

Tabla 8. *Diferencias entre la artrosis, la osteonecrosis y la artrosis rápidamente progresiva de la cadera (ACRP). Adaptada de: Pivec R, Johnson AJ, Harwin SF, Mont MA. Differentiation, diagnosis, and treatment of osteoarthritis, osteonecrosis, and rapidly progressive osteoarthritis. Orthopedics. 2013;36(2):118-25.(21).*

1.5.4 Criterios diagnósticos

Una vez abordado el diagnóstico de la ONCF, cabe citar la búsqueda de consenso a nivel internacional para este propósito. Los criterios diagnósticos propuestos para la ONCF que a continuación se abordan se han desarrollado según el "Consenso de expertos chinos sobre el diagnóstico y tratamiento de la osteonecrosis de la cabeza femoral en adultos (versión de 2012)", la "Guía china para el diagnóstico y tratamiento de la necrosis de la cabeza femoral en adultos (versión de 2016)" y los "Criterios internacionales de diagnóstico de la osteonecrosis de la cabeza femoral"(209). Son los siguientes:

- 1) Características clínicas: El dolor se localiza principalmente en la zona de la cadera, la nalga o la ingle, acompañado ocasionalmente de dolor en la rodilla y limitación de la rotación interna de la cadera. Los pacientes suelen tener antecedentes de traumatismo de cadera, uso de corticosteroides o alcoholismo, o tener antecedentes laborales de alto riesgo, como ser buceador.
- 2) Imágenes por resonancia magnética: se demuestra como una forma lineal subcondral limitada de baja intensidad de señal en imágenes ponderadas en T1 o un "signo de la doble línea" en imágenes ponderadas en T2.
- 3) Radiografías: Las manifestaciones radiográficas suelen ser osteosclerosis, cambios quísticos y el "signo de la media luna" en estadios tempranos. Tras el colapso, se produce una pérdida de esfericidad de la cabeza femoral y una artrosis degenerativa en los estadios tardíos.
- 4) Tomografía computarizada: suele revelar zonas de osteosclerosis que rodean el hueso necrótico y el hueso reparado, o muestra la fractura ósea subcondral.
- 5) Examen con radionúclidos: Una gammagrafía ósea de fase aguda de la cabeza femoral puede revelar zonas frías; la gammagrafía durante el periodo de reparación de la necrosis demuestra una zona fría en medio de una zona caliente, es decir, un cambio "en forma de donut" (frío en caliente). La tomografía computarizada por emisión monofotónica puede aumentar la sensibilidad del examen con radionúclidos para el diagnóstico de la ONCF. La tomografía por emisión de positrones puede detectar signos de ONCF antes que la RM y la tomografía computarizada por emisión monofotónica y puede predecir la progresión de la ONCF.
- 6) Biopsia ósea: la proporción de lagunas vacías en el hueso trabecular es superior al 50%, varios huesos trabeculares adyacentes están afectados y una parte de la médula ósea está necrosada. Las células madre de la médula ósea se diferencian gradualmente en células adiposas hipertróficas. Las venas y arterias presentan trombosis, el espacio intersticial muestra edema. Se observa fractura ósea subcondral, la zona necrótica se agranda, se aprecian cambios quísticos locales, parte de la zona de la cabeza femoral se colapsa, el tejido óseo necrótico entra en fase de reparación, y nuevos vasos sanguíneos y nuevo tejido fibrótico crecen en la zona necrótica para formar tejido de granulación. Durante la fase

tardía de los cambios en el suministro de sangre, se produce una hiperplasia endotelial arterial que conduce a una oclusión arterial completa. La biopsia suele obtenerse cuando se realiza una descompresión central con una trefina de gran diámetro. En la actualidad, cuando la RM muestra una lesión típica, la biopsia no es necesaria.

- 7) Angiografía de sustracción digital (ASD): La ONCF puede manifestarse como estasis, daño e interrupción del riego sanguíneo a la cabeza femoral, lo que tiene un importante significado orientativo para prevenir la aparición de osteonecrosis tras una fractura del cuello femoral. En la ONCF no traumática, el estasis venoso y la obstrucción del retorno sanguíneo aparecen en la fase temprana, la isquemia arterial se produce en la fase media y la oclusión arterial se desarrolla en la fase tardía. Una vez confirmado el diagnóstico de osteonecrosis, se recomienda la ASD a los pacientes sometidos a cirugía de preservación de la cadera con objeto de sentar las bases para el desarrollo de un plan quirúrgico.

El cumplimiento de los Criterios 1 y 2 puede confirmar el diagnóstico de necrosis de la cabeza femoral; los Criterios 3-7 son métodos diagnósticos auxiliares y que pueden servir para guiar el tratamiento.

1.6 Prevención y tratamiento de la ONCF

En aquellas poblaciones con factores de riesgo de osteonecrosis, la eliminación de estos cuando sea posible puede prevenir eficazmente la aparición de la ONCF. Existe evidencia de que en la ONCF la administración de fármacos vasodilatadores combinados con fármacos anticoagulantes previene la aparición de osteonecrosis(215).

En la prevención de la ONCF de naturaleza traumática puede valorarse el riego sanguíneo de la cabeza femoral mediante angiografía por tomografía axial computarizada. Cuando no hay irrigación sanguínea efectiva, se puede realizar la exploración quirúrgica y anastomosis de los vasos sanguíneos de la región de apoyo, se pueden injertar colgajos óseos pediculados y proteger la irrigación sanguínea durante la fijación interna(216).

No existe un tratamiento universalmente aceptado para la ONCF, existiendo aun cierta controversia en la literatura, sin embargo, existe un objetivo terapéutico constante: preservar la mayor parte posible de hueso sano y conservar la articulación natural tanto como sea posible, de acuerdo con el estilo de vida de cada paciente, edad, u ocupación. Tras establecer el diagnóstico se tienen en cuenta diversos factores, como los síntomas, el tiempo de evolución y su estado, determinando si hay o no colapso estructural. El tratamiento puede clasificarse de forma general en quirúrgico y no quirúrgico.

1.6.1 Tratamiento no quirúrgico

Deben evitarse las actividades de impacto y carga, al favorecer el colapso estructural de la cabeza femoral. El uso de muletas puede aliviar eficazmente el dolor. No se recomienda el uso de silla de ruedas. Entre las posibles terapias de medicina física, se incluyen la terapia con ondas de choque extracorpóreas, los campos electromagnéticos y la cámara hiperbárica(209).

Respecto a los tratamientos farmacológicos, se ha recomendado el uso combinado de anticoagulantes, fármacos potenciadores de la fibrinólisis,

vasodilatadores y fármacos hipolipemiantes. También puede utilizarse una combinación de fármacos que inhiben la formación de osteoclastos y fármacos que aumentan la osteogénesis. La medicación puede utilizarse sola o en combinación con la cirugía conservadora de la cadera(209).

Los bifosfonatos se recomiendan en las fases iniciales de la ONCF. Actúan inhibiendo la actividad osteoclástica y reduciendo el recambio óseo. En un ensayo controlado aleatorizado, se comparó la eficacia del alendronato frente a placebo en pacientes con ONCF no traumática en los estadios II-III de Steinberg. Los pacientes del brazo del fármaco experimentaron 2 colapsos de las 29 cabezas femorales evaluadas, mientras que 19 de 25 cabezas femorales evaluadas se colapsaron en el brazo del placebo(217). Sin embargo, otro estudio prospectivo, aleatorizado y controlado con placebo realizado por Chen et al. no confirmó estos hallazgos. No hubo diferencias significativas en los resultados radiográficos, la prevención de la PTC ni en la mejora de la calidad de vida entre el brazo de placebo y el de tratamiento(218). Por lo tanto, los resultados de los estudios disponibles no son concluyentes. Algunos de ellos presentan limitaciones en su metodología, incluida la falta de un grupo de control. La escasez de pruebas disponibles no permite elaborar directrices que informen sobre la dosis y la duración del tratamiento con bifosfonatos.

El tratamiento con estatinas parece inhibir la adipogénesis inducida por corticosteroides y la ONCF. Sin embargo, al igual que ocurre con el tratamiento con bifosfonatos, no existen directrices sobre el uso de estatinas. Los resultados de Ajmal et al. no indican diferencias en la aparición de osteonecrosis entre los pacientes tratados con corticosteroides que reciben o no estatinas(219). Por el contrario, Pritchett et al. observaron una reducción significativa de la tasa de ONCF en los pacientes que tomaban corticoides y recibían estatinas(220).

En relación con el empleo de vasodilatadores en la ONCF, se ha descrito el efecto beneficioso del vasodilatador iloprost en la evolución radiográfica y clínica de pacientes con estadios iniciales de ONCF. Claßen et al. investigaron el efecto de iloprost en 108 pacientes con osteonecrosis; la mediana de seguimiento de los pacientes fue de 49,7 meses. La mayoría de los pacientes (74,8%) observaron una mejoría de las molestias subjetivas, evaluada mediante la escala analógica visual. En este trabajo, los pacientes con un estadio inferior de la enfermedad obtuvieron mejores resultados(221).

En relación con el empleo de la anticoagulación, trabajos como el de Glueck et al. sugieren que anticoagulantes como la enoxaparina pueden retrasar la progresión de la ONCF si el tratamiento se aplica en los estadios iniciales de la enfermedad, aunque los datos sobre su eficacia siguen siendo limitados(222).

1.6.2 Tratamiento quirúrgico

Cuando la ONCF progresa rápidamente y el tratamiento no quirúrgico resulta ineficaz, la mayoría de los pacientes requieren tratamiento quirúrgico. Los métodos quirúrgicos pueden clasificarse en dos categorías principales: los métodos de reparación y reconstrucción, que preservan la cabeza femoral del propio paciente, y los métodos de sustitución de la articulación de la cadera. Las cirugías que preservan la cabeza femoral incluyen la descompresión (*core decompression*), la osteotomía y el trasplante óseo vascularizado o no, que son adecuadas para pacientes en fases iniciales (por ejemplo, ARCO 0-1) o intermedia (por ejemplo, ARCO 2-3 B) de la ONCF, y con un volumen necrótico superior al 15%. Si el método es eficaz, puede evitarse o retrasarse la sustitución articular(16).

La descompresión puede realizarse cuando los resultados de la ASD y la RM sugieren que el riego sanguíneo presenta características de estasis venoso precoz (como en los estadios 1-2A de la estadificación ARCO). Esta técnica se ha aplicado durante mucho tiempo y ha dado buenos resultados. En la actualidad, puede a su vez subdividirse en, descompresión mediante perforación múltiple, y descompresión mediante un canal ancho. La diferencia radica principalmente en el diámetro del canal de descompresión; el diámetro del canal para la perforación múltiple es de 3, 3,5 o 4 mm, mientras que el del canal ancho es de 6 mm o más. La descompresión combinada con el trasplante de células (cultivo in vitro o médula ósea autóloga concentrada que contiene células mononucleares) se ha administrado clínicamente en instituciones médicas de referencia(223).

En relación con el trasplante no vascularizado, los principales métodos utilizados incluyen la descompresión y el trasplante óseo a través del trocánter femoral y la descompresión y el injerto óseo a través de la cabeza y el cuello femorales. Los métodos de injerto óseo comprenden el injerto de hueso compacto y el injerto de hueso a modo de puntal (*strut*). Los materiales de trasplante óseo incluyen hueso cortical y esponjoso autólogo, el hueso alogénico y materiales de sustitución ósea.(224)

El trasplante vascularizado, o colgajo, se realiza cuando los resultados de la ASD y la RM sugieren que el riego sanguíneo muestra isquemia arterial (estadio 2B-3B de la estadificación ARCO). El trasplante de hueso autólogo comprende el colgajo óseo pericadera y el colgajo de peroné. La elección del método de trasplante óseo empleado se realiza en función de las ventajas e inconvenientes globales de cada método, la competencia del cirujano y otros factores(209).

La finalidad de una osteotomía es desplazar la zona necrótica a la zona de la cabeza femoral que no soporta peso. Las técnicas de osteotomía incluyen la osteotomía en varo o en valgo y la osteotomía rotacional a través del trocánter femoral. La elección del método quirúrgico se basa en el principio de no modificar la cavidad femoral(225).

La sustitución articular mediante prótesis total de cadera debe indicarse en casos en los que la cabeza femoral esté significativamente colapsada, exista una oclusión arterial en su estadio final, exista una pérdida grave de la función articular y/o dolor moderado/severo. La intervención consiste en la extracción de la cabeza femoral y la cavidad acetabular, y su sustitución por un implante o prótesis artificial (Figura 31)(209).



Figura 31. Artroplastia total de cadera izquierda por necrosis avascular de cabeza femoral. Tomada de: Konarski W, Poboży T, Śliwczyński A, Kotela I, Krakowiak J, Hordowicz M, et al. Avascular Necrosis of Femoral Head-Overview and Current State of the Art. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(12).(226)

1.6.3 Terapias celulares

Las terapias celulares se basan principalmente en CMMs derivadas de la MO, el tejido adiposo o el cordón umbilical. En la actualidad, se considera que la patogénesis de la ONCF está relacionada con las CMMs, incluido el aumento en la apoptosis y la disminución del número de dichas células, el descenso en su capacidad de crecimiento, la alteración de su metabolismo y la disminución de su potencial de diferenciación osteogénica(227). Las CMMs serían las encargadas de iniciar el proceso de revascularización y regeneración del tejido óseo (Figura 32). Por ejemplo, Li et al. trataron 49 caderas en la fase inicial de la ONCF con CMMs de médula ósea en combinación con pravastatina. Los resultados mostraron una mejora de la función y el dolor de la cadera. Se observó nueva vascularización en 21 caderas a los seis meses del tratamiento(226). Aunque se han observado resultados prometedores en el tratamiento con CMMs, deben realizarse más estudios controlados para formular recomendaciones sobre su uso en la práctica habitual.

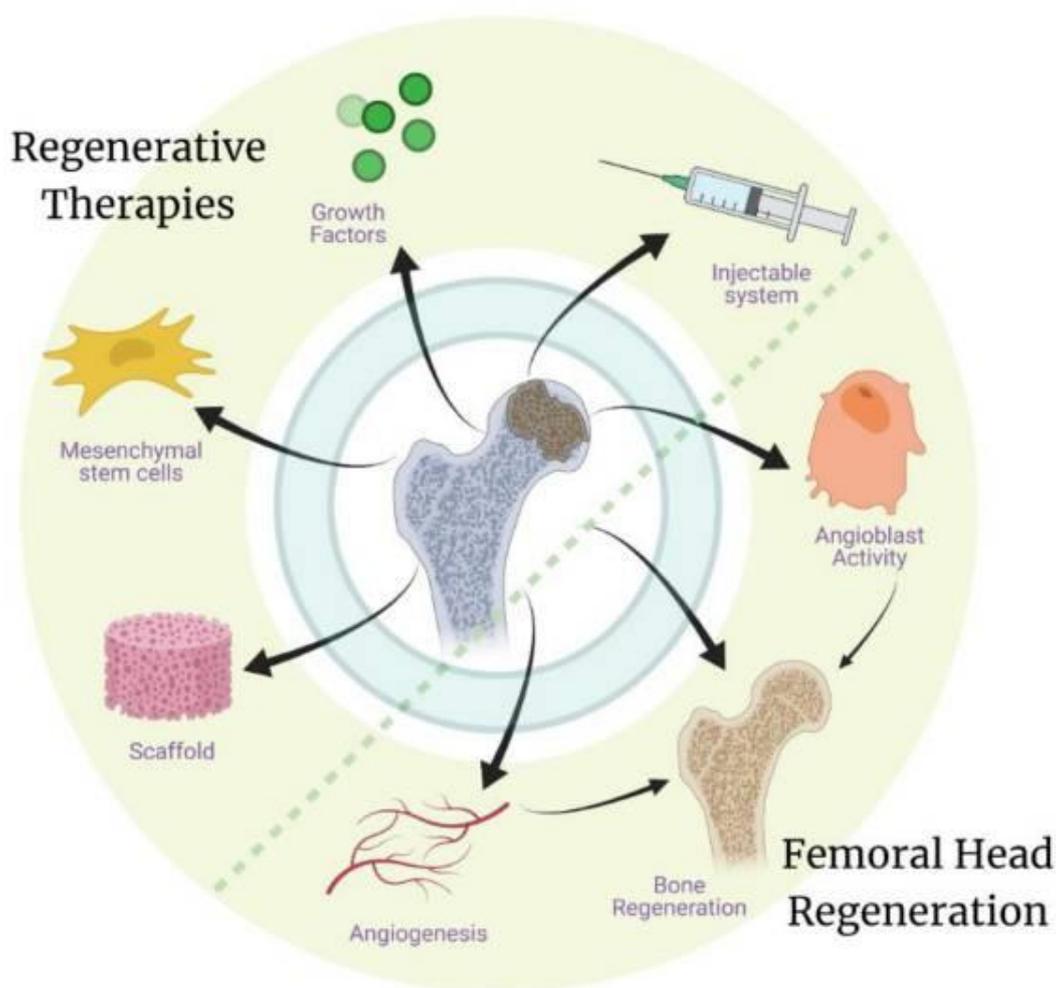


Figura 32. Las terapias regenerativas, incluido el uso de injertos/scaffolds con CMMs y factores de crecimiento, se han revelado prometedoras en estudios que investigan la regeneración de la cabeza femoral necrótica. El desarrollo de una terapia que pueda administrarse mediante cirugía

mínimamente invasiva podría evitar el tratamiento quirúrgico contribuyendo a la regeneración tanto de la vascularización como del tejido óseo. Tomada de: Murab S, Hawk T, Snyder A, Herold S, Totapally M, Whitlock PW. Tissue Engineering Strategies for Treating Avascular Necrosis of the Femoral Head. Bioengineering (Basel). 2021 Dec 2;8(12):200.(228).

1.6.4 miARNs como potencial estrategia terapéutica

Se sabe que los miARN desempeñan un papel crucial en la patogenia de la ONCF, especialmente al interactuar con factores de transcripción implicados en la adipogénesis, la osteogénesis y la angiogénesis. Un número cada vez mayor de estudios también han insinuado sus posibles funciones terapéuticas en la ONCF. Sin embargo, una de las principales cuestiones sin resolver radica en que los estudios realizados emplean especímenes de los pacientes en los que se encuentran varios tejidos diferentes (hueso trabecular, médula ósea, vasos sanguíneos y cartílago), con lo que la fuente celular de los miARN desregulados sigue sin estar definida. Cabe destacar que incluso el mismo miARN podría tener funciones diferentes en distintos tipos celulares. Es posible que los estudios futuros tengan que recurrir a la transcriptómica unicelular u otras técnicas que puedan abordar esta cuestión(108).

Desde un punto de vista terapéutico, la administración de inhibidores o análogos de miARN en tejidos específicos sigue siendo un reto, y las funciones exactas de muchos miARN desregulados en la ONCF siguen sin estar claras. Deberían llevarse a cabo más estudios con ratones knockout específicos para cada tejido a fin de caracterizar las funciones in vivo de los diferentes miARNs. Mediante el perfil genómico de miARNs, varios estudios han identificado diferencias en la cantidad de miARNs en el suero de pacientes con ONCF, lo que sugiere su potencial uso como marcadores diagnósticos. Sin embargo, no está claro si estos cambios de miARNs son paralelos a la aparición de la ONCF o sólo reflejan la progresión a la fase terminal de la enfermedad(229).

Un análisis del curso temporal de los miARNs circulantes en pacientes tratados con corticosteroides que aún no han desarrollado ONCF podría aclarar la relación temporal entre los cambios en los miARNs y el desarrollo de ONCF. Dado que la mayoría de los pacientes que reciben tratamiento con corticosteroides tienen alguna forma de enfermedad inflamatoria sistémica, en todos los estudios debería incluirse un control adecuado con pacientes con la misma enfermedad y tratamiento farmacológico, pero sin desarrollo de ONCF. Además, se requiere la validación de grandes cohortes en diferentes poblaciones para traducir estos hallazgos en beneficios clínicos. Por lo tanto, se necesitan más estudios básicos y traslacionales para maximizar el potencial clínico de los diagnósticos y terapias basados en miARN en la ONCF(108).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La Osteonecrosis de Cabeza Femoral (ONCF) representa un desafío diagnóstico significativo debido a su naturaleza insidiosa y a la falta de marcadores clínicos definitivos en etapas tempranas de la enfermedad. En este estudio exploramos diferentes aspectos relacionados con el diagnóstico de las ONCF con el objetivo de mejorar la precisión y la consistencia de su identificación.

La dificultad en el diagnóstico reside en que, sin la utilización de técnicas de imagen avanzadas como la Resonancia Magnética Nuclear, los signos tempranos de osteonecrosis pueden pasar inadvertidos. En el presente estudio, postulamos que la radiografía convencional presenta limitaciones tanto en la detección de signos radiológicos característicos de la ONCF como en la consistencia del diagnóstico entre distintos especialistas, lo cual implica una necesidad de reevaluación en la aproximación diagnóstica de esta enfermedad.

Nuestra hipótesis es que determinados marcadores histológicos podrían complementar el diagnóstico por imagen de la ONCF y proponemos que podría existir una correlación entre la presencia de lagunas osteocíticas vacías y el estadio clínico de la enfermedad. Esta característica histopatológica podría correlacionarse significativamente con el estadio clínico de la ONCF, proporcionando así una herramienta objetiva para la estratificación de los pacientes.

En paralelo, exploramos el papel potencial de las células madre mesenquimales (CMMs) en la patogénesis de la ONCF. Postulamos que las anomalías en estas células podrían contribuir al desarrollo y progresión de la enfermedad, lo que podría tener implicaciones importantes para el diagnóstico y la estratificación de los pacientes.

A través de estas hipótesis integradas, buscamos proporcionar una comprensión más completa y holística de la ONCF, con el objetivo final de mejorar el diagnóstico y el manejo clínico de esta patología incapacitante.

2.2 Objetivos

1.-Evaluar las comorbilidades y características demográficas asociadas con la ONCF.

Identificar los factores de riesgo epidemiológicos y clínicos más prevalentes en pacientes con ONCF comparados con pacientes con artrosis de cadera, con el objetivo de caracterizar posibles diferencias que puedan influir en la predisposición a esta enfermedad.

2.- Analizar la fiabilidad diagnóstica de la ONCF entre especialistas.

Examinar la concordancia interobservador en el diagnóstico de la ONCF mediante herramientas radiológicas e histológicas, y valorar las discrepancias diagnósticas entre cirujanos ortopédicos, radiólogos y patólogos para identificar áreas de mejora en el proceso diagnóstico.

3.- Determinar la fiabilidad de los signos radiológicos característicos de la ONCF.

Evaluar la capacidad de observadores independientes de identificar signos radiológicos básicos de la ONCF, así como de estadificar radiológicamente la enfermedad.

4.- Estudiar los marcadores histológicos clave para el diagnóstico de la ONCF.

Investigar la relación entre la presencia de lagunas osteocíticas vacías, la fibrosis medular y otros signos histopatológicos con los estadios clínicos de la ONCF, buscando establecer una correlación que complemente las limitaciones del diagnóstico por imagen.

5.- Caracterizar la fisiopatología de las CMMs en la ONCF

Analizar las capacidades proliferativas, adipogénicas y osteogénicas de las células madre mesenquimales (CMMs) en pacientes con ONCF en comparación con controles con artrosis de cadera, con el fin de comprender mejor su papel en la patogénesis de la enfermedad y sentar las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la regeneración ósea en estos pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Obtención de muestras

Para las muestras humanas, tanto cabezas femorales como sangre venosa periférica, se incluyeron los pacientes que cumplían los siguientes criterios: (1) diagnóstico clínico-radiológico de ONCF o artrosis de cadera (AC) (controles), y (2) indicación quirúrgica de artroplastia de cadera. Los criterios de exclusión incluyeron: (1) antecedentes de tratamiento sistémico con glucocorticoides y/o bifosfonatos, (2) consumo excesivo de alcohol en el pasado o en la actualidad, (3) antecedentes de traumatismo o radiación en la cadera, (4) antecedentes enfermedades por depósito, pancreatitis, hemoglobinopatías o disbarismos (ya que pretendíamos estudiar casos idiopáticos de ONCF, sin factor etiológico manifiesto). Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica de Cantabria (febrero 2018). Código de identificación 2018.014.

3.2 Aislamiento y cultivo de CMMs de médula ósea humana

Las CMMs humanas se aislaron a partir de especímenes de cabezas femorales siguiendo protocolos previamente descritos(230). Utilizando una trefina, se extrajeron cilindros óseos de la cabeza femoral. Tras la extracción, los cilindros óseos se lavaron con 35 ml de solución tampón fosfato salino (conocida como Phosphate-buffered saline solution, o PBS) tres veces seguidas, con ciclos de 30 segundos de agitación en vórtex cada vez. Tras dejar precipitar los huesos durante al menos 30 segundos, el PBS que contenía las células de los cilindros óseos se filtró con un colador celular de nailon de 0,7 μm (Ref. 431752, Corning Life Science, Glendale, Arizona, EE. UU.) en dos tubos tipo falcon limpios diferentes de 50 ml recuperando un volumen final de 100 ml de cada cabeza femoral. Los tubos se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5' a temperatura ambiente (TA). El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de PBS y se sometió a un gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, Cytiva, Marborough, MA, EE.UU.) pipeteando cuidadosamente las células resuspendidas en el fondo de un tubo de 15 ml que ya contenía la solución Lymphoprep. El gradiente se centrifugó durante 20' a 2.000 rpm y 4°C, con aceleración a velocidad media y sin frenos. Al finalizar la centrifugación debe ser visible una interfase conteniendo células mononucleares. Con una micropipeta de 1.000 μl se transfirió la interfase a un tubo de 50 ml que contenía 45 ml de PBS. A continuación, las células se centrifugaron durante 5' a 2.000 rpm a TA. Por último, el sedimento celular se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo, Mesenpro RS Media (Ref. 12746012, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), y se sembró en un frasco de cultivo de 25 cm^2 .

3.3 Diferenciación osteogénica y adipogénica.

El proceso de diferenciación hacia una estirpe ósea o adiposa se llevó a cabo mediante medios de cultivo específicos de diferenciación.

La diferenciación osteogénica se indujo con DMEM (10% FBS, 1% Pen/Strep) suplementado con 50 μM de ácido ascórbico, 10 mM de β - glicerofosfato y 0,1 μM de dexametasona. La diferenciación adipogénica, el medio de cultivo se sustituyó por medio adipogénico. Este fue DMEM (10% FBS, 1% Pen/Strep) suplementado con 1 μM de dexametasona, 2 μM de rosiglitazona (Ref. R2408, SigmaAldrich, Burlington, MA,

EE.UU.), 5 µg/ml de insulina (Ref. I26343, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE.UU.) y 0,5 mM 3- isobutil-1-metilxantina (Ref. I5879, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE.UU.).

Para plaquear las células de cara a su posterior diferenciación hacia los linajes osteogénico o adipogénico es necesario una estimación previa del número de células. Para realizar esto se desechó el medio de cultivo y las células se lavaron una vez con PBS antes de incubar las células 5' con TrypLE (Ref. 12604-013, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 37°C. La inactivación de TrypLE se realizó añadiendo 400ul de suero bovino fetal (FBS). Se contaron las células mediante tinción con azul Trypan al 0,4% (Ref. T10282, Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.), y se estimó el número de células vivas con una cámara de Neubauer.

Para la inducción de la diferenciación adipogénica se plaquearon 35.000 células/cm² en placas de 24 pocillos, mientras que para la diferenciación osteogénica se plaquearon 25.000 células/cm² por pocillo, también en placas de 24 pocillos. Las diferenciaciones comenzaron 24 horas tras plaquear dichas células simplemente sustituyendo el medio de cultivo habitual por los medios de diferenciación señalados anteriormente.

Durante el proceso de diferenciación, el medio se cambiaba cada 2-3 días desechando la mitad del volumen del pocillo (aproximadamente 500 µl) y sustituyéndolo por medio de diferenciación fresco. Los puntos finales de la diferenciación fueron diferentes en función de las características del experimento. Sin embargo, el procesamiento de las células en el punto final siempre se llevó a cabo de la misma manera. En la diferenciación osteogénica, de los 6 pocillos sembrados por condición: 2 pocillos se tiñeron con Rojo Alizarín, 2 se utilizaron para la extracción de ARN mensajero (ARNm) con el fin de cuantificar posteriormente la expresión génica y los dos últimos pocillos se utilizaron para la cuantificación de la actividad enzimática fosfatasa alcalina. La única diferencia entre la diferenciación osteogénica y la diferenciación adipogénica es que para esta última, se llevó a cabo una tinción de las células con Oil Red (Rojo Aceite) en lugar de la tinción con Rojo Alizarina.

3.4 Tinciones con Rojo Alizarina y Oil Red O

La tinción con Rojo Alizarina se utiliza para analizar el depósito de calcio en la matriz extracelular. Para realizar esta tinción, se desecha el medio del pocillo y se fijan las células con etanol al 70% a TA. Tras 1 h de incubación, se desecha el etanol y se lava el pocillo tres veces con agua destilada. Tras el lavado, se añaden 500 µl de solución de Rojo Alizarina (Ref. A5533, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE.UU.) a pH 4,2 a la placa y se deja actuar durante 15'. Nótese la importancia del pH del Rojo Alizarín, ya que las variaciones de pH afectarán notablemente a la tinción. Finalmente, se retira la tinción y se realizan tres lavados adicionales con agua destilada.

Por otro lado, para realizar la tinción con Rojo Aceite se descartó el medio y se lavaron las células dos veces con PBS. A continuación, se fijaron las células añadiendo formaldehído al 10% (Ref. ht501128, SigmaAldrich, Burlington, MA, EE.UU.), con una incubación inicial de 5 min, sustituyendo el formaldehído por formaldehído nuevo fresco al 10% e incubando de nuevo a TA durante 1 h. Tras la fijación, se lavaron las células una vez con isopropanol al 60% y se dejó secar la placa (sin tapa) durante al menos 10' a TA para permitir la evaporación del isopropanol. Una vez secos los pocillos, se añadió la solución de tinción Oil Red O (Ref. O0325, SigmaAldrich, Burlington, MA, EE.UU.) y se incubó durante 10' a TA. Transcurridos los 10', se desechó la solución de tinción y se lavaron los pocillos tres veces con agua destilada.

La cuantificación del Rojo Alizarín se realizó mediante una modificación de un método descrito anteriormente(231) tras capturar las imágenes de las placas. En resumen, se añadieron 200 μ l de ácido acético al 10% a cada pocillo y se incubaron a TA durante 30' con agitación. Tras la incubación, las células teñidas se separaron raspando el fondo de la placa y se transfirieron junto con el ácido acético al 10% a un tubo de 1,5 ml. A continuación, los tubos se agitaron en vórtex durante 30 segundos, seguido de un centrifugado para recoger los restos adheridos a las paredes del tubo. Los tubos se sellaron con parafilm y se calentaron a 85°C durante 10'. A continuación, los tubos se enfriaron en hielo durante al menos 5' antes de centrifugarlos 30' a 13.300 rpm a TA. Tras el centrifugado, se transfirieron 150 μ l del sobrenadante a un tubo nuevo y se añadieron 57 μ l de NaOH al 10% a cada tubo. Tras un mezclado final en vórtex y un centrifugado rápido, cada muestra se sembró en 2 pocillos de una placa de 96 pocillos, colocando 100 μ l por pocillo. Se midió la absorbancia a 405 nm. Es importante mantener la proporción entre el ácido acético y el hidróxido de amonio para obtener un rango de pH entre 4,1 y 4,5, de lo contrario el color de las muestras podría variar, afectando la absorbancia leída.

La cuantificación de Oil Red O también se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente(232). Antes de la tinción, se realizaron dos lavados adicionales con agua destilada. Después de los lavados, se añadieron 200 μ l de isopropanol al 100% a los pocillos. A continuación, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10' agitándolas suavemente. Transcurrido este tiempo se recuperó el isopropanol de los pocillos y se depositaron los 200 μ l en 2 pocillos de una placa de 96 pocillos (100 μ l por pocillo). La absorbancia de las muestras se leyó a 510 nm. Todas las lecturas de absorbancia de las placas se realizaron con un espectrofotómetro de microplacas Eon (BioTek, Winooski, VT, EE.UU).

3.5 Cuantificación de actividad fosfatasa alcalina

Para cuantificar la actividad de la fosfatasa alcalina (ALPL), se añadieron 200 μ l de Triton-X100 al 0,05% en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos, una vez eliminado el medio de cultivo y lavado el pocillo una vez con PBS. Tras la adición del Triton-X100, las células se incubaron durante 5' a TA para permitir la lisis celular. Tras esta incubación, se raspó el fondo del pocillo y los 200 μ l de Triton-X100 que contenían las células lisadas se recogieron en un tubo Eppendorf. Estos tubos se sonicaron durante tres ciclos, consistentes en 30 segundos de sonicación seguidos de 30 segundos de reposo, con las muestras sumergidas en agua helada. Durante la manipulación, las muestras se mantuvieron en hielo, antes de almacenarlas a -80°C hasta que se pudiera realizar la cuantificación de la actividad.

Para la cuantificación de la actividad ALPL, las muestras obtenidas como se ha descrito anteriormente se dejaron descongelar en hielo. En primer lugar, es necesario preparar una curva estándar de 4-nitrofenil butirato diluido en NaOH 0,5N, ya que éste es el producto final de la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina. El siguiente paso es la preparación del tampón AMP, que debe prepararse fresco. Para ello se debe diluir 1:10 de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP, Ref. A65182, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) en agua destilada y ajustar el pH a 10,4. Disolver 0,95 mg de $MgCl_2$ (Ref. M2670, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE.UU.) en 10 ml de agua destilada hasta obtener una solución 1M. Añadir 0,8 ml del $MgCl_2$ 1M disuelto por cada 20 ml de AMP preparado. El tampón AMP se mezcla 1:1 con 4-Nitrofenil fosfato, que se preparó fresco para cada cuantificación. 100 μ l de cada muestra se mezclaron con 300 μ l de la mezcla AMP/4-nitrofenil butirato. Se añaden 100 μ l a un pocillo de una placa de 96 pocillos. Esto se

hace por triplicado para tener tres lecturas diferentes de cada muestra. Tanto la placa como las muestras se mantienen en hielo hasta que se hayan colocado todas las muestras y pueda iniciarse la incubación. A continuación, la placa de 96 pocillos que contiene todas las muestras se incuba durante 60' a 37°C en la oscuridad, con agitación. Tras esta incubación, se añadieron 50 µl de NaOH 0,5 N a cada uno de los pocillos, excepto al de la curva estándar, para detener la actividad enzimática. Por último, se leyó la absorbancia de la placa a 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas Eon. La actividad ALPL se estima según la curva de calibración realizada con concentraciones crecientes de 4-nitrofenil butirato.

Dado que para cada muestra es necesario normalizar la actividad ALP frente a la concentración de proteínas, también se realizó la cuantificación proteica de las muestras. Para ello, se realizó una curva estándar con albúmina de suero bovino (ASB). Partiendo de una concentración de ASB de 10 mg/ml, se realizaron hasta ocho diluciones seriadas 1:2 hasta alcanzar una concentración de 0,039 mg/ml. También se utilizó agua destilada sin ASB en la curva estándar como punto inicial. Se transfirieron 100 µl de cada muestra (extracto celular en Triton-X100) a un nuevo tubo Eppendorf que contenía 300µl de PBS para hacer un total de 400 µl . De esta cantidad, se pipetearon 100µl hasta alcanzar una concentración de 0,039 mg/ml. De éstos, 100µl se pipetearon por triplicado en una placa de 96 pocillos.

La concentración de proteínas en cada una de las muestras se determinó con el ensayo de proteínas con ácido bicinonínico (BCA), que contiene el reactivo A y el reactivo B. Para preparar la solución de trabajo del kit añadimos 100 µl del reactivo B (Ref. 23224; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) por cada 5 ml del reactivo A (Ref. 23228, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) ambos reactivos se mezclaron y 50 µl de la mezcla se depositaron en cada pocillo que ya contenía 100 µl de la muestra con PBS. A continuación, la placa se incubó durante 30' en la oscuridad a 37°C con agitación. Tras la incubación, se leyó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de microplacas Eon.

3.6 Análisis de proliferación celular

Para estudiar la capacidad proliferativa de las CMMs de ONCF y sus controles se empleó un método colorimétrico basado en la utilización del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para estimar la actividad mitocondrial. La proliferación celular se infiere a partir de la coloración obtenida que es proporcional a dicha actividad mitocondrial. La técnica se basa en que aquellas células en estado proliferativo, con mayor actividad metabólica, convierten más MTT a formazán, obteniéndose así una coloración púrpura más intensa. La intensidad del color obtenido, proporcional a la actividad/proliferación celular, se mide espectrofotométricamente.

Para llevar a cabo el análisis de MTT se sembraron células en placas de 96 pocillos a 100, 200, 300 y 400 células por pocillo. Se sembraron cuatro pocillos para cada una de las concentraciones de densidad. Se dejó que las células se adhirieran a la placa durante la noche. Las placas se analizaron en los días 1, 3, 5, 7 y 9 tras la siembra. El día en que se realiza el análisis, el medio se sustituye por DMEM completo (DMEM más 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomocina) con 0,5 mg/ml de MTT (Ref. M5655, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE. UU.). Las células se incuban durante 4 horas a 37°C con esta mezcla. Tras esta incubación se desechó el medio por aspiración y se añadieron 100µl de 2-propanol a cada uno de los pocillos para disolver los cristales de formazán que se han formado y que son insolubles en agua . Se realizó

una incubación final a TA durante 10' en un agitador para facilitar esa solubilización. Por último, se midió la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro de microplacas Eon.

3.7 Extracción de ARN y retrotranscripción

Para la extracción del ARN, tras un lavado inicial de los pocillos con PBS, se recogen las células en TRIzol (Ref. 15596018, Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.), una solución monofásica que contiene fenol y guanidina tiocianato. El fenol desnaturaliza las proteínas, mientras que la guanidina tiocianato inhibe la actividad de las nucleasas, preservando así el ARN. Una vez adicionado el Trizol a la muestra el fondo de la placa se raspa para favorecer la recogida de todo el material celular y se pasa este líquido a un tubo Eppendorf para llevar a cabo la extracción del ARNm. La extracción de ARNm se realizó con 0,2 ml de cloroformo por ml de TRIzol. El cloroformo se añade al tubo que contiene el TRIzol y la mezcla se agita a mano durante 15". Después se deja reposar el tubo durante 3" hasta que se separan las dos fases y se agita de nuevo durante otros 15". A continuación, se centrifugan los tubos para separar la fase acuosa superior que contiene el ARNm. Las muestras se centrifugaron a 13.300 rpm durante 15' a 4°C. La fase acuosa superior se transfirió entonces a un nuevo tubo de 1,5 ml, y el ARN se precipitó mezclando la fase acuosa 1:1 con isopropanol al 100%, agitando suavemente a mano hasta que ambas fases se mezclaron. Se realizó una incubación de 30' a -80°C para mejorar la precipitación. Tras esta incubación, las muestras se centrifugaron durante 10' a 13.300 rpm a 4°C para recuperar el ARNm. Se descartó el sobrenadante, y el pellet se lavó una vez con etanol al 70% diluido en agua libre de nucleasas (tratada con DEPC), agitando en vórtex y centrifugando 5' a 7.500 rpm a 4°C. Se desechó de nuevo el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante aproximadamente 5' a 55°C. A continuación, se añadió agua libre de nucleasas precalentada a 55 °C a cada tubo, y las muestras se incubaron durante 5' a 55 °C para mejorar la disolución del ARNm. La cuantificación del ARNm se realizó siempre justo antes del protocolo de retrotranscripción mediante análisis espectrofotométrico con un espectrofotómetro DeNovix DS-11 (DeNovix, Wilmington, DE, EE.UU.).

3.8 Análisis de expresión génica por PCR en tiempo real

La retrotranscripción de ARNm se realizó con el kit PrimeScript RT (Ref. RR037A, Takara Bio Inc, Shiga, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para esto, de forma habitual se utilizaron aproximadamente 500 ng de ARNm por muestra que se llevó a un volumen final de 5 µl con agua libre de nucleasas en un tubo de 200 µl. El protocolo de PCR (polymerase chain reaction) para la transcripción inversa consistió en un primer ciclo de 15' a 37°C para que tuviera lugar la transcripción inversa, seguido de la inactivación de la enzima con un pulso de 5" a 85°C y un enfriamiento final a 4°C. Una vez realizada la retrotranscripción, se añadieron 10 µl adicionales de agua libre de nucleasas a cada muestra para obtener un volumen final de 20 µl y el ADN complementario (ADNc) sintetizado se almacenó a -20°C.

Para medir los niveles de expresión génica se realizó una PCR en tiempo real utilizando ensayos TaqMan específicos para cada uno de los genes (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE.UU.). Para ello, se utilizó TaqMan Universal PCR Master Mix (Ref. 4324018, Applied Biosystems) en conjunción con una mezcla TaqMan que lleva una sonda marcada y una pareja de oligonucleótidos específicos para la amplificación del ARNm diana. Cada pocillo de la placa de PCR tenía 4,5 µl de la mezcla

de ADN que contenía 1 µl de ADNc y 3,5 µl de agua libre de nucleasas, por pocillo. También se preparó una mezcla diferente para cada gen. La mezcla de la sonda contenía 5 µl de la Master Mix y 0,5 µl de la mezcla TaqMan dada. Se añadieron 5,5 µl de la mezcla de sonda a cada uno de los pocillos que ya contenían 4,5 µl de la mezcla de ADNc. Esto se hizo por triplicado para cada una de las muestras. La PCR se realizó con un sistema rápido de PCR en tiempo real 7500 de Applied Biosystems, utilizando un ciclo estándar de 10' a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1' a 60°C.

Para evaluar la diferenciación osteogénica y adipogénica se utilizaron sondas TaqMan para RUNX2, ALP, BGLAP y COL1A1, de acuerdo a cómo se ha descrito previamente(230).

Para el análisis cuantitativo PCRs, los ciclos umbral se determinaron por defecto. La expresión de los genes de interés se normalizó utilizando el método comparativo común $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak y Schmittgen(233).

3.9 Análisis radiológico

Nuestra población de estudio fue diagnosticada por cirujanos ortopédicos, radiólogos y patólogos experimentados. Los cirujanos ortopédicos diagnosticaron a los pacientes según los signos y síntomas, los estudios de imagen y la evaluación macroscópica de las muestras de cabeza femoral obtenidas en el quirófano. Las radiografías simples y/o las imágenes de RM fueron informadas por radiólogos generales y musculoesqueléticos. Se utilizó el sistema de estadificación radiográfica de Ficat y Arlet.

Como técnica de radiología simple se empleó la proyección AP (anteroposterior) de cadera. Esta proyección ayuda a visualizar posibles fracturas, luxaciones, lesiones óseas o enfermedades degenerativas de la articulación de la cadera. La posición del paciente es supina, los miembros inferiores están rotados internamente 15-25° desde la cadera. Esta proyección anteroposterior tiene su punto de centrado 2,5 cm distal a una línea bisectriz desde la espina ilíaca anterosuperior a la sínfisis púbica. La colimación se realiza lateralmente a los márgenes cutáneos, superior a la espina ilíaca anterosuperior e inferior al tercio proximal del fémur. El tamaño del detector suele ser de 24 cm x 30 cm, con una exposición de 70-80 kVp. En esta proyección, la totalidad de la cadera y el fémur proximal se ven en la imagen con el eje largo del fémur paralelo al eje largo de la imagen. El trocánter mayor debe verse de perfil, lo que indica una rotación interna adecuada de la extremidad(234).

En la resonancia magnética (RM), el paciente se sitúa en un gran campo magnético. Los protones del cuerpo se alinean con el campo magnético. Una corriente de radiofrecuencia externa atraviesa al paciente y estimula los protones, provocando su desequilibrio. Una vez que se interrumpe la corriente de radiofrecuencia externa, los protones liberan energía. Los sensores detectan la energía liberada por los protones y el tiempo que tardan en volver al equilibrio. La transformación de Fourier se utiliza para convertir los datos de los sensores en cada posición en tiempo de relajación de los datos de la imagen. El tiempo necesario para que los protones se alineen con el campo magnético externo corresponde a los conocidos "T1" y "T2": T1 muestra los tejidos con alto contenido en grasa como brillantes, el T2 muestra los tejidos con alto contenido en agua como brillantes. La RM de cadera permite identificar hueso, cartílago y labrum, tendones, ligamentos, bursas y cápsula articular, vasos sanguíneos, grasa y músculos.

En la evaluación estándar de la cadera el paciente se coloca con las caderas con 15° de rotación interna, abarcándose desde las articulaciones sacroilíacas hasta la sínfisis púbica(235). Nuestros pacientes fueron evaluados mediante protocolos habituales de cadera de RM, como los que se resumen en la tabla 1.

Parámetro	FOV (max)	Corte (max)	TE	TR	Matriz (min)
Cor STIR	38-40 cm	6 mm	40-60	1800	256 × 256
Cor T1	16 cm	3.5 mm	min	400	256 × 256
Cor PD/T2 FS	16 cm	3.5 mm	40-100	2000	256 × 256
Sag PD/T2 FS	16 cm	3.5 mm	40-60	2000	256 × 256
Ax-oblicua PD FS	16 cm	3.5 mm	40-60	2000	256 × 256

Tabla 1. Protocolo estándar de resonancia magnética de cadera, adaptado de las guías de la Sociedad Europea de Radiología Musculoesquelética. Adaptada de: Mak MS, Teh J. *Magnetic resonance imaging of the hip: anatomy and pathology. Pol J Radiol. 2020 Sep 4;85:e489-e508(235)*. FOV: field of view (campo), FS: fat-saturated (saturación grasa), STIR: short-tau inversion recovery, PD: proton density (densidad protónica). En el análisis radiológico del presente trabajo se estudió en radiografía simple: la fiabilidad diagnóstica para la detección de signos radiológicos característicos de la ONCF, la fiabilidad diagnóstica para la estadificación de la ONCF y la consistencia del diagnóstico entre distintos especialistas.

La evaluación de la fiabilidad diagnóstica de los signos radiológicos característicos y de la estadificación se analizó de forma retrospectiva. Ocho observadores, radiólogos o cirujanos ortopédicos, analizaron las radiografías de veintiocho pacientes con ONCF idiopática sometidos a artroplastia de cadera. El diagnóstico de ONCF se había confirmado previamente mediante RM y/o histopatología (tabla 2). Se excluyeron los casos que carecían de un informe radiológico certificado o que presentaban una calidad histológica deficiente. La muestra del estudio se determinó siguiendo las pautas de otros estudios en esta línea realizados en el campo de la osteonecrosis(236). Se pidió a los observadores que identificaran en radiografías AP de cadera la presencia o ausencia de las características radiológicas de ONCF universalmente descritas (23) (osteopenia, borramiento de las trabéculas óseas, zonas parcheadas de lucencia y esclerosis, signo de la media luna, aplanamiento de la cabeza femoral o ensanchamiento del espacio articular y cambios secundarios de enfermedad articular degenerativa). Además, se pidió a los observadores que estadificaran la enfermedad de acuerdo con el sistema propuesto por Ficat y Arlet.

Parámetro	Valor
Edad (años; media ± DE)	66,46 ± 11,07
Sexo (varones vs. mujeres)	12 vs. 16
Diagnóstico confirmado por RM	11
Diagnóstico confirmado por histología	17
Diagnóstico confirmado por RM e histología	4
Estadio Ficat y Arlet (media ± DE)	3,63 ± 0,67
Lado (derecho vs. izquierdo)	18 vs. 10

Tabla 2. Información de los pacientes empleados en el estudio de la fiabilidad radiológica.

3.11 Análisis histológico

Con el fin de garantizar el adecuado diagnóstico de las muestras obtenidas se procedió al análisis histológico de estas, de acuerdo con los criterios y protocolos establecidos en la literatura(194). Dicho análisis se llevó a cabo con la ayuda del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. El protocolo llevado a cabo fue el siguiente: de las cabezas femorales obtenidas en el quirófano de Ortopedia se realizó una selección basada en criterios clínicos y radiológicos que permitiese el estudio de aquellos casos (ONCF) y controles (AC) más representativos. De la misma forma, se llevó a cabo otra pequeña selección de aquellas muestras de diagnóstico dudoso (discrepancias entre pruebas o profesionales, falta de pruebas, evolución atípica, etc). De cada cabeza femoral se remitieron para su estudio anatomopatológico varios cilindros de hueso macroscópicamente afecto, tanto cortical como esponjoso.

De acuerdo con el protocolo habitual de tratamiento para el estudio de osteonecrosis, las muestras obtenidas a partir de las cabezas femorales mediante el uso de una trefina se congelaron de inmediato a -80°C para su posterior análisis. Para preparar estas muestras para su análisis histológico, los cilindros de hueso se colocaron inmediatamente en formalina tamponada neutra al 10%, a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente se decalcificaron en ácido etilendiaminotetraacético al 10% a temperatura ambiente siguiendo los procedimientos estándar. Las muestras decalcificadas se embebieron en parafina (Cellwax Plus paraffin blocks (Ref. GCA-0400-00A, CellPath, Powys, United Kingdom) y se cortaron secciones de parafina (de 4 mm de grosor) utilizando métodos convencionales (237). Antes de realizar las técnicas histológicas, se desparafinaron las secciones de tejido. La desparafinación se realizó calentando los portaobjetos a 55°C durante al menos 20', y a continuación se rehidrataron con lavados en xileno (Ref. 534056, Honeywell, Bracknell, Reino Unido) y lavados consecutivos en concentraciones decrecientes de etanol. Se emplearon las tinciones de hematoxilina y eosina de Mayer y tricrómico de Masson.

La tinción con Hematoxilina se realizó con una inmersión de 8' de los portaobjetos en un vaso de precipitados con la solución de tinción Harris Hematoxylin for Histology (Ref. 10-2331, Casa Álvarez, Madrid, España). A continuación, las muestras se lavaron mediante 4 inmersiones en alcohol ácido al 3%, seguidas de una incubación en agua corriente templada durante 4'. Justo antes de la tinción con Eosina, los portaobjetos se sacaron del agua corriente y se lavaron durante 1' en etanol al 95%. A continuación, se sumergieron en un vaso de precipitados con solución de tinción de Eosina Alcohólica al 1% (Ref. 10-3051, Casa Álvarez, Madrid, España), tras lo cual se deshidrataron.

La tinción tricrómica de Masson-Goldner comenzó con la desparafinación e hidratación de las muestras. A continuación, las muestras se incubaron durante toda la noche con solución de Bouin. Al día siguiente, las muestras se lavaron durante 5' con agua corriente, seguido de un lavado de 1' con agua destilada. A continuación, las muestras se tiñeron con solución de hematoxilina férrica Wiegert durante 10'. Tras la tinción, las muestras se lavaron de nuevo, 5' con agua corriente + 1' con agua destilada. A continuación, las muestras se tiñeron durante 2' con tinción de fucsina ácida escarlata de Biebrich (PanReac AppliChem, Barcelona, España), 2' con ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y 5' en azul de anilina (PanReac AppliChem, Barcelona, España). A continuación, los portaobjetos se lavaron 1' en agua destilada y se incubaron durante 4' en ácido acético al 1%. A continuación, las muestras se deshidrataron, enjuagaron y montaron.

3.12 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, EE.UU.). Se consideró estadísticamente significativo un umbral de probabilidad del valor P inferior a 0,05.

La comparación estadística se realizó mediante el análisis de chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher para los datos categóricos, la prueba t de Student para la comparación de medias (para variables distribuidas normalmente), el coeficiente de Spearman para la correlación de rangos, la prueba U de Mann-Whitney para comparar dos muestras relacionadas (para variables distribuidas no normalmente) y el coeficiente kappa de Cohen para la fiabilidad entre observadores e intraobservadores.

La fiabilidad de la concordancia entre observadores se evaluó mediante el coeficiente Kappa de Fleiss para las variables categóricas y el coeficiente de concordancia de Kendall para las variables ordinales.

4 RESULTADOS

4.1 Evaluación de comorbilidades y demografía de nuestros pacientes

Los resultados demográficos y epidemiológicos obtenidos en este estudio proporcionan una visión detallada de la población de pacientes sometidos a artroplastia de cadera debido a osteonecrosis de cabeza femoral (ONCF) y artrosis de cadera (AC) en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre los años 2017 y 2020. La muestra estudiada, compuesta por 60 pacientes, exhibió una distribución esperable en cuanto al sexo, con 38 hombres y 22 mujeres, con una edad media de 65,88 años ($\pm 12,6$) presentaron las comorbilidades resumidas en la tabla 1. A partir de los datos de estos pacientes que actuaron como donantes de las muestras utilizadas en el estudio se llevó a cabo un análisis de los factores de riesgo asociados con las osteonecrosis. Los datos reflejados en la tabla evidencian la prevalencia de ciertos factores de riesgo, ofreciendo una perspectiva integral sobre las diferentes condiciones que pueden favorecer esta patología ósea y que se han discutido en la introducción de esta memoria.

Comorbidad	Porcentaje de la muestra
Sobrepeso/obesidad	61%
Fumador	53%
Hipertensión	50%
Dislipemia	34%
Artroplastia en la cadera contralateral	19%
Diabetes mellitus	15%
Hiperuricemia	7%

Tabla 1. Comorbilidades de los pacientes incluidos en la muestra de estudio.

Los factores de riesgo con mayor prevalencia en la muestra son el sobrepeso y la obesidad, afectando al 52% de los pacientes. Este hallazgo es significativo ya que el exceso de peso puede incrementar la presión sobre las articulaciones y afectar adversamente el flujo sanguíneo en los huesos, condiciones que pueden predisponer a la osteonecrosis.

Otro factor con igual prevalencia es el hábito de fumar, presente también en el 52% de los pacientes. Fumar se asocia con alteraciones en la microcirculación ósea y puede contribuir al desarrollo de osteonecrosis al disminuir el flujo sanguíneo necesario para la salud ósea.

La dislipemia, afectando al 36% de los pacientes, es otro factor importante. Este trastorno implica niveles anormales de lípidos en sangre que pueden llevar a complicaciones vasculares, incluyendo la formación de trombos, los cuales podrían bloquear los vasos que suministran sangre al hueso, precipitando la osteonecrosis.

La hipertensión arterial se encuentra en el 31% de los pacientes y es conocida por su potencial para afectar la circulación general, incluyendo la del suministro sanguíneo a los huesos, lo cual puede estar implicado en la patogénesis de la osteonecrosis.

Además, un 21% de los pacientes ha tenido artroplastia previa, factor que se puede considerar como contribuyente al riesgo de desarrollar osteonecrosis.

En menor medida, la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, presentes en el 15% de los pacientes, y la hiperuricemia, presente en el 10%, también se enumeran como factores de riesgo. La diabetes y los altos niveles de ácido úrico pueden alterar la circulación y el metabolismo óseo, facilitando el desarrollo de osteonecrosis.

4.2 Diagnóstico general de la ONCF.

El diagnóstico de la Osteonecrosis de Cabeza Femoral (ONCF) representa un desafío clínico significativo, especialmente durante las etapas tempranas de la enfermedad. Actualmente, el diagnóstico de la ONCF se realiza combinando la exploración y anamnesis clínicas con el diagnóstico por imagen. En este proceso intervienen con frecuencia varios especialistas.

4.2.1 Concordancia diagnóstica entre especialistas.

El análisis de la consistencia diagnóstica entre especialistas se llevó a cabo comparando el diagnóstico emitido por cirujanos ortopédicos, radiólogos y patólogos. Para este fin se empleó una muestra de veinticuatro pacientes, compuestas por doce casos de Osteonecrosis de Cabeza Femoral (ONCF) y doce controles con Artrosis de Cadera (AC). Estos casos fueron seleccionados de una población inicial de 60 pacientes, en base a criterios que incluyeron tener una prueba radiológica con informe emitido por radiólogo y presentar una calidad del espécimen suficiente para realizar un óptimo estudio histológico

La comparación de los diagnósticos emitidos por cirujanos ortopédicos, radiólogos y patólogos reveló una concordancia moderada entre los diagnósticos de los primeros dos grupos de especialistas. Específicamente, veintiuno de los veinticuatro diagnósticos coincidieron entre radiólogos y cirujanos ortopédicos (Coeficiente de kappa (k) = 0,58; porcentaje de concordancia del 85,71%), lo que expresa una concordancia moderada (Tabla 2).

El examen histológico de las muestras de cabeza femoral recogidas confirmó el diagnóstico radiológico en veinte de las veinticuatro caderas analizadas, lo que corresponde a un 84%. En cuanto a las muestras con diagnóstico de ONCF que cumplían nuestros criterios de selección, sólo uno de los doce casos con diagnóstico radiológico de ONCF (8%) no fue confirmado por el análisis anatomopatológico. mientras que tres de las doce muestras con diagnóstico radiológico de artrosis de cadera (AC), que representaban un 25% de las muestras analizadas de AC, cumplían los criterios de diagnóstico histológico de ONCF (Tabla 2), por lo tanto, se observaron discrepancias en los diagnósticos emitidos por los patólogos en comparación con los otros especialistas.

La fiabilidad del diagnóstico interobservador no difirió significativamente entre los distintos estadios de Ficat y Arlet.

Este análisis de concordancia diagnóstica entre especialistas se resume en la Tabla 2, que muestra el diagnóstico dado por cada uno de los especialistas para cada una de las muestras analizadas, así como las discrepancias observadas.

Muestra	Cirujano pre-cirugía	Cirujano post-cirugía	Radiólogo	Patólogo	Discrepancia
1 (CASO)	ONCF	ONCF	ONCF	ONCF	NO
2 (CASO)	ONCF	ONCF	ONCF	ONCF	NO
3 (CASO)	ONCF	ONCF	AC	ONCF	Radiólogo vs resto
4 (CASO)	ONCF	ONCF	ONCF	ONCF	NO
5 (CASO)	ONCF	ONCF	ONCF	ONCF	NO
6 (CASO)	ONCF	ONCF	ONCF	ONCF	NO
7 (CASO)	ONCF	ONCF	ONCF	ONCF	NO
8 (CASO)	AC	AC	AC	ONCF	Patólogo vs resto
9 (CASO)	AC	AC	AC	ONCF	Patólogo vs resto
10 (CASO)	AC	AC	ONCF	ONCF	Cirujano vs resto
11 (CASO)	ONCF	ONCF	ONCF	ONCF	NO
12 (CASO)	ONCF	ONCF	ONCF	ONCF	NO
13 (CONTROL)	AC	AC	AC	ONCF	Patólogo vs resto
14 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO
15 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO
16 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO
17 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO
18 (CONTROL)	AC	AC	AC	ONCF	Patólogo vs resto
19 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO
20 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO
21 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO
22 (CONTROL)	AC	ONCF	AC	AC	Cirujano vs resto
23 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO
24 (CONTROL)	AC	AC	AC	AC	NO

Tabla 2. Concordancia diagnóstica entre especialistas. De las sesenta cabezas femorales inicialmente recogidas, sólo veinticuatro cumplieron nuestros criterios de selección, doce con diagnóstico previo de ONCF y doce controles con diagnóstico de artrosis de cadera (AC). La tabla ilustra el diagnóstico de cada muestra según diferentes especialistas: cirujanos ortopédicos, radiólogos y patólogos

4.2.2 Concordancia pre y post quirúrgica.

En el análisis de la concordancia pre y post quirúrgica realizado con los diagnósticos emitidos por los cirujanos ortopédicos, se observó un alto grado de consistencia. En el caso de los cirujanos ortopédicos, el porcentaje de concordancia entre el diagnóstico preoperatorio y el postoperatorio fue del 91,67% lo que indica una elevada coherencia en la evaluación de las condiciones ortopédicas antes y después de la intervención quirúrgica. Este hallazgo se ve respaldado por un valor kappa de reproducibilidad intraobservador de 0,75, que sugiere una concordancia sustancial entre los diagnósticos pre y postoperatorios. (Tabla 2).

4.3 Diagnóstico radiológico de la ONCF.

En el presente estudio, postulamos la hipótesis de que la radiología convencional presenta limitaciones tanto en la detección de signos radiológicos característicos de la ONCF como en la consistencia del diagnóstico entre distintos especialistas. Para la evaluación de la fiabilidad diagnóstica de los signos radiológicos característicos en la ONCF se pidió a ocho observadores, radiólogos o cirujanos ortopédicos, que identificaran en veintiocho radiografías AP de cadera la presencia o ausencia de dichos signos: osteopenia, borramiento de las trabéculas óseas, zonas parcheadas de lucencia y esclerosis, signo de la media luna, aplanamiento de la cabeza femoral o ensanchamiento del espacio articular y cambios secundarios de enfermedad articular degenerativa). Además, se pidió a los observadores que estadificaran la enfermedad de acuerdo con el sistema propuesto por Ficat y Arlet.

4.3.1 Signos radiológicos característicos de la ONCF.

El análisis de la tabla proporcionada (tabla 3) refleja resultados del coeficiente Kappa de Fleiss, utilizado para evaluar la fiabilidad en la identificación de diversas características de imagen asociadas con la osteonecrosis. La kappa de Fleiss es una medida estadística para evaluar la fiabilidad del acuerdo entre un número fijo de evaluadores a la hora de asignar valoraciones categóricas a una serie de elementos o para clasificar elementos.

La mayoría de las categorías evaluadas muestran un Kappa negativo, indicando un desacuerdo sustancial entre los evaluadores, con calificaciones generalmente categorizadas como 'Pobre'. Esto sugiere que, para características como osteoporosis global, pérdida de trabeculación y el signo de la media luna, hay un bajo nivel de consistencia entre las evaluaciones de diferentes profesionales, lo cual podría indicar una necesidad de revisar los criterios diagnósticos o mejorar la formación específica en la identificación de estas características. Sin embargo, hay variaciones notables en la concordancia cuando se observan atributos específicos, como 'Esclerosis' y 'Aplanamiento', donde algunos valores de Kappa indican un grado de concordancia que va de 'Ligero' a 'Bueno'. Esto podría reflejar una mayor claridad en los signos visuales de estas condiciones o una mayor familiaridad y acuerdo en su identificación entre los evaluadores.

El coeficiente Kappa también muestra una diferencia notable entre evaluadores de diferentes especialidades, con radiólogos y cirujanos a veces mostrando diferencias significativas en sus evaluaciones, lo que resalta la diversidad en la interpretación diagnóstica basada en la formación y experiencia clínica. Este análisis proporciona una base para futuras investigaciones sobre cómo mejorar la precisión y la concordancia en la evaluación radiológica de la osteonecrosis.

	Kappa	valor p	IC Inferior*	IC Superior*	Grado de concordancia†
Osteoporosis global	-0,056	0,124	-0,127	0,015	Pobre
Osteoporosis radiólogos	-0,054	0,279	-0,151	0,044	Pobre
Osteoporosis cirujanos	-0,448	0,018	-0,818	-0,077	Pobre
Pérdida de trabeculación global	-0,071	0,051	-0,142	0,000	Pobre
Pérdida de trabeculación radiólogos	-0,076	0,125	-0,174	0,021	Pobre
Pérdida de trabeculación cirujanos	-0,333	0,078	-0,704	0,037	Pobre
Esclerosis global	0,111	0,002	0,040	0,182	Ligero
Esclerosis radiólogos	0,026	0,599	-0,071	0,124	Ligero
Esclerosis cirujanos	0,253	0,180	-0,117	0,624	Bueno
Signo de la media luna global	-0,044	0,227	-0,115	0,027	Pobre
Signo de la media luna radiólogos	-0,092	0,064	-0,189	0,005	Pobre
Signo de la media luna cirujanos	-0,217	0,250	-0,588	0,153	Pobre
Aplanamiento global	0,345	0,000	0,274	0,417	Bueno
Aplanamiento radiólogos	0,455	0,000	0,357	0,552	Moderado
Aplanamiento cirujanos	-0,149	0,431	-0,519	0,222	Pobre
AC global	0,430	0,000	0,359	0,502	Moderado
AC radiólogos	0,396	0,000	0,298	0,493	Bueno
AC cirujanos	0,578	0,002	0,207	0,948	Moderado

Tabla 3. Resultados del análisis kappa de Fleiss para la fiabilidad en la identificación de las características de imagen. *: Límites superior e inferior del intervalo de confianza asintótico del 95%. †: Nivel de concordancia entre evaluadores sugerido para la interpretación(238).

Sólo la identificación del aplanamiento de la cabeza femoral y los signos de artrosis mostraron una concordancia moderada con significación estadística. Por otra parte, la detección de la osteoporosis radiológica y de la pérdida de trabeculación mostró la fiabilidad más baja, con coeficientes kappa incluso negativos (tabla 3).

4.3.2 Estadificación radiológica de la ONCF.

Para valorar la fiabilidad interobservador en la estadificación de la ONCF mediante radiografías simples se empleó el coeficiente de concordancia W de Kendall, un estadístico no paramétrico para la correlación de clasificaciones. Esta prueba es una normalización del test de Friedman y puede utilizarse para evaluar la concordancia entre evaluadores y, en particular, la fiabilidad interevaluadores. La W de Kendall reveló un grado de acuerdo importante y estadísticamente significativo entre todos los calificadores, especialmente entre los traumatólogos, calificándose de acuerdo con la literatura como “considerable” o “casi perfecto” (tabla 4). Estos resultados corroboran la fiabilidad entre observadores a la hora de estadificar la ONCF mediante radiografías empleando la clasificación de Ficat y Arlet.

	W de Kendall	Valor P	Grado de concordancia [†]
Concordancia global para la estadificación Ficat	0,675	0,000	Considerable
Concordancia radiólogos para la estadificación Ficat	0,684	0,000	Considerable
Concordancia cirujanos para la estadificación Ficat	0,883	0,008	Casi perfecto

Tabla 4. Coeficiente de concordancia de la W de Kendall para la coincidencia en la estadificación de la clasificación de Ficat y Arlet. *: Límites superior e inferior del intervalo de confianza asintótico del 95%. †: Nivel de concordancia entre evaluadores sugerido para la interpretación(238)

4.4 Diagnóstico histológico de la ONCF.

La biopsia ósea y su posterior análisis histológico constituyen el referente diagnóstico de oro en la ONCF; sin embargo, este procedimiento no se emplea de manera rutinaria debido a su naturaleza invasiva. En el diagnóstico anatomopatológico de la ONCF, la presencia de lagunas osteocíticas vacías se erige como el indicador diagnóstico crucial (figura 1). En la presente investigación, partimos de la hipótesis de que existe una correlación significativa entre la densidad de lagunas osteocíticas desocupadas y el estadio clínico de la enfermedad.

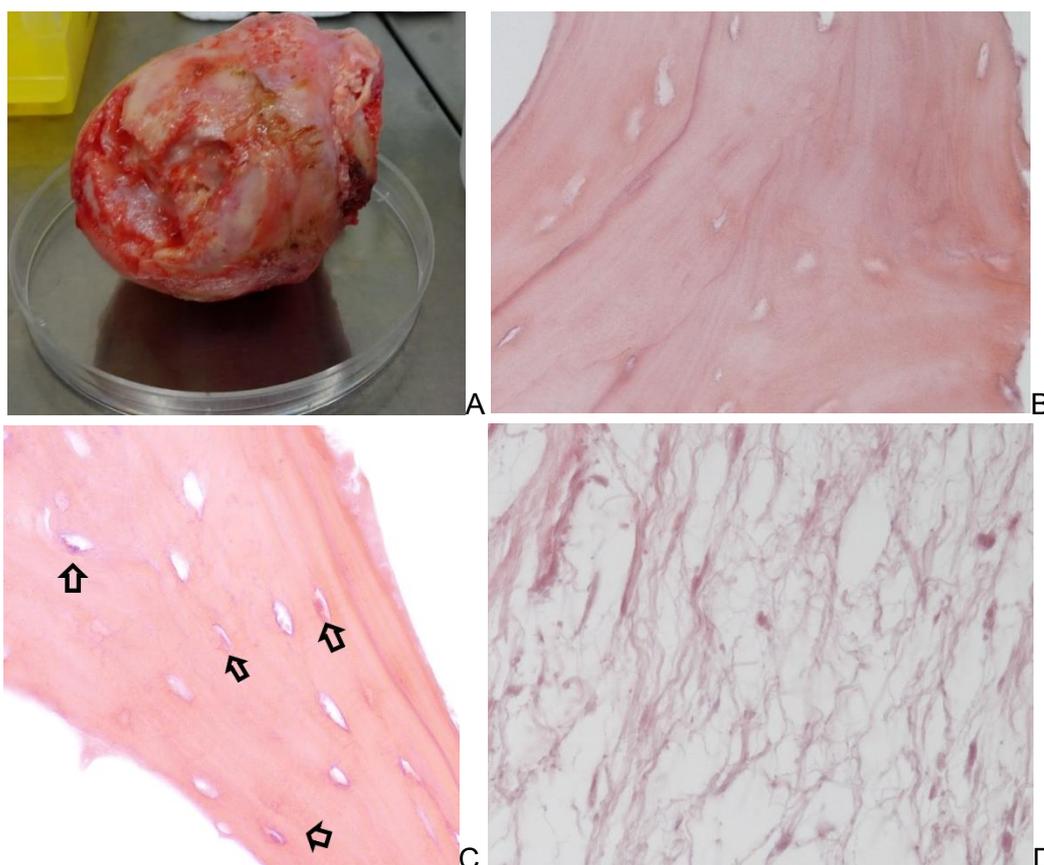


Figura 1. A) Especimen macroscópico de osteonecrosis avanzada de cabeza femoral, con artrosis asociada, que muestra pérdida completa de la superficie articular y colapso de la región central de la cabeza. (B) Sección teñida con hematoxilina y eosina que muestra lagunas vacías en muestras de ONCF (20×). (C) Trabéculas de osteoartritis (grupo de control) que muestran

lagunas que contienen osteocitos viables (flechas) (20×). (D) Sección teñida con hematoxilina y eosina que muestra fibrosis medular densa en muestras óseas de ONCF (20×).

El criterio empleado para el diagnóstico histológico de osteonecrosis fue la presencia de al menos un 50% de lagunas vacías (sin clara presencia de osteocitos en su interior), de forma difusa y en diferentes trabéculas, contando un mínimo de 300 lagunas. Además, se valoraron otros signos degenerativos como la infiltración grasa de la médula ósea o el grado de fibrosis (graduados de forma cualitativa con “+”, “++” ó “+++”) y la presencia de calcificación heterotópica.

4.4.1 Necrosis histológica en la ONCF.

La necrosis ósea histológica se valora mediante la presencia de lagunas osteocíticas desprovistas de osteocito. En nuestras muestras, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el número de lagunas osteocíticas vacías ($t = 5,13$; $p < 0,05$) entre el grupo ONCF (media \pm S = $68,16 \pm 10,57$) y el grupo de control AC (media \pm S = $40,91 \pm 15,03$) (tabla 5), confirmándose los casos y los controles de forma anatomopatológica, y replicándose los hallazgos de la evidencia descrita en la literatura.

En relación con nuestra hipótesis de que podría existir una correlación entre la presencia de lagunas osteocíticas vacías y el estadio clínico de la enfermedad, pudiendo correlacionarse con el estadio de la ONCF, comparamos el número de lagunas osteocíticas vacías y la estadificación de Ficat y Arlet (tabla 5). Tal y como se presenta en la tabla 5, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de lagunas osteocíticas sin osteocito y el estadio ONCF según la clasificación de Ficat y Arlet. Esta ausencia de diferencia podría deberse al limitado número de muestras empleadas. Esta relación histológica-clínica, no estudiada hasta el momento en la literatura, precisa de estudios con mayor potencia.

Estadio Ficat y Arlet	Nº de muestras	Lagunas osteocíticas vacías (%)
I	2	63
II	1	80
III	3	73
IV	6	65

Tabla 5. Datos que comparan el estadio por imagen según Ficat y Arlet con el número medio de lagunas osteocíticas vacías en nuestras muestras de ONCF.

4.4.2 Signos degenerativos histológicos en la ONCF.

Como parte de la caracterización anatomopatológica de nuestra muestra se analizaron signos inespecíficos histológicos de degeneración tisular: fibrosis, calcificaciones heterotópicas, e infiltración grasa. Los hallazgos se valoraron de forma cualitativa (tabla 6).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($U = 35$; $p < 0,05$) en la presencia de fibrosis medular entre el grupo ONCF (media \pm S = $2,75 \pm 1,21$) y el grupo de control AC (media \pm S = $1,66 \pm 0,98$) (tabla 6). A este fenómeno se alude con frecuencia en los textos que explican la fisiopatología de la enfermedad, especialmente en sus fases avanzadas, así como en los estudios mediante RM de la ONCF, sin embargo, no se ha analizado en profundidad en los trabajos de anatomopatología de la ONCF.

El análisis anatomopatológico de otros signos degenerativos, como la infiltración grasa y la osificación heterotópica, no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos analizados (tabla 6). A este respecto, cabe destacar la escasa evidencia presente en la literatura en relación con los cambios degenerativos óseos en la AC, concentrándose la mayor parte de la información disponible en los cambios que tienen lugar a nivel condral y subcondral.

	ONCF	CONTROL	Valor p
	(media \pm S)	(media \pm S)	Diferencia intergrupala
Edad (años)	65,88 \pm 12,6	63,84 \pm 10,9	0,262991
Lagunas osteocíticas vacías (%)	68,16 \pm 10,57	40,91 \pm 15,03	0,000019
Infiltración grasa (1-4)*	3,5 \pm 0,9	2,83 \pm 0,83	0,08914
Fibrosis medular (1-4)*	2,75 \pm 1,21	1,66 \pm 0,98	0,03486
Osificación heterotópica (%)†	25 \pm 0,45	25 \pm 0,45	1

Tabla 6. Datos del análisis histológico de las muestras de cabeza femoral. *: "1-ausencia", "2-presencia", "3-moderada" y "4-intensa". †: presencia significativa sí/no.

4.5 Fisiopatología de la ONCF: Integración entre Diagnóstico y Biología Celular

Las herramientas de diagnóstico radiológico e histopatológico desempeñan un papel fundamental en la identificación de la ONCF, pero resulta igualmente crucial entender los mecanismos biológicos subyacentes que perpetúan el daño. En este contexto, las células madre mesenquimales (CMMs) tienen un papel clave en la regeneración y la homeostasis del tejido óseo. Existe evidencia que sugiere la presencia de disfunciones en las CMMs de la médula ósea de pacientes afectados por ONCF, las cuales comprometerían su capacidad intrínseca de reparar el daño subyacente a esta enfermedad. Estas alteraciones podrían incluir cambios en la capacidad proliferativa de dichas células, o en su capacidad de diferenciación adipogénica u osteogénica, capacidades que en situaciones no patológicas están perfectamente balanceadas. Alteraciones en estos procesos podrían explicar la incapacidad de restaurar la integridad del hueso afectado en ONCF.

Con el fin de estudiar esta hipótesis, entre febrero de 2018 y junio de 2020 se recogieron un total de sesenta especímenes de cabeza femoral de pacientes intervenidos de artroplastia de cadera en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. De esas sesenta muestras, veintiséis correspondían a pacientes con diagnóstico radiológico previo de ONCF, y treinta y cuatro de ellas, utilizadas como controles en este estudio, correspondían a pacientes con diagnóstico radiológico previo de artrosis de cadera (AC). Parte de la dificultad de este proyecto residió en el limitado número de casos de ONCF disponibles para estudio. A la baja incidencia de la ONCF en nuestro

medio se sumó el restringido rendimiento a la hora de establecer cultivos primarios a partir de las muestras óseas de las artroplastias. Entre un 50% y un 70% de los cultivos de los lavados obtenidos de las muestras de hueso, no resultaban en el establecimiento de cultivos primarios de CMMs. Esto es algo habitual en este tipo de técnicas y está relacionado con la baja presencia de CMMs, ya que dichas células suponen entre el 0,001% y el 0,0001% del total de células de la médula ósea. Estos datos de eficiencia en el establecimiento de cultivos de CMMs concuerdan con los datos obtenidos en otros proyectos llevados a cabo en el laboratorio que se basan en el estudio de CMMs primarias de AC o de osteoporosis(230).

Las limitaciones en la eficiencia de nuestras muestras se recogen en la tabla 7. De todos los especímenes de cabeza femoral recogidos se perdieron diez muestras, 4 controles y 6 casos. A esto se añade que sólo la mitad de las muestras de ONCF progresaron hasta el segundo pase de cultivo, constatándose los problemas en el establecimiento de los cultivos primarios antes mencionados.

	Número de muestras recogidas	Muestras procesadas con éxito	Muestras que progresan en cultivo hasta P1*	Muestras que progresan en cultivo hasta P2*
Artrosis de Cadera (controles)	34	30 (88%)	7 (25%)	23(75%)
Osteonecrosis de cabeza femoral	26	20 (79%)	9 (46%)	11 (54%)

Tabla 7. Rendimiento en la obtención de CMMs a partir de las muestras de cabeza femoral. *P1, P2: pases 1 y 2 (transferencia a nuevo continente)

4.5.1 Evaluación de la capacidad proliferativa de las CMMs en la ONCF

El ensayo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT se utilizó para evaluar la capacidad proliferativa de las CMMs obtenidas de ambos grupos de estudio, esto es, individuos con diagnóstico de coxartrosis e individuos con diagnóstico de ONCF. Las Células Madre Mesenquimales (CMMs) fueron extraídas y cultivadas como se indicó en los materiales y métodos hasta alcanzar un número de células suficientes para realizar estos experimentos. Para llevar a cabo en análisis de su potencial proliferativo, las CMMs de un total de 10 pacientes de cada grupo experimental, fueron cultivadas bajo condiciones estándar y evaluadas en días alternos durante un periodo de siete días)(D1, D3, D5, D7) midiendo su actividad metabólica como un indicador indirecto de proliferación celular. Con el fin de obtener una mayor precisión en la evaluación de la proliferación, dado que la confluencia celular tiene un efecto directo en la capacidad de proliferación, se establecieron cultivos en placas de 96 pocillos con diferentes densidades iniciales de células. Cada pocillo se sembró con 200, 400, y 800 células, en condiciones de cuadruplicado por grupo experimental (figura 5). Este diseño permitió normalizar el efecto de la densidad celular inicial sobre los resultados y asegurar la exactitud de las mediciones.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre la proliferación de las CMMs de pacientes con ONCF y las de los controles con AC, con un aumento en la señal correspondiente al MTT en las primeras (figura 5). Los datos se presentan como la media del aumento relativo en la proliferación celular a lo largo del tiempo, normalizados con respecto al día inicial del experimento.

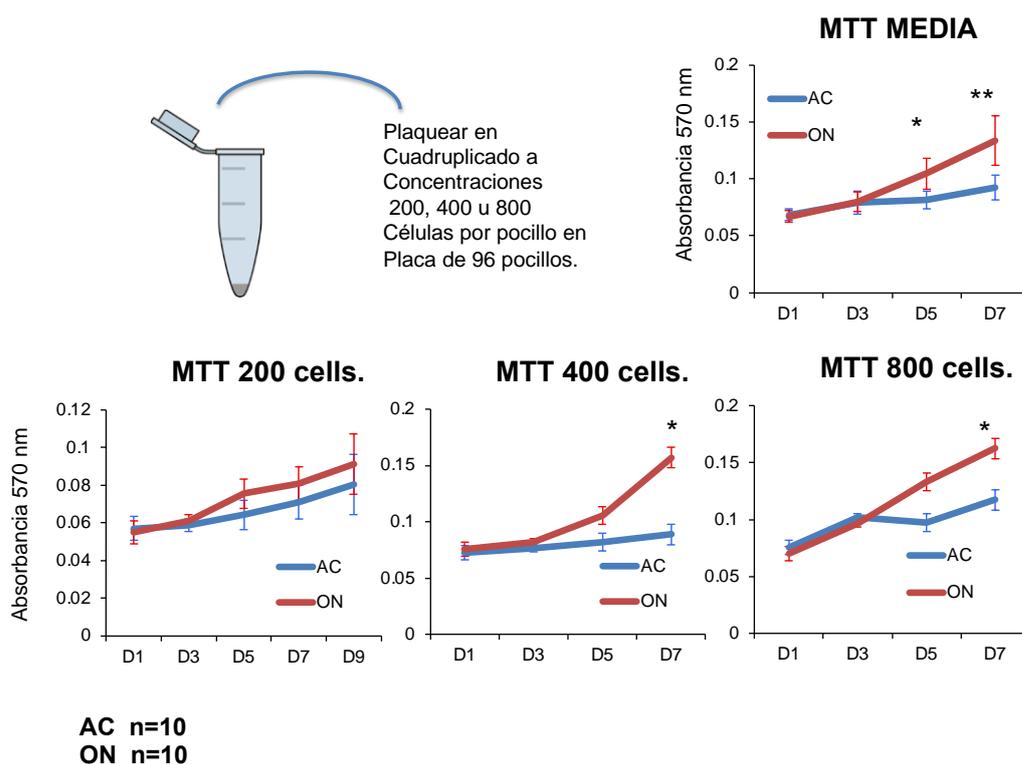


Figura 5. Evaluación de la proliferación celular de las CMMs mediante el ensayo MTT. Los valores corresponden a la actividad metabólica medida en CMMs derivadas de pacientes con osteonecrosis de cabeza femoral (ON, línea roja) y artrosis de cadera (AC, línea azul) en diferentes días de cultivo (D1, D3, D5 y D7). La gráfica superior corresponde a la media de las tres condiciones representadas en las tres gráficas inferiores, donde la variable es el número de células inicial en cada uno de los pocillos. Los datos se presentan como el aumento del número de células en comparación con el día anterior (en función de la absorbancia a 570nm, recogido en el eje de ordenadas). Los valores muestran los valores promedio \pm desviación estándar ($n = 10$). * $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$.

4.5.2 Evaluación de la capacidad adipogénica de las CMMs en la ONCF

Se evaluó la capacidad de diferenciación adipogénica de las CMMs obtenidas de pacientes con ONCF y artrosis de cadera (AC) mediante el uso de tinciones con Oil Red, un método ampliamente utilizado en la caracterización de la adipogénesis *in vitro*. Este procedimiento se basa en la afinidad del colorante por los lípidos neutros presentes en las vacuolas intracelulares formadas durante el proceso de diferenciación adipogénica. Las células fueron cultivadas bajo condiciones específicas que promueven la diferenciación hacia el linaje adipogénico, empleando los medios y condiciones indicados en materiales y métodos durante un periodo de quince días. Tras el cultivo, las células diferenciadas fueron fijadas y teñidas con Oil Red O para visualizar y cuantificar la acumulación de lípidos. Posteriormente, el colorante retenido fue eluido utilizando un solvente adecuado, y su intensidad fue medida mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm, lo que permitió cuantificar la acumulación lipídica de manera precisa. Esta medición se llevó a cabo en un total de

cuatro cultivos de CMMs obtenidas de pacientes con ONCF y siete cultivos de CMMs obtenidas de pacientes con AC. Esta metodología proporciona un enfoque robusto y reproducible para evaluar el compromiso adipogénico de las CMMs, permitiendo establecer comparaciones entre los diferentes grupos de estudio.

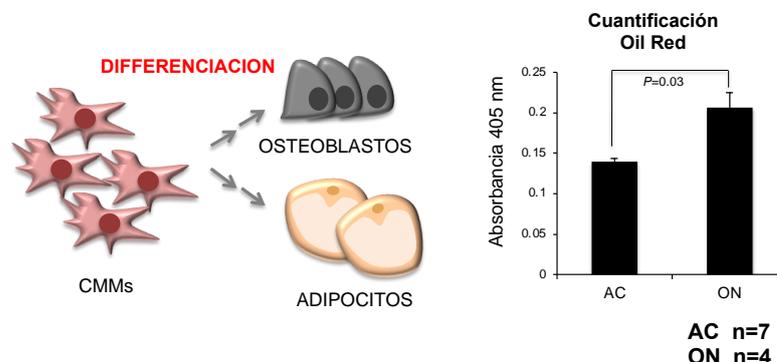


Figura 6: La figura muestra el potencial de las células madre mesenquimales de diferenciar dando lugar a células osteoblásticas o células adipocíticas. La gráfica muestra los resultados de la medición de absorbancia correspondiente a la tinción de las células de ONCF (ON) y AC. La gráfica corresponde a la media de las muestras analizadas en cada grupo (4 ONCF y 7 AC). Los valores muestran los valores promedio \pm desviación estándar. El valor P está representado en la gráfica.

Los datos obtenidos reflejan diferencias significativas en la acumulación lipídica entre las CMMs de pacientes con ONCF y aquellas derivadas de controles con AC (figura 6). Esta cuantificación espectrofotométrica facilita una evaluación objetiva y estandarizada del potencial adipogénico de las células en estudio.

4.5.3 Evaluación de la capacidad osteogénica de las CMMs en la ONCF

El análisis de la capacidad osteogénica de las células madre mesenquimales (CMMs) se fundamenta en tres enfoques complementarios: la evaluación de la expresión de los principales marcadores osteogénicos, la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALPL) y el análisis de la mineralización *in vitro*. La expresión de genes como *RUNX2*, *ALPL*, *BGLAP* y *COL1A1* es crucial para caracterizar las diferentes etapas del proceso de diferenciación osteogénica. *RUNX2* actúa como un regulador maestro temprano de la diferenciación osteoblástica, controlando la transcripción de múltiples genes relacionados con la formación de matriz ósea y la mineralización(239). *ALPL*, por su parte, desempeña un papel esencial en la regulación del equilibrio de fosfatos, facilitando la formación de cristales de hidroxapatita en las primeras etapas de la diferenciación(240). En etapas más avanzadas, *BGLAP* (osteocalcina) y *COL1A1* (colágeno tipo I) indican la maduración osteoblástica y la formación de una matriz extracelular funcional y mineralizada, siendo esenciales para la integridad estructural del hueso(241).

La expresión de los principales marcadores osteogénicos fue analizada en células madre mesenquimales (CMMs) derivadas de pacientes con artrosis de cadera (AC) y osteonecrosis de cabeza femoral (ONCF) tras 20 días de diferenciación osteogénica en condiciones específicas. Los genes seleccionados para este análisis

fueron *RUNX2*, *ALPL*, *BGLAP* y *COL1A1*, todos ellos fundamentales en distintas etapas y funciones del proceso de diferenciación osteogénica.

El análisis mediante PCR cuantitativa reveló que no existían diferencias significativas en la expresión de algunos de *RUNX2* y *ALPL*. Sin embargo, si se observan diferencias significativas en la expresión de los marcadores tardíos, *BGLAP* y *COL1A1*, que presentaron niveles más bajos de expresión en CMMs de ONCF en comparación con las células de individuos con AC. Estas diferencias moleculares reflejan alteraciones en el potencial de diferenciación osteogénica de las CMMs en el contexto de la osteonecrosis de cabeza femoral, lo que podría contribuir a las limitaciones regenerativas observadas en esta enfermedad (figura 7).

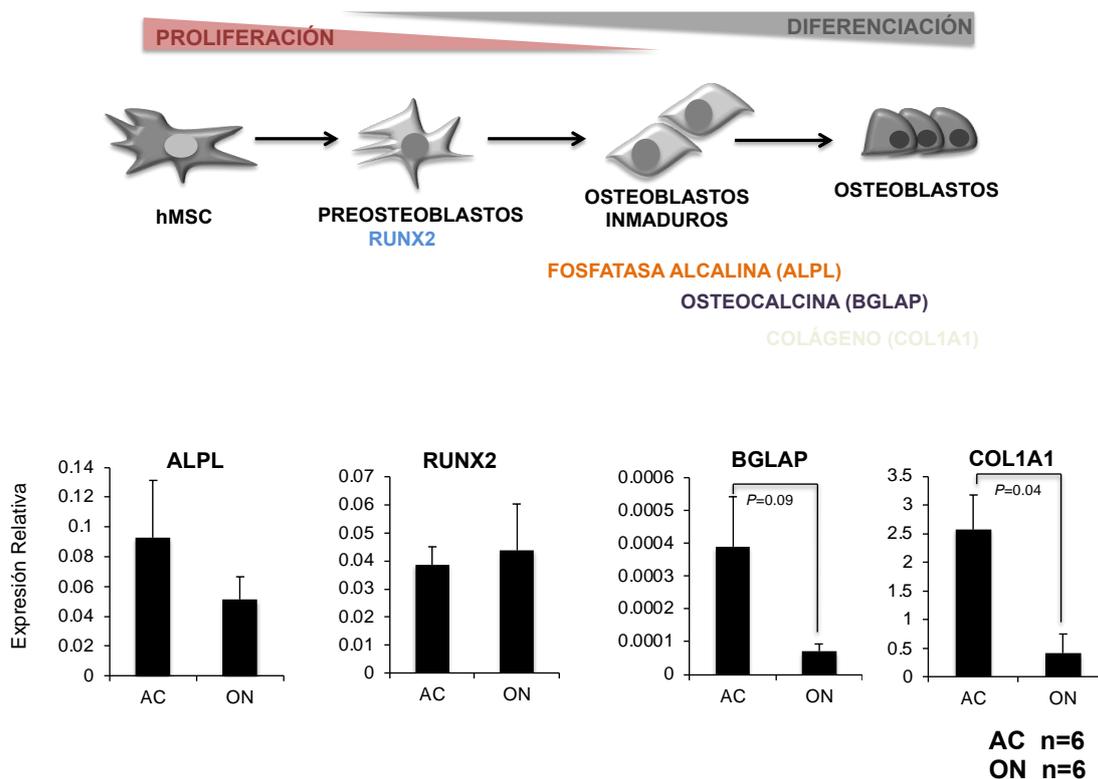


Figura 7. La imagen superior muestra la expresión de los marcadores analizados a lo largo de la diferenciación osteogénica de las CMMs. Expresión de marcadores osteogénicos a día 20 de diferenciación osteogénica en células madre mesenquimales de pacientes con coxartrosis (AC) y pacientes con ONCF. Las gráficas corresponden a la media de las muestras analizadas en cada grupo para cada uno de los marcadores indicados. Los valores muestran los valores promedio ± desviación estándar. El valor P está representado en la gráfica.

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALPL), un marcador clave del compromiso osteogénico, fue evaluada en células madre mesenquimales (CMMs) derivadas de pacientes con osteonecrosis de cabeza femoral (ONCF) y artrosis de cadera (AC). Las células fueron cultivadas en condiciones que favorecen la diferenciación osteogénica durante un periodo determinado. La expresión de ALPL se midió mediante técnicas estándar y se representó en valores relativos para cada grupo experimental.

Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de ALPL entre las CMMs de ambos grupos. En las células derivadas de pacientes con AC, los niveles de ALPL fueron consistentemente más altos, mientras que en las células de ONCF se observó una menor actividad en las mismas condiciones de cultivo. Estos datos reflejan diferencias en la capacidad de las CMMs para comprometerse hacia el linaje osteogénico en las etapas iniciales de diferenciación (figura 8).

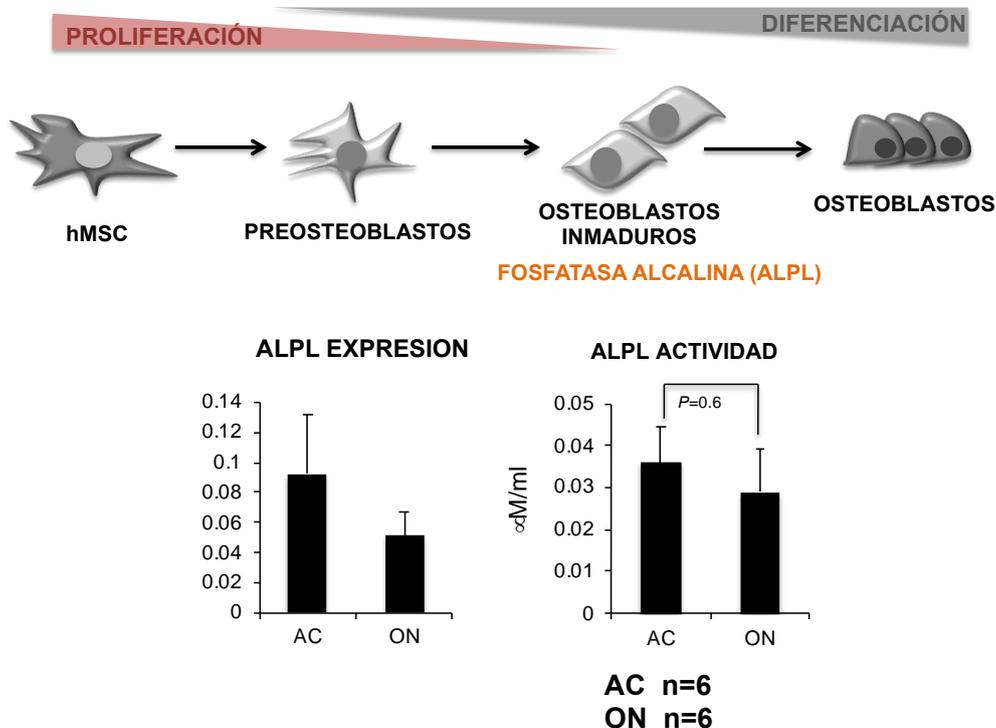


Figura 8. La imagen superior muestra la expresión de la fosfatasa alcalina a lo largo de la diferenciación osteogénica de las CMMs. Las gráficas muestran tanto los niveles de expresión de este gen, como la actividad de la enzima correspondiente a día 20 de diferenciación osteogénica en células madre mesenquimales de pacientes con coxartrosis (AC) y pacientes con ONFH. Las gráficas corresponden a la media de las muestras analizadas en cada grupo para cada uno de los marcadores indicados. Los valores muestran los valores promedio \pm desviación estándar. El valor P está representado en la gráfica.

Los resultados obtenidos indican una reducción en la expresión del gen que codifica para la fosfatasa alcalina en CMMs procedentes de pacientes con ONCF en comparación con aquellas de pacientes con artrosis, aunque esta diferencia no resultó ser significativa. Esta bajada en la expresión de ALPL concordaría con la reducción significativa de la actividad de esta enzima en CMMs de ONCF (figura 8).

La última prueba que de forma rutinaria se lleva a cabo para analizar el potencial osteogénico tanto de células madre mesenquimales como de sus precursores, es el ensayo de su capacidad de mineralización *in vitro*. La mineralización es un proceso crítico en la diferenciación osteogénica de las CMMs, representando una etapa avanzada de este linaje en el cual las células depositan matriz extracelular rica en fosfato de calcio. Este proceso está regulado por múltiples factores, incluyendo la actividad de la fosfatasa alcalina (ALPL), que facilita la liberación de fosfato inorgánico necesario para la nucleación de cristales de hidroxapatita. En este contexto, la expresión de ALPL actúa como un marcador temprano de diferenciación osteogénica,

mientras que la tinción con Alizarin Red permite evaluar de manera directa la capacidad de las células para formar depósitos minerales.

En este estudio, las CMMs derivadas de pacientes con ONCF y AC fueron cultivadas en condiciones que promueven la diferenciación osteogénica. La actividad de ALPL se cuantifica para evaluar el compromiso temprano hacia el linaje osteogénico, mientras que la tinción de Alizarin Red nos permite medir la mineralización como indicador de la capacidad funcional osteogénica de estas células (figura 9).

Los resultados obtenidos revelan diferencias significativas entre ambos grupos, con una menor formación de depósitos minerales en las CMMs de ONCF analizadas en comparación con las de AC. Estas observaciones sugieren una capacidad osteogénica comprometida en las CMMs de pacientes con ONCF, lo que podría estar relacionado con las alteraciones microambientales características de esta enfermedad, tales como hipoxia o inflamación crónica.

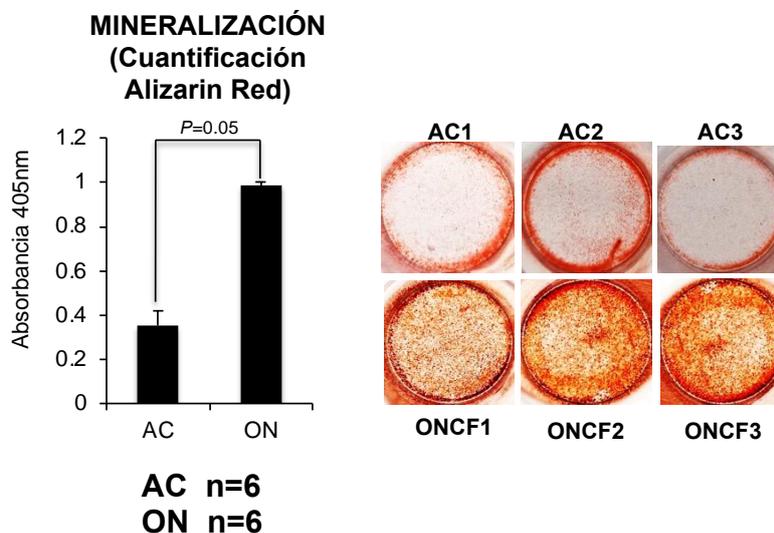


Figura 9. Evaluación de la mineralización durante la diferenciación osteogénica de las CMMs. La gráfica muestra los niveles de mineralización, medida como la intensidad de la tinción con Alizarin Red en las CMMs derivadas de pacientes con osteonecrosis de cabeza femoral (ONCF) y artrosis de cadera (AC) tras 20 días de inducción osteogénica. Las imágenes de la derecha presentan la tinción de Alizarin Red, utilizada para evaluar la mineralización extracelular en las mismas condiciones experimentales en tres muestras representativas de cada grupo experimental. Los valores muestran los valores promedio \pm desviación estándar ($n = 6 + 6$).

Nuestros resultados indican una deposición de calcio significativamente mayor en las células control (AC) en comparación con las CMMs derivadas de ONCF, evidenciando diferencias en la capacidad osteogénica entre ambos grupos (figura 9).

5 DISCUSIÓN

5.1 Fiabilidad diagnóstica en la osteonecrosis de cabeza femoral

Los resultados obtenidos respecto al análisis de consistencia diagnóstica entre especialistas revelan una interesante dinámica entre los diferentes especialistas involucrados en el diagnóstico de la osteonecrosis de la cabeza femoral (ONCF) y la artrosis de cadera (AC). La concordancia moderada observada entre los diagnósticos de los cirujanos ortopédicos y los radiólogos sugiere una consistencia aceptable en la identificación de las condiciones patológicas en base a las imágenes radiológicas. Sin embargo, la discrepancia entre los diagnósticos de los patólogos y los otros especialistas indica la complejidad inherente al diagnóstico histológico de la ONCF, que puede variar según la interpretación de los cambios tisulares observados en las muestras.

Es notable que el análisis histológico confirmó el diagnóstico radiológico en la mayoría de las muestras de cabeza femoral analizadas, lo que respalda la utilidad de la radiología como herramienta de diagnóstico inicial en estos casos. Sin embargo, la identificación de casos de artrosis de cadera que cumplen los criterios histológicos de ONCF plantea interrogantes sobre la especificidad de los hallazgos radiológicos y la necesidad de una evaluación histológica más detallada en ciertos casos. Franchi et Al. encontraron necrosis avascular subarticular secundaria en un 11,7% de cabezas femorales extirpadas quirúrgicamente debido a AC. En la mayoría de los casos la necrosis fue superficial, pero en el 15% de los casos de necrosis secundaria la necrosis era profunda y en forma de cuña, con un aspecto similar a las lesiones observadas en la ONCF subarticular primaria(242).

En nuestro trabajo, la reproducibilidad diagnóstica interobservador no mostró diferencias estadísticamente significativas al considerar los distintos estadios de Ficat y Arlet. Este hallazgo, que sugiere que la variabilidad en el diagnóstico entre especialistas no está influenciada por la gravedad de la enfermedad.

En resumen, estos hallazgos resaltan la importancia de la colaboración interdisciplinaria en el diagnóstico preciso de las condiciones ortopédicas, así como la necesidad de una evaluación integral que considere tanto los hallazgos radiológicos como histológicos para una caracterización completa de las patologías de la cabeza femoral.

Por otro lado, el análisis de concordancia pre y post-quirúrgica sugiere una gran confiabilidad en la evaluación de los cirujanos ortopédicos en el seguimiento de los pacientes antes y después de la cirugía. La consistencia en los diagnósticos pre y postoperatorios proporciona una base sólida para evaluar la efectividad de las intervenciones quirúrgicas y el progreso del tratamiento en pacientes con osteonecrosis de la cabeza femoral y artrosis de cadera. Esta concordancia intraobservador en los diagnósticos también resalta la importancia de una evaluación clínica continua y precisa para garantizar resultados óptimos en el manejo de estas condiciones ortopédicas.

5.2 Diagnóstico radiológico de la osteonecrosis de cabeza femoral

La radiografía convencional sigue siendo fundamental en la exploración diagnóstica inicial de los pacientes con dolor de cadera. Como ya se ha mencionado,

las radiografías simples siguen considerándose la piedra angular del diagnóstico clínico de la ONCF, y la mayoría de los pacientes sometidos a cirugía de prótesis de cadera se diagnostican utilizando únicamente esta técnica. Sin embargo, existe evidencia que confirma la limitación de esta técnica en varios aspectos. Se ha propuesto que las radiografías simples son insensibles a los cambios tempranos de la ONCF y, por lo tanto, una herramienta diagnóstica subóptima, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad. Resulta por tanto contradictoria la frecuente mención en la literatura de signos radiológicos característicos de esta entidad, aparentemente de fácil identificación(8). Es por esto que, en el presente trabajo postulamos la hipótesis de que la radiología convencional presenta limitaciones tanto en la detección de signos radiológicos característicos de la ONCF como en la consistencia del diagnóstico entre distintos especialistas y la concordancia en la estadificación de la enfermedad.

En la práctica clínica diaria, el diagnóstico de la ONCF suele ser realizado por cirujanos ortopédicos y/o radiólogos, ocasionalmente asistidos por el informe del patólogo. Se ha reportado con frecuencia la necesidad de confirmación histopatológica en aquellos casos de la enfermedad poco claros(4). En cuanto al uso de la RM en la práctica diaria, la sospecha de ONCF a pesar de radiografías negativas sigue siendo la principal indicación de esta prueba(243). En nuestra muestra, de los veintiocho casos de ONCF se confirmaron once mediante RM, diecisiete mediante análisis histológico y cuatro mediante ambos métodos.

En cuanto a la fiabilidad radiográfica en la ONCF, la literatura se ha centrado en estudiar la concordancia diagnóstica y de estadificación, con mayor interés en la detección de fracturas subcondrales(183). Para aclarar las posibles causas de error en el diagnóstico por imagen de la ONCF, analizamos el reconocimiento de los signos radiológicos característicos. Al comparar la fiabilidad interobservador en la identificación de las características radiográficas típicas de la ONCF, observamos una escasa concordancia para la mayoría de las características evaluadas. Esta falta de fiabilidad resultó ser más importante en las características de imagen consideradas signos radiológicos iniciales de la enfermedad, como la osteopenia, la pérdida de trabeculación y la esclerosis parcheada, confirmando así la limitada sensibilidad radiográfica en las primeras fases de la ONCF(23). Estos resultados concuerdan con los de estudios anteriores. Chee et al. demostraron que la sensibilidad y especificidad de las radiografías para diagnosticar la ONCF son especialmente reducidas en las fases previas al colapso(244). Por otra parte, se observó una concordancia moderada en la identificación del aplanamiento de la cabeza femoral y los signos de artrosis, lo que concuerda con estudios anteriores(245). En el presente estudio, cuando se comparó la fiabilidad diagnóstica de radiólogos y traumatólogos, no se encontraron diferencias sustanciales, con una concordancia ligeramente superior entre radiólogos en la identificación del aplanamiento de la cabeza femoral y una concordancia moderadamente superior entre traumatólogos en la detección de la artrosis.

La literatura relativa a la fiabilidad en la correlación entre estadios de la ONCF ha puesto de manifiesto una escasa concordancia entre los observadores, especialmente entre los estadios intermedios, con valores kappa medios que oscilan entre 0,39 y 0,56(4). En el presente trabajo, el coeficiente de concordancia W de Kendall reveló un importante y estadísticamente significativo grado de acuerdo entre todos los calificadores, especialmente entre ortopedistas. En este sentido, nuestros mejores resultados en la fiabilidad de la estadificación se deben probablemente a la pericia de nuestros observadores, especialmente entre ortopedistas. A este respecto, estudios previos han demostrado el efecto positivo de la experiencia en el diagnóstico

radiográfico y la estadificación de la ONFH(246). Además, debe tenerse en cuenta que, aunque el sistema de clasificación de Ficat y Arlet no está exento de controversia, fue concebido originalmente para radiografías simples(247).

En este apartado del proyecto deben tenerse en cuenta algunas limitaciones antes de extraer conclusiones. En primer lugar, la necesidad de confirmación diagnóstica mediante histopatología o RM nos permitió analizar sólo 28 casos adecuados; por tanto, deben tenerse en cuenta las limitaciones de un tamaño de muestra pequeño y su carácter monocéntrico. En segundo lugar, para este fin no se emplearon radiografías de control, ya que todas las características de imagen se evaluaron en pacientes con ONCF confirmada. En tercer lugar, se trata de un estudio retrospectivo con dos cirujanos ortopédicos y seis radiólogos; por tanto, no está claro si el rendimiento diagnóstico de estos ocho evaluadores es representativo de todos los médicos. En cuarto lugar, los observadores sólo podían utilizar la proyección anteroposterior de cadera para evaluar las características radiográficas. En quinto lugar, no se midió la precisión, es decir, la proximidad de una observación experimental al valor real.

5.3 Diagnóstico histológico de la osteonecrosis de cabeza femoral

En relación con el diagnóstico histológico, la evaluación de las lagunas osteocíticas vacías es un método legítimo para el diagnóstico de la ONCF, no siempre relacionado directamente con la edad y sin una relación clara con el estadio de la enfermedad. No existen criterios cuantitativos establecidos (número de bloques, trabéculas o lagunas que cuantificar) y, por lo tanto, es necesario llegar a una definición consensuada de las características histológicas de la ONCF(248).

En nuestro estudio, encontramos una diferencia estadísticamente significativa en el número de lagunas osteocíticas vacías evidenciadas entre la ONCF y el grupo de control, contribuyendo así a validar nuestras muestras y su diagnóstico histológico. Sin embargo, la asociación entre edad y lagunas osteocíticas vacías, ampliamente descrita en la literatura, no pudo considerarse estadísticamente significativa(249). Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que la distribución de las lagunas vacías en relación con la edad es bastante heterogénea, en comparación con la pérdida completa de osteocitos observada en la ONCF(248).

Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de lagunas osteocíticas vacías y el estadio de Ficat y Arlet para la ONCF. Aunque varios estudios han demostrado la relación entre las características de imagen y la gravedad de la osteonecrosis, aún no se ha descrito una relación directa entre la proporción de lagunas osteocíticas vacías y la estadificación radiológica(250).

La presencia de fibrosis medular densa fue significativamente mayor en las cabezas femorales necróticas en comparación con las osteoartriticas. Estos resultados concuerdan con hallazgos previos que describen este signo degenerativo en estadios avanzados de la enfermedad(251). Además, en la mayoría de las muestras de ONCF se observó una presencia constante de necrosis de la médula adiposa. Este resultado forma parte del espectro de características histológicas de la osteonecrosis, en la que la médula ósea fisiológica, tanto grasa como hematopoyética, desaparece(194). Otros signos degenerativos inespecíficos examinados, como la infiltración grasa y la osificación heterotópica, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Es importante señalar que tres de los doce controles de osteoartritis (25%) cumplían los criterios de diagnóstico histológico de la ONCF. Este hallazgo concuerda con trabajos anteriores, en los que entre el 21 y el 31% de los casos de ONCF se observaron patológicamente pero no radiográficamente(252). Un trabajo previo que estudió la presencia de osteonecrosis secundaria en la artrosis de cadera la confirmó microscópicamente en el 38,2% de las cabezas femorales, identificando dos patrones histológicos diferentes: la osteonecrosis superficial (probablemente necrosis por presión como consecuencia de la eburnación) y la osteonecrosis profunda en forma de cuña (un fenómeno menos frecuente e independiente relacionado con la osteonecrosis primaria)(253). Franchi *et Al.* observaron necrosis avascular subarticular secundaria en el 11,7% de las cabezas femorales extirpadas quirúrgicamente debido a AC. En la mayoría de los casos la necrosis era superficial, pero en el 15% de los casos de necrosis secundaria la necrosis era profunda y en forma de cuña, de aspecto similar a las lesiones observadas en la necrosis avascular primaria subarticular(242).

5.4 Capacidad de proliferación y diferenciación de las CMMs en ONCF

Las células madre mesenquimales (CMM) de la médula ósea presentan una gran potencialidad en su diferenciación, así como una destacada capacidad para secretar factores tróficos, desempeñando un papel esencial en los procesos reparativos de la osteonecrosis. Existe evidencia de que la patogénesis de la osteonecrosis de la cabeza femoral (ONCF) está íntimamente relacionada con una disminución de la actividad y el número de las CMMs, así como una alteración en su capacidad de diferenciación(165).

En nuestro estudio, las CMMs de pacientes con ONCF presentaron un incremento significativo de la capacidad proliferativa con respecto a las CMMs de pacientes con artrosis de cadera (AC). Este hallazgo contrasta con los reportes de Wang BL *et al.* y Houdek MT *et al.*, que documentaron una reducción en la capacidad replicativa de las CMMs en la ONCF inducida por esteroides (ONCFIE)(152, 166), hallazgo no evaluado hasta el momento de manera directa en humanos en la ONCF idiopática, que es la que nos ocupa. A este respecto, Wang Y. *et al.* demostraron en un modelo canino de ONCF un aumento en la capacidad replicativa de las CMMs(254). Dicho hallazgo podría explicarse por el efecto inductor de la replicación que ejerce el microambiente de las trabéculas necróticas sobre las CMMs (figura 1)(255).

En este contexto, el incremento en la capacidad proliferativa observado podría ser interpretado como una respuesta compensatoria frente a las condiciones de estrés en el microambiente medular isquémico, caracterizado por hipoxia e inflamación crónica. Estas condiciones activan vías de señalización como HIF-1 α y NF- κ B, conocidas por mediar tanto en la supervivencia como en la inflamación celular(256) (257). La hipoxia, en particular, podría actuar como un estímulo proliferativo al inducir cambios metabólicos en las CMMs para adaptarse a la falta de oxígeno, lo que también podría perpetuar un estado inflamatorio y disfuncional(258). Sin embargo, esta proliferación aumentada no necesariamente se traduce en una mayor capacidad regenerativa, ya que las CMMs de ONCF presentan alteraciones significativas en su capacidad de diferenciación, lo que limita su contribución al restablecimiento de la homeostasis ósea.

En relación con la capacidad de diferenciación, nuestros resultados mostraron un incremento significativo en la capacidad adipogénica de las CMMs de los pacientes con ONCF, acompañado de una menor producción de marcadores de linaje óseo respecto a los controles con AC. Este patrón es consistente con lo descrito en la literatura, donde

el compromiso hacia el linaje adipogénico tiende a inhibir la osteogénesis y viceversa, un fenómeno conocido como "switch adipogénico-osteogénico"(259). Por ejemplo, la activación de PPAR γ , un regulador clave de la adipogénesis, puede antagonizar la actividad de RUNX2, el principal regulador de la osteogénesis, a través de la competencia por cofactores como NCoA1 y p300(260). En el caso de la ONCF, la hipoxia y la inflamación crónica podrían favorecer la adipogénesis al promover la activación de PPAR γ , lo que explicaría el aumento observado en la diferenciación adipogénica de las CMMs.

La disminución en la diferenciación osteogénica en las CMMs de ONCF fue evidente en los marcadores osteogénicos tardíos como BGLAP (osteocalcina) y COL1A1, ambos esenciales para la maduración de los osteoblastos y la formación de una matriz ósea funcional. Este hallazgo también estuvo acompañado por una menor actividad de la fosfatasa alcalina (ALPL), una enzima crucial en las etapas tempranas de la diferenciación osteogénica que regula la mineralización ósea(261). En estudios previos, esta disminución en la diferenciación osteogénica se ha vinculado con alteraciones en las vías de señalización BMP y Wnt/ β -catenina, fundamentales para la formación ósea, como se ha demostrado en modelos animales de ONCFIE(254).

No obstante, los resultados de mineralización *in vitro* revelaron un incremento significativo en las CMMs de ONCF en comparación con las de AC, un hallazgo que podría interpretarse como contradictorio. La mineralización es el reflejo más importante de la capacidad funcional osteogénica, ya que representa el proceso final mediante el cual las células depositan cristales de hidroxapatita en la matriz extracelular. Este fenómeno podría explicarse por varias hipótesis. Primero, la mineralización observada podría ser consecuencia de mecanismos compensatorios que promuevan la deposición de calcio en respuesta al microambiente hipoxémico. Segundo, es posible que las células hayan utilizado vías alternativas para mineralizar independientemente de la reducción en la expresión de marcadores osteogénicos clásicos. Por ejemplo, se ha sugerido que la hipoxia y la inflamación pueden inducir mineralización ectópica mediada por citoquinas como TNF- α y IL-6, que son conocidas por promover la calcificación patológica en otros contextos(262)

Por otro lado, la interacción entre ARN no codificantes como HOTAIR y miR-17-5p también puede desempeñar un papel relevante en las alteraciones observadas en la diferenciación osteogénica y adipogénica de las CMMs de ONCF. Wei *et Al.* investigaron la relación entre el ARN no codificante largo HOTAIR y el microARN-17-5p (miR-17-5p) y sus funciones en la diferenciación osteogénica y la proliferación en la ONCF, observándose que el nivel de expresión de miR-17-5p era inferior y el nivel de HOTAIR era superior en las muestras de ONCF no traumática en comparación con la AC. La regulación a la baja de HOTAIR condujo al aumento de la expresión de miR-17-5p y a la disminución de la expresión del gen diana de miR-17-5p, SMAD7. Los valores de los marcadores de diferenciación osteogénica, incluida la expresión de ARN mensajero (ARNm) de RUNX2 y COL1A1 y la actividad fosfatasa alcalina (ALPL), también se elevaron. Sin embargo, el aumento de estos valores fue anulado por el inhibidor de miR-17-5p o la regulación al alza de SMAD7(263). De forma paralela, Jia *et Al.* observaron que en las muestras de ONCF el nivel de miR-17-5p maduro era significativamente inferior al de las muestras de AC. Al dirigirse a SMAD7, miR-17-5p promovió la translocación nuclear de β -catenina, aumentó la expresión de COL1A1 y, finalmente, facilitó la proliferación y diferenciación de las CMMs. También encontraron que la

restauración de la expresión de SMAD7 en las CMMs revirtió parcialmente la función de miR-17-5p. En conjunto, estos datos sugieren que la disfunción en la interrelación entre miR-17-5p, SMAD7 y β -catenina podría contribuir a la patogénesis de la ONCF(264).

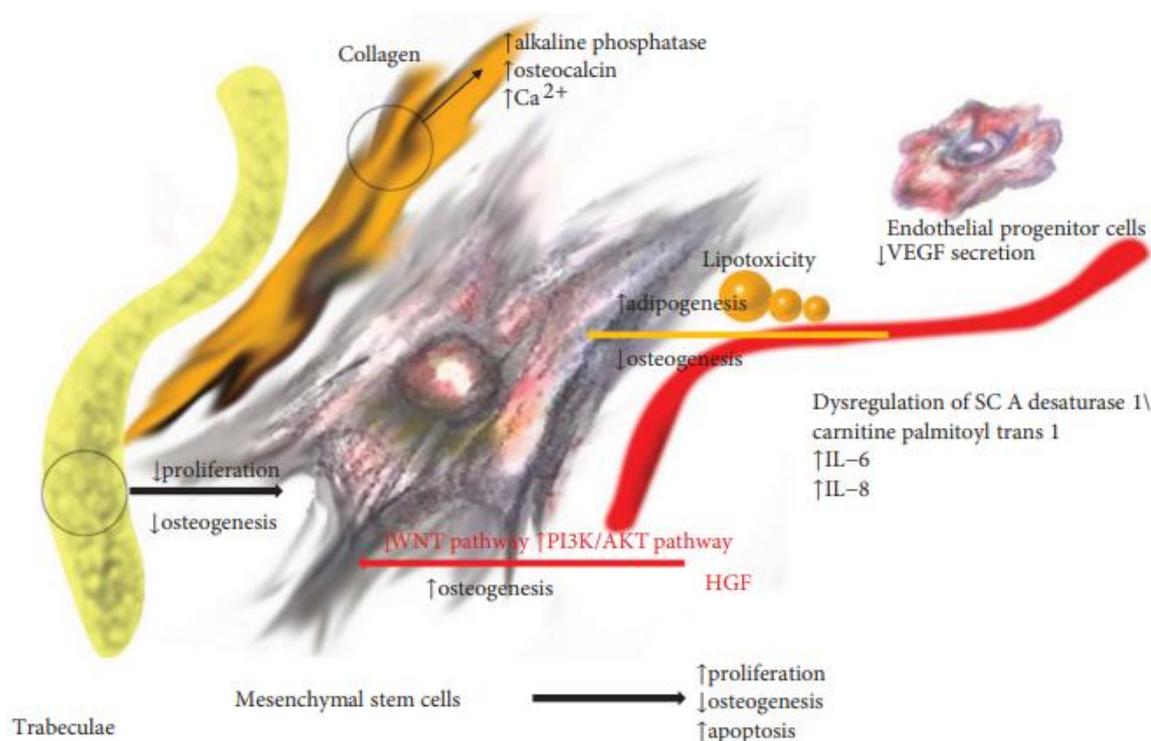


Figura 1. Cambios en la diferenciación y proliferación de las CMMs en el área de osteonecrosis en la ONCF. Tomada de: Wang Y, Ma X, Chai W, Tian J. Multiscale Stem Cell Technologies for Osteonecrosis of the Femoral Head. *Stem Cells Int.* 2019 Jan 8;2019:8914569(255).

5.5 Capacidad de diferenciación de las CMMs en ONCF

En relación con su capacidad de diferenciación, las CMMs de pacientes con ONCF presentaron en nuestro estudio un incremento significativo de la capacidad adipogénica, así como una menor producción de marcadores de linaje óseo respecto a los controles con AC. Este patrón es consistente con lo descrito en la literatura, donde el compromiso hacia el linaje adipogénico tiende a inhibir la osteogénesis y viceversa, un fenómeno conocido como "switch adipogénico-osteogénico"(259). Por ejemplo, la activación de PPAR γ , un regulador clave de la adipogénesis, puede antagonizar la actividad de RUNX2, el principal regulador de la osteogénesis, a través de la competencia por cofactores como NCoA1 y p300(260).

A nivel de la diferenciación adipogénica en las CMMs de la ONCF, existen discrepancias en la literatura. Por ejemplo, Lee et al. encontraron que la capacidad de diferenciación adipogénica no varía significativamente en los pacientes con enfermedad inducida por el alcohol, idiopática y ONCFIE en comparación con los pacientes con AC(167). Por el contrario, en la ONCFIE sí se ha reportado en varias ocasiones un aumento en la diferenciación adipogénica de las CMMs, con evidencia de que la vía de PPAR γ está involucrada en este proceso(168). Es conocido que los corticosteroides estimulan la diferenciación de las células del estroma de la médula ósea en adipocitos,

así como la acumulación de grasa en la médula, suprimiéndose la diferenciación en osteoblastos. Además, el aumento del volumen de la médula grasa, con un aumento concomitante de la presión intraósea conlleva una disminución del flujo sanguíneo, provocando finalmente isquemia y ONCF(167). Frente a la ONCFIE, la ONCF idiopática carece de una evidencia sólida en relación a la diferenciación adipogénica de la CMM.

La disminución en la diferenciación osteogénica en las CMMs de ONCF fue evidente en los marcadores osteogénicos tardíos como BGLAP (osteocalcina) y COL1A1, ambos esenciales para la maduración de los osteoblastos y la formación de una matriz ósea funcional. Este hallazgo también estuvo acompañado por una menor actividad de la fosfatasa alcalina (ALPL), una enzima crucial en las etapas tempranas de la diferenciación osteogénica que regula la mineralización ósea(240). Nuestros resultados indicando esta reducción en la capacidad osteogénica de las CMMs de ONFH, replican los hallazgos de Lee et al., que encontraron que la capacidad de diferenciación osteogénica de las CMMs de los pacientes con ONCF, tanto inducida por alcohol como idiopática, era significativamente menor que en pacientes con AC(167). Trabajos como el de Houdek et al. o Weinstein et al. también han encontrado una reducción en la capacidad de diferenciación osteogénica de las CMMs de los pacientes con ONCFIE frente a controles. Además, dicha disminución en la diferenciación osteogénica se ha comprobado también en un modelo animal de conejo de ONCFIE(170). Por tanto, los resultados de nuestro estudio apoyan la teoría de que existe una limitación en la diferenciación osteogénica de la CMM en la ONCF, tanto idiopática como secundaria. Estudios de genómica y transcriptómica en la ONCF sugieren alteraciones en las vías de señalización BMP y Wnt/ β -catenina a nivel de la CMM que condicionan su capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico(264).

No obstante, los resultados de mineralización in vitro revelaron un incremento significativo en las CMMs de ONCF en comparación con las de AC, un hallazgo que podría interpretarse como contradictorio. La mineralización es el reflejo más importante de la capacidad funcional osteogénica, ya que representa el proceso final mediante el cual las células depositan cristales de hidroxapatita en la matriz extracelular. Este fenómeno podría explicarse por varias hipótesis. Primero, la mineralización observada podría ser consecuencia de mecanismos compensatorios que promuevan la deposición de calcio en respuesta al microambiente hipoxémico. Segundo, es posible que las células hayan utilizado vías alternativas para mineralizar independientemente de la reducción en la expresión de marcadores osteogénicos clásicos. Por ejemplo, se ha sugerido que la hipoxia y la inflamación pueden inducir mineralización ectópica mediada por citoquinas como TNF- α y IL-6, que son conocidas por promover la calcificación patológica en otros contextos(262)

Desde una perspectiva terapéutica, estos resultados enfatizan la necesidad de desarrollar enfoques integrales que aborden simultáneamente las alteraciones en proliferación, diferenciación y mineralización de las CMMs. Por un lado, estrategias dirigidas a inhibir PPAR γ y potenciar la señalización Wnt/ β -catenina podrían favorecer la diferenciación osteogénica, mientras que la modulación del microambiente inflamatorio podría mitigar los efectos negativos de la hipoxia crónica y las citoquinas proinflamatorias sobre las CMMs. Por otro lado, la identificación y uso de biomarcadores moleculares como HIF-1 α , NF- κ B, o niveles de ARN no codificantes en sangre o líquido sinovial podrían ofrecer herramientas diagnósticas valiosas para monitorizar la progresión de la enfermedad y la respuesta a las terapias.

En resumen, nuestros hallazgos resaltan la importancia de entender la biología compleja y multifacética de las CMMs en la ONCF, integrando las interacciones entre

proliferación, diferenciación y mineralización en un contexto de microambiente alterado. La traducción de este conocimiento en estrategias clínicas efectivas podría transformar el manejo de la ONCF, promoviendo la regeneración ósea y mejorando los resultados funcionales en estos pacientes.

6 CONCLUSIONES

- 1. Comorbilidades y características demográficas asociadas con la ONCF.**

Demográficamente, nuestra muestra de 60 pacientes exhibió una distribución por géneros acorde a la literatura, con 38 hombres y 22 mujeres. Respecto a la edad, presentó una edad media de 65,88 años ($\pm 12,6$), mayor que la recogida en la evidencia disponible hasta el momento. Este hallazgo podría reflejar una incidencia obviada en personas de mayor edad.

Respecto a los factores de riesgo que presentaron nuestros casos, cabe destacar la obesidad y el sobrepeso como comorbilidad más frecuentemente encontrada, dato que no está presente en la literatura de forma habitual. Este hallazgo contribuye a confirmar una asociación que cada vez cobra más peso en la literatura.
- 2. Fiabilidad diagnóstica de la ONCF.**

Los resultados del presente trabajo sugieren que el proceso diagnóstico actual de la ONCF presenta limitaciones, patentes en la consistencia subóptima en el diagnóstico entre diferentes especialistas y en la limitada capacidad para identificar signos radiológicos básicos de esta enfermedad. La eficacia del diagnóstico en la ONCF podría mejorarse con un abordaje interdisciplinar, la indicación temprana de la resonancia magnética y la instrucción de los clínicos en la identificación de las características por imagen de la ONCF.
- 3. Marcadores histológicos en el diagnóstico de la ONCF.**

En relación con el diagnóstico histológico, esta tesis confirma que la evaluación de las lagunas osteocíticas vacías es un método legítimo para el diagnóstico de la ONCF, pero que no siempre se relaciona directamente con la edad ni con el estadio de la enfermedad. Una proporción importante de los casos diagnosticados como artrosis de cadera cumplieron criterios histológicos para ONCF, lo que invita a prestar especial atención al diagnóstico diferencial de estas dos entidades durante la práctica clínica.
- 4. Fisiopatología de las CMMs en la ONCF**

Existen pruebas en la literatura de que las CMMs de los pacientes con ONCF presentan una disminución en la capacidad de proliferación, si bien la evidencia disponible es reducida y limitada a necrosis avasculares secundarias a corticosteroides. En este trabajo evidenciamos por el contrario un incremento en la capacidad proliferativa de dichas células, hecho que no se ha estudiado hasta el momento en la ONCF idiopática. Por otro lado, nuestro estudio corrobora la limitación en la capacidad de diferenciación osteogénica de la CMM en el paciente con ONCF. Ambos fenómenos merecen ser estudiados en mayor profundidad en las ONCFs de naturaleza idiopática.

REFERENCIAS:

1. Chen Y, Miao Y, Liu K, Xue F, Zhu B, Zhang C, et al. Evolutionary course of the femoral head osteonecrosis: Histopathological - radiologic characteristics and clinical staging systems. *J Orthop Translat.* 2022;32:28-40.
2. Gagala J, Buraczynska M, Mazurkiewicz T, Ksiazek A. Prevalence of genetic risk factors related with thrombophilia and hypofibrinolysis in patients with osteonecrosis of the femoral head in Poland. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:264.
3. Woerner M, Voelkl K, Bliemel C, Ferner F, Weber M, Renkawitz T, et al. Comparison of two joint-preserving treatments for osteonecrosis of the femoral head: core decompression and core decompression with additional cancellous bone grafting. *J Int Med Res.* 2023;51(8):3000605231190453.
4. Cardín-Pereda A, García-Sánchez D, Terán-Villagrà N, Alfonso-Fernández A, Fakkas M, Garcés-Zarzalejo C, et al. Osteonecrosis of the Femoral Head: A Multidisciplinary Approach in Diagnostic Accuracy. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(7).
5. Simank HG, Brocai DR, Strauch K, Lukoschek M. Core decompression in osteonecrosis of the femoral head: risk-factor-dependent outcome evaluation using survivorship analysis. *Int Orthop.* 1999;23(3):154-9.
6. Moya-Angeler J, Gianakos AL, Villa JC, Ni A, Lane JM. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head. *World J Orthop.* 2015;6(8):590-601.
7. DiCarlo EF, Klein MJ. Comparison of clinical and histologic diagnoses in 16,587 total joint arthroplasties: implications for orthopedic and pathologic practices. *Am J Clin Pathol.* 2014;141(1):111-8.
8. Malizos KN, Karantanas AH, Varitimidis SE, Dailiana ZH, Bargiotas K, Maris T. Osteonecrosis of the femoral head: etiology, imaging and treatment. *Eur J Radiol.* 2007;63(1):16-28.
9. Lavernia CJ, Villa JM. Total hip arthroplasty in the treatment of osteonecrosis of the femoral head: then and now. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015;8(3):260-4.
10. Lieberman JR, Berry DJ, Mont MA, Aaron RK, Callaghan JJ, Rajadhyaksha AD, et al. Osteonecrosis of the hip: management in the 21st century. *Instr Course Lect.* 2003;52:337-55.
11. Houdek MT, Wyles CC, Martin JR, Sierra RJ. Stem cell treatment for avascular necrosis of the femoral head: current perspectives. *Stem Cells Cloning.* 2014;7:65-70.
12. Vail TP CD. Osteonecrosis: Etiology, Diagnosis, Treatment. 1997:43-9.
13. Fukushima W, Fujioka M, Kubo T, Tamakoshi A, Nagai M, Hirota Y. Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(10):2715-24.
14. Kang JS, Park S, Song JH, Jung YY, Cho MR, Rhyu KH. Prevalence of osteonecrosis of the femoral head: a nationwide epidemiologic analysis in Korea. *J Arthroplasty.* 2009;24(8):1178-83.
15. Zhang W, Du H, Liu Z, Zhou D, Li Q, Liu W. Worldwide research trends on femur head necrosis (2000-2021): a bibliometrics analysis and suggestions for researchers. *Ann Transl Med.* 2023;11(3):155.
16. Zhao DW, Yu M, Hu K, Wang W, Yang L, Wang BJ, et al. Prevalence of Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head and its Associated Risk Factors in the Chinese Population: Results from a Nationally Representative Survey. *Chin Med J (Engl).* 2015;128(21):2843-50.
17. Bergman J, Nordström A, Nordström P. Epidemiology of osteonecrosis among older adults in Sweden. *Osteoporos Int.* 2019;30(5):965-73.
18. Li WL, Tan B, Jia ZX, Dong B, Huang ZQ, Zhu RZ, et al. Exploring the Risk Factors for the Misdiagnosis of Osteonecrosis of Femoral Head: A Case-Control Study. *Orthop Surg.* 2020;12(6):1792-8.
19. Mankin HJ. Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis). *N Engl J Med.* 1992;326(22):1473-9.
20. Assad SK, Sabah M, Kakamad FH, Salih AM, Salih RQ, Mohammed SH, et al. Avascular necrosis of femoral head following COVID-19 infection. *Ann Med Surg (Lond).* 2023;85(9):4206-10.
21. Pivec R, Johnson AJ, Harwin SF, Mont MA. Differentiation, diagnosis, and treatment of osteoarthritis, osteonecrosis, and rapidly progressive osteoarthritis. *Orthopedics.* 2013;36(2):118-25.

22. Mont MA, Salem HS, Piuizzi NS, Goodman SB, Jones LC. Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Where Do We Stand Today?: A 5-Year Update. *J Bone Joint Surg Am*. 2020;102(12):1084-99.
23. Murphey MD, Foreman KL, Klassen-Fischer MK, Fox MG, Chung EM, Kransdorf MJ. From the radiologic pathology archives imaging of osteonecrosis: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2014;34(4):1003-28.
24. Resnick D. *Diagnosis of bone and joint disorders*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2002.
25. Hernigou P, Lambotte JC. Bilateral hip osteonecrosis: influence of hip size on outcome. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(10):817-21.
26. Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum*. 2002;32(2):94-124.
27. Mont MA, Ulrich SD, Seyler TM, Smith JM, Marker DR, McGrath MS, et al. Bone scanning of limited value for diagnosis of symptomatic oligofocal and multifocal osteonecrosis. *J Rheumatol*. 2008;35(8):1629-34.
28. LaPorte DM, Mont MA, Mohan V, Jones LC, Hungerford DS. Multifocal osteonecrosis. *J Rheumatol*. 1998;25(10):1968-74.
29. An YS, Park S, Jung JY, Suh CH, Kim HA. Clinical characteristics and role of whole-body bone scan in multifocal osteonecrosis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019;20(1):23.
30. R. B. *Concepts of Epidemiology. Integrating the ideas, theories, principles and methods of epidemiology*: Oxford University Press; 2008.
31. Shah KN, Racine J, Jones LC, Aaron RK. Pathophysiology and risk factors for osteonecrosis. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2015;8(3):201-9.
32. Pascarella R, Fantasia R, Sangiovanni P, Maresca A, Massetti D, Politano R, et al. Traumatic hip fracture-dislocation: A middle-term follow up study and a proposal of new classification system of hip joint associated injury. *Injury*. 2019;50 Suppl 4:S11-S20.
33. Belmahi N, Boujraf S, Larwanou MM, El Ouahabi H. Avascular necrosis of the femoral head: An exceptional complication of cushing's disease. *Ann Afr Med*. 2018;17(4):225-7.
34. Suksathien Y, Sueajui J. Mid-term results of short stem total hip arthroplasty in patients with osteonecrosis of the femoral head. *Hip Int*. 2019;29(6):603-8.
35. Niwczyk O, Grymowicz M, Szcześnowicz A, Hajbos M, Kostrzak A, Budzik M, et al. Bones and Hormones: Interaction between Hormones of the Hypothalamus, Pituitary, Adipose Tissue and Bone. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7).
36. Miszkiewicz JJ, Buckley HR, Feldman M, Kiko L, Carlhoff S, Naegele K, et al. Female bone physiology resilience in a past Polynesian Outlier community. *Sci Rep*. 2022;12(1):18857.
37. Kelly NH, Schimenti JC, Patrick Ross F, van der Meulen MC. A method for isolating high quality RNA from mouse cortical and cancellous bone. *Bone*. 2014;68:1-5.
38. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón Md, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*. 2006;11:47-51.
39. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I A-GM, del, Canto-Pingarrón M B-JL. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. 2006;11(1):151-7.
40. Britannica. **internal structure of internal structure of a human long bone a human long bone** [
41. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*. 2007;38 Suppl 1:S26-32.
42. Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med*. 2013;28(4):387-402.
43. King NM, Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(4):85.
44. Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(9):408-14.
45. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902.
46. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-36.
47. 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.

48. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
49. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):747-54.
50. Maleki M, Ghanbarvand F, Reza Behvarz M, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells*. 2014;7(2):118-26.
51. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-49.
52. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
53. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(2):401-10.
54. Binato R, de Souza Fernandez T, Lazzarotto-Silva C, Du Rocher B, Mencalha A, Pizzatti L, et al. Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy. *Cell Prolif*. 2013;46(1):10-22.
55. Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Annals of hematology*. 2012;91:1175-86.
56. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568-84.
57. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):341-7.
58. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2018;18(3):e264-e77.
59. Trohatou O, Roubelakis MG. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. *Cell Reprogram*. 2017;19(4):217-24.
60. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
61. Palumbo C, Ferretti M. In Vitro and in Vivo Bone Remodeling Models: Complementary Pieces of the same Puzzle. *Stem Cell Rev Rep*. 2023.
62. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:3-12.
63. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746.
64. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54.
65. Riancho JA, Delgado-Calle J. [Osteoblast-osteoclast interaction mechanisms]. *Reumatol Clin*. 2011;7 Suppl 2:S1-4.
66. Currey JD. The many adaptations of bone. *J Biomech*. 2003;36(10):1487-95.
67. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int*. 1993;53 Suppl 1:S102-6; discussion S6-7.
68. Tiede-Lewis LM, Dallas SL. Changes in the osteocyte lacunocanalicular network with aging. *Bone*. 2019;122:101-13.
69. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int*. 2014;94(1):5-24.
70. Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A, Jia R. *NFATc1*: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(5):576-9.
71. Kim JA, Lim S, Ihn HJ, Kim JE, Yea K, Moon J, et al. Britanin inhibits titanium wear particle-induced osteolysis and osteoclastogenesis. *Mol Med Rep*. 2023;28(5).
72. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 1993;8 Suppl 2:S505-10.

73. Wang G, Ren C, Jiang J. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on repair and receptivity of damaged endometrium in rats. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021;47(9):3223-31.
74. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-45.
75. Owen R, Reilly G. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2018;6:134.
76. Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45969-79.
77. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-19.
78. Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001;81(1):419-47.
79. Sociedad Española de Medicina Oral. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal.* Valencia, España: Medicina Oral S.L.; 2004. p. v.
80. Mellibovsky Saidler L, Díez Pérez A. Qué significa la calidad ósea. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología.* 2006;7(4):165-76.
81. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(3):233-45.
82. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150(3698):893-9.
83. Shu DY, Lovicu FJ. Insights into Bone Morphogenetic Protein-(BMP-) Signaling in Ocular Lens Biology and Pathology. *Cells.* 2021;10(10).
84. Gomez-Puerto MC, Iyengar PV, García de Vinuesa A, Ten Dijke P, Sanchez-Duffhues G. Bone morphogenetic protein receptor signal transduction in human disease. *J Pathol.* 2019;247(1):9-20.
85. Tang WB, Ling GH, Sun L, Liu FY. Smad anchor for receptor activation (SARA) in TGF-beta signaling. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010;2(3):857-60.
86. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* 2009;19(1):71-88.
87. Zou ML, Chen ZH, Teng YY, Liu SY, Jia Y, Zhang KW, et al. The Smad Dependent TGF-β and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front Mol Biosci.* 2021;8:593310.
88. García Sánchez D. Specific Gapmers System Assay with Osteogenic Effect as a Therapy for the Treatment of Osteoporosis. EDUC: Universidad de Cantabria 2023.
89. Correns A, Zimmermann LA, Baldock C, Sengle G. BMP antagonists in tissue development and disease. *Matrix Biol Plus.* 2021;11:100071.
90. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell.* 2003;14(7):2809-17.
91. Yamashita M, Ying SX, Zhang GM, Li C, Cheng SY, Deng CX, et al. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell.* 2005;121(1):101-13.
92. Usui M, Yoshida Y, Tsuji K, Oikawa K, Miyazono K, Ishikawa I, et al. Tob deficiency superenhances osteoblastic activity after ovariectomy to block estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(17):6653-8.
93. Jenny FH, Basler K. Powerful Drosophila screens that paved the wingless pathway. *Fly (Austin).* 2014;8(4):218-25.
94. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell.* 1991;64(2):231.
95. Sarabia-Sánchez MA, Robles-Flores M. WNT Signaling in Stem Cells: A Look into the Non-Canonical Pathway. *Stem Cell Rev Rep.* 2023.
96. Gavagan M, Fagnan E, Speltz EB, Zalatan JG. The Scaffold Protein Axin Promotes Signaling Specificity within the Wnt Pathway by Suppressing Competing Kinase Reactions. *Cell Syst.* 2020;10(6):515-25.e5.
97. Yang K, Wang X, Zhang H, Wang Z, Nan G, Li Y, et al. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Lab Invest.* 2016;96(2):116-36.
98. Patel S, Alam A, Pant R, Chattopadhyay S. Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. *Front Immunol.* 2019;10:2872.

99. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 2005;280(39):33132-40.
100. Ackers I, Malgor R. Interrelationship of canonical and non-canonical Wnt signalling pathways in chronic metabolic diseases. *Diab Vasc Dis Res.* 2018;15(1):3-13.
101. Lojk J, Marc J. Roles of Non-Canonical Wnt Signalling Pathways in Bone Biology. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19).
102. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17(1):9-26.
103. Li FQ, Chiriboga L, Black MA, Takemaru KI, Raffaniello RD. Chibby is a weak regulator of β -catenin activity in gastric epithelium. *J Cell Physiol.* 2019;234(2):1871-9.
104. Taipaleenmäki H, Bjerre Hokland L, Chen L, Kauppinen S, Kassem M. Mechanisms in endocrinology: micro-RNAs: targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(3):359-71.
105. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology.* 2009;11(3):228-34.
106. Sriram M, Sainitya R, Kalyanaraman V, Dhivya S, Selvamurugan N. Biomaterials mediated microRNA delivery for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2015;74:404-12.
107. Wu X, Zhang Y, Guo X, Xu H, Xu Z, Duan D, et al. Identification of differentially expressed microRNAs involved in non-traumatic osteonecrosis through microRNA expression profiling. *Gene.* 2015;565(1):22-9.
108. Li Z, Yang B, Weng X, Tse G, Chan MTV, Wu WKK. Emerging roles of MicroRNAs in osteonecrosis of the femoral head. *Cell Prolif.* 2018;51(1).
109. Sun X, Li X, Qi H, Hou X, Zhao J, Yuan X, et al. MiR-21 nanocapsules promote early bone repair of osteoporotic fractures by stimulating the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Orthop Translat.* 2020;24:76-87.
110. Wildman BJ, Godfrey TC, Rehan M, Chen Y, Afreen LH, Hassan Q. MICROmanagement of Runx2 Function in Skeletal Cells. *Curr Mol Biol Rep.* 2019;5(1):55-64.
111. Subramaniam R, Vijakumaran U, Shanmuganatha L, Law JX, Alias E, Ng MH. The Role and Mechanism of MicroRNA 21 in Osteogenesis: An Update. *Int J Mol Sci.* 2023;24(14).
112. Peng S, Gao D, Gao C, Wei P, Niu M, Shuai C. MicroRNAs regulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (Review). *Mol Med Rep.* 2016;14(1):623-9.
113. Xiang S, Li Z, Weng X. Changed cellular functions and aberrantly expressed miRNAs and circRNAs in bone marrow stem cells in osteonecrosis of the femoral head. *Int J Mol Med.* 2020;45(3):805-15.
114. Yuan HF, Von Roemeling C, Gao HD, Zhang J, Guo CA, Yan ZQ. Analysis of altered microRNA expression profile in the reparative interface of the femoral head with osteonecrosis. *Exp Mol Pathol.* 2015;98(2):158-63.
115. Han N, Li Z. Non-coding RNA Identification in Osteonecrosis of the Femoral Head Using Competitive Endogenous RNA Network Analysis. *Orthop Surg.* 2021;13(3):1067-76.
116. Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(3):459-74.
117. Calder JD, Buttery L, Revell PA, Pearse M, Polak JM. Apoptosis--a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86(8):1209-13.
118. Lafforgue P. Pathophysiology and natural history of avascular necrosis of bone. *Joint Bone Spine.* 2006;73(5):500-7.
119. Dold A. Femoral Head Arteries2023.
120. Johnson EO, Soutanis K, Soucacos PN. Vascular anatomy and microcirculation of skeletal zones vulnerable to osteonecrosis: vascularization of the femoral head. *Orthop Clin North Am.* 2004;35(3):285-91, viii.
121. Slobogean GP, Sprague SA, Scott T, Bhandari M. Complications following young femoral neck fractures. *Injury.* 2015;46(3):484-91.
122. Liu Y, Li M, Zhang M, Sun K, Wang H, Yuan X, et al. Femoral neck fractures: prognosis based on a new classification after superselective angiography. *J Orthop Sci.* 2013;18(3):443-50.
123. Garden RS. Malreduction and avascular necrosis in subcapital fractures of the femur. *J Bone Joint Surg Br.* 1971;53(2):183-97.
124. Barnes R, Brown JT, Garden RS, Nicoll EA. Subcapital fractures of the femur. A prospective review. *J Bone Joint Surg Br.* 1976;58(1):2-24.

125. Nikolopoulos KE, Papadakis SA, Kateros KT, Themistocleous GS, Vlamis JA, Papagelopoulos PJ, et al. Long-term outcome of patients with avascular necrosis, after internal fixation of femoral neck fractures. *Injury*. 2003;34(7):525-8.
126. Wang T, Sun JY, Zha GC, Jiang T, You ZJ, Yuan DJ. Analysis of risk factors for femoral head necrosis after internal fixation in femoral neck fractures. *Orthopedics*. 2014;37(12):e1117-23.
127. Parker M, Cawley S, Palial V. Internal fixation of intracapsular fractures of the hip using a dynamic locking plate: Two-year follow-up of 320 patients. *Bone Joint J*. 2013;95-B(10):1402-5.
128. Papakostidis C, Panagiotopoulos A, Piccioli A, Giannoudis PV. Timing of internal fixation of femoral neck fractures. A systematic review and meta-analysis of the final outcome. *Injury*. 2015;46(3):459-66.
129. Barquet A, Mayora G, Guimaraes JM, Suárez R, Giannoudis PV. Avascular necrosis of the femoral head following trochanteric fractures in adults: a systematic review. *Injury*. 2014;45(12):1848-58.
130. Zlotorowicz M, Czubak J, Caban A, Kozinski P, Boguslawska-Walecka R. The blood supply to the femoral head after posterior fracture/dislocation of the hip, assessed by CT angiography. *Bone Joint J*. 2013;95-B(11):1453-7.
131. Hougaard K, Thomsen PB. Traumatic posterior dislocation of the hip--prognostic factors influencing the incidence of avascular necrosis of the femoral head. *Arch Orthop Trauma Surg* (1978). 1986;106(1):32-5.
132. Lai PJ, Lai CY, Tseng IC, Su CY, Hsu YH, Chou YC, et al. A retrospective study of hip posterior fracture-dislocation: closed reduction at the emergency department or in the operation theater? *J Orthop Traumatol*. 2022;23(1):55.
133. Bastian JD, Turina M, Siebenrock KA, Keel MJ. Long-term outcome after traumatic anterior dislocation of the hip. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011;131(9):1273-8.
134. Matos MA, dos Santos Silva LL, Brito Fernandes R, Dias Malheiros C, Pinto da Silva BV. Avascular necrosis of the femoral head in sickle cell disease patients. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2012;14(2):155-60.
135. Hernigou P, Habibi A, Bachir D, Galacteros F. The natural history of asymptomatic osteonecrosis of the femoral head in adults with sickle cell disease. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(12):2565-72.
136. Colin Y, Le Van Kim C, El Nemer W. Red cell adhesion in human diseases. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(3):186-92.
137. Rezus E, Tamba BI, Badescu MC, Popescu D, Bratoiu I, Rezus C. Osteonecrosis of the Femoral Head in Patients with Hypercoagulability-From Pathophysiology to Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13).
138. Glueck CJ, Freiberg RA, Boppana S, Wang P. Thrombophilia, hypofibrinolysis, the eNOS T-786C polymorphism, and multifocal osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(10):2220-9.
139. Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Ueshima K, Hirata T, et al. Relationship between postrenal transplant osteonecrosis of the femoral head and gene polymorphisms related to the coagulation and fibrinolytic systems in Japanese subjects. *Transplantation*. 2004;77(2):220-5.
140. Kawai K, Tamaki A, Hirohata K. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. A histochemical and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am*. 1985;67(5):755-63.
141. Wang Y, Li Y, Mao K, Li J, Cui Q, Wang GJ. Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2003(410):213-24.
142. Wang A, Ren M, Wang J. The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A systematic review of the literature. *Gene*. 2018;671:103-9.
143. Felson DT, Anderson JJ. Across-study evaluation of association between steroid dose and bolus steroids and avascular necrosis of bone. *Lancet*. 1987;1(8538):902-6.
144. Wong SW, Steeples LR, Jones NP. Avascular Necrosis of Bone in Patients with Uveitis Treated with Systemic Corticosteroids. *Ocul Immunol Inflamm*. 2022;30(4):869-75.
145. Aaron RK, Voisinet A, Racine J, Ali Y, Feller ER. Corticosteroid-associated avascular necrosis: dose relationships and early diagnosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1240:38-46.
146. Joo YB, Sung YK, Shim JS, Kim JH, Lee EK, Lee HS, et al. Prevalence, incidence, and associated factors of avascular necrosis in Korean patients with systemic lupus erythematosus: a nationwide epidemiologic study. *Rheumatol Int*. 2015;35(5):879-86.
147. Rose MS. Apparent necrosis of bone-marrow in a patient with disseminated intravascular coagulation, post partum. *Lancet*. 1973;2(7831):730-1.

148. Fan L, Li J, Yu Z, Dang X, Wang K. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor prevents steroid-associated osteonecrosis of the femoral head in rabbits by promoting angiogenesis and inhibiting apoptosis. *PLoS One*. 2014;9(9):e107774.
149. Beckmann R, Shaheen H, Kweider N, Ghassemi A, Fragoulis A, Hermanns-Sachweh B, et al. Enoxaparin prevents steroid-related avascular necrosis of the femoral head. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:347813.
150. Huang C, Wen Z, Niu J, Lin S, Wang W. Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head: Novel Insight Into the Roles of Bone Endothelial Cells in Pathogenesis and Treatment. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:777697.
151. Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Sueishi K, Iwamoto Y. Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis--a histomorphometric study of autopsy cases. *Pathol Res Pract*. 2005;200(11-12):807-11.
152. Houdek MT, Wyles CC, Packard BD, Terzic A, Behfar A, Sierra RJ. Decreased Osteogenic Activity of Mesenchymal Stem Cells in Patients With Corticosteroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Arthroplasty*. 2016;31(4):893-8.
153. Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(8):2907-12.
154. Zhu ZH, Gao YS, Zeng BF, Zhang CQ. The effect of dexamethasone and hypoxic stress on MC3T3-E1 cells. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16(7):2747-55.
155. Huang G, Wei Y, Zhao G, Xia J, Wang S, Wu J, et al. Microarray-based screening of differentially expressed genes in glucocorticoid-induced avascular necrosis. *Mol Med Rep*. 2017;15(6):3583-90.
156. Matsuo K, Hirohata T, Sugioka Y, Ikeda M, Fukuda A. Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res*. 1988(234):115-23.
157. Suh KT, Kim SW, Roh HL, Youn MS, Jung JS. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2005(431):220-5.
158. Johnson JT, Hussain MA, Cherian KE, Kapoor N, Paul TV. Chronic Alcohol Consumption and its Impact on Bone and Metabolic Health - A Narrative Review. *Indian J Endocrinol Metab*. 2022;26(3):206-12.
159. Tsai HL, Chang JW, Lu JH, Liu CS. Epidemiology and risk factors associated with avascular necrosis in patients with autoimmune diseases: a nationwide study. *Korean J Intern Med*. 2022;37(4):864-76.
160. Zheng J, Yao Z, Xue L, Wang D, Tan Z. The role of immune cells in modulating chronic inflammation and osteonecrosis. *Front Immunol*. 2022;13:1064245.
161. Castillo Mercado JS, Rojas Lievano J, Zaldivar B, Barajas C, Fierro G, González JC. Atraumatic osteonecrosis of the humeral head: pathophysiology and current concepts of evaluation and treatment. *JSES Rev Rep Tech*. 2022;2(3):277-84.
162. Basiri M, Ghaffari ME, Ruan J, Murugesan V, Kleytman N, Belinsky G, et al. Osteonecrosis in Gaucher disease in the era of multiple therapies: Biomarker set for risk stratification from a tertiary referral center. *Elife*. 2023;12.
163. George G, Lane JM. Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev*. 2022;6(5).
164. Pouya F, Kerachian MA. Avascular Necrosis of the Femoral Head: Are Any Genes Involved? *Arch Bone Jt Surg*. 2015;3(3):149-55.
165. Liu K, Ge H, Liu C, Jiang Y, Yu Y, Zhou Z. Notch-RBPJ Pathway for the Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Femoral Head Necrosis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7).
166. Wang BL, Sun W, Shi ZC, Lou JN, Zhang NF, Shi SH, et al. Decreased proliferation of mesenchymal stem cells in corticosteroid-induced osteonecrosis of femoral head. *Orthopedics*. 2008;31(5):444.
167. Lee JS, Roh HL, Kim CH, Jung JS, Suh KT. Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: comparative analysis according to the risk factor. *J Orthop Res*. 2006;24(4):604-9.
168. Duan P, Wang H, Yi X, Zhang H, Chen H, Pan Z. C/EBP α regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem cells and steroid-induced avascular necrosis of the femoral head by targeting the PPAR γ signalling pathway. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):342.
169. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*. 1998;102(2):274-82.

170. Liu G, Luo G, Bo Z, Liang X, Huang J, Li D. Impaired osteogenic differentiation associated with connexin43/microRNA-206 in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. *Exp Mol Pathol.* 2016;101(1):89-99.
171. Gangji V, Hauzeur JP, Schoutens A, Hinsenkamp M, Appelboom T, Egrise D. Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Rheumatol.* 2003;30(2):348-51.
172. McGrory BJ, York SC, Iorio R, Macaulay W, Pelker RR, Parsley BS, et al. Current practices of AAHKS members in the treatment of adult osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(6):1194-204.
173. Colaço HB, Davidson JA, Davenport D, Norris MC, Bankes MJK, Shah Z. Current practice of BHS members in the treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults. *Hip Int.* 2018;28(1):90-5.
174. Huang BK, Tan W, Scherer KF, Rennie W, Chung CB, Bancroft LW. Standard and Advanced Imaging of Hip Osteoarthritis. What the Radiologist Should Know. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2019;23(3):289-303.
175. Cardín-Pereda A, García-Sánchez D, Terán-Villagrà N, Alfonso-Fernández A, Fakkas M, Pérez-Del Barrio A, et al. Diagnostic Reliability of Plain Radiography in Osteonecrosis of the Femoral Head: General Radiological Features Revised. *Curr Med Imaging.* 2023.
176. Choi HR, Steinberg ME, Y Cheng E. Osteonecrosis of the femoral head: diagnosis and classification systems. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015;8(3):210-20.
177. Jiang CC, Shih TT. Epiphyseal scar of the femoral head: risk factor of osteonecrosis. *Radiology.* 1994;191(2):409-12.
178. Tasu JP, Duboe PO, Florez N, Herpe G. Avascular osteonecrosis of the hip: The vision of the radiologist (radiology, MRI, CT and scintigraphy). *Morphologie.* 2021;105(349):85-93.
179. Öner AY, Aggunlu L, Akpek S, Celik A, Le Roux P, Tali T, et al. Staging of hip avascular necrosis: is there a need for DWI? *Acta Radiol.* 2011;52(1):111-4.
180. Vassalou EE, Spanakis K, Tsifountoudis IP, Karantanas AH. MR Imaging of the Hip: An Update on Bone Marrow Edema. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2019;23(3):276-88.
181. Ito H, Matsuno T, Minami A. Relationship between bone marrow edema and development of symptoms in patients with osteonecrosis of the femoral head. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;186(6):1761-70.
182. Karantanas AH. Accuracy and limitations of diagnostic methods for avascular necrosis of the hip. *Expert Opin Med Diagn.* 2013;7(2):179-87.
183. Stevens K, Tao C, Lee SU, Salem N, Vandevenne J, Cheng C, et al. Subchondral fractures in osteonecrosis of the femoral head: comparison of radiography, CT, and MR imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 2003;180(2):363-8.
184. Jordan E, Varady NH, Hosseinzadeh S, Smith S, Chen AF, Mont M, et al. Femoral Head Osteonecrosis: Computed Tomography Not Needed to Identify Collapse When Using the Association Research Circulation Osseous Staging System. *Arthroplast Today.* 2023;24:101244.
185. Agrawal K, Tripathy SK, Sen RK, Santhosh S, Bhattacharya A. Nuclear medicine imaging in osteonecrosis of hip: Old and current concepts. *World J Orthop.* 2017;8(10):747-53.
186. Murphey MD, Roberts CC, Bencardino JT, Appel M, Arnold E, Chang EY, et al. ACR Appropriateness Criteria Osteonecrosis of the Hip. *J Am Coll Radiol.* 2016;13(2):147-55.
187. Mont MA, Marulanda GA, Jones LC, Saleh KJ, Gordon N, Hungerford DS, et al. Systematic analysis of classification systems for osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88 Suppl 3:16-26.
188. Sultan AA, Mohamed N, Samuel LT, Chughtai M, Sodhi N, Krebs VE, et al. Classification systems of hip osteonecrosis: an updated review. *Int Orthop.* 2019;43(5):1089-95.
189. Steinberg ME, Hayken GD, Steinberg DR. A quantitative system for staging avascular necrosis. *J Bone Joint Surg Br.* 1995;77(1):34-41.
190. Sugano N, Atsumi T, Ohzono K, Kubo T, Hotokebuchi T, Takaoka K. The 2001 revised criteria for diagnosis, classification, and staging of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Sci.* 2002;7(5):601-5.
191. Takashima K, Sakai T, Hamada H, Takao M, Sugano N. Which Classification System Is Most Useful for Classifying Osteonecrosis of the Femoral Head? *Clin Orthop Relat Res.* 2018;476(6):1240-9.
192. Liu LH, Li ZR, Sun W, Wang YT, Gao FQ. Reliability and Repeatability of the China-Japan Friendship Hospital Typing Classification for Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Bone Joint Surg Am.* 2022;104(Suppl 2):40-6.

193. Wen P, Zhang Y, Hao L, Yue Ja, Wang J, Wang T, et al. The effect of the necrotic area on the biomechanics of the femoral head - a finite element study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2020;21.
194. Fondi C, Franchi A. Definition of bone necrosis by the pathologist. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2007;4(1):21-6.
195. Chernetsky SG, Mont MA, LaPorte DM, Jones LC, Hungerford DS, McCarthy EF. Pathologic features in steroid and nonsteroid associated osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 1999(368):149-61.
196. Wang C, Wang X, Xu XL, Yuan XL, Gou WL, Wang AY, et al. Bone microstructure and regional distribution of osteoblast and osteoclast activity in the osteonecrotic femoral head. *PLoS One*. 2014;9(5):e96361.
197. Catto M. A histological study of avascular necrosis of the femoral head after transcervical fracture. *J Bone Joint Surg Br*. 1965;47(4):749-76.
198. Mukisi-Mukaza M, Gomez-Brouchet A, Donkerwolcke M, Hinsenkamp M, Burny F. Histopathology of aseptic necrosis of the femoral head in sickle cell disease. *Int Orthop*. 2011;35(8):1145-50.
199. Inoue A, Ono K. A histological study of idiopathic avascular necrosis of the head of the femur. *J Bone Joint Surg Br*. 1979;61-B(2):138-43.
200. Hauzeur JP, Pasteels JL, Schoutens A, Hinsenkamp M, Appelboom T, Chochrad I, et al. The diagnostic value of magnetic resonance imaging in non-traumatic osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am*. 1989;71(5):641-9.
201. Ruch DS, Sekiya J, Dickson Schaefer W, Koman LA, Pope TL, Poehling GG. The role of hip arthroscopy in the evaluation of avascular necrosis. *Orthopedics*. 2001;24(4):339-43.
202. Boss JH, Misselevich I. Osteonecrosis of the femoral head of laboratory animals: the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental animals. *Vet Pathol*. 2003;40(4):345-54.
203. López-Fernández A, Barro V, Ortiz-Hernández M, Manzanares MC, Vivas D, Vives J, et al. Effect of Allogeneic Cell-Based Tissue-Engineered Treatments in a Sheep Osteonecrosis Model. *Tissue Eng Part A*. 2020;26(17-18):993-1004.
204. Clark JM, Huber JD. The structure of the human subchondral plate. *J Bone Joint Surg Br*. 1990;72(5):866-73.
205. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol*. 2000;35(10):581-8.
206. Oegema TR, Carpenter RJ, Hofmeister F, Thompson RC. The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microsc Res Tech*. 1997;37(4):324-32.
207. Utsunomiya T, Motomura G, Ikemura S, Kubo Y, Sonoda K, Hatanaka H, et al. Effects of sclerotic changes on stress concentration in early-stage osteonecrosis: A patient-specific, 3D finite element analysis. *J Orthop Res*. 2018;36(12):3169-77.
208. Gao F, Han J, He Z, Li Z. Radiological analysis of cystic lesion in osteonecrosis of the femoral head. *Int Orthop*. 2018;42(7):1615-21.
209. Zhao D, Zhang F, Wang B, Liu B, Li L, Kim SY, et al. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version). *J Orthop Translat*. 2020;21:100-10.
210. Motomura G, Yamamoto T, Yamaguchi R, Ikemura S, Nakashima Y, Mawatari T, et al. Morphological analysis of collapsed regions in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 2011;93(2):184-7.
211. Zhang QY, Li ZR, Gao FQ, Sun W. Pericollapse Stage of Osteonecrosis of the Femoral Head: A Last Chance for Joint Preservation. *Chin Med J (Engl)*. 2018;131(21):2589-98.
212. Phemister DB. Repair of bone in the presence of aseptic necrosis resulting from fractures, transplantations, and vascular obstruction. 1930. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(3):672.
213. Yamamoto T, DiCarlo EF, Bullough PG. The prevalence and clinicopathological appearance of extension of osteonecrosis in the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81(2):328-32.
214. Jackson SM, Major NM. Pathologic conditions mimicking osteonecrosis. *Orthop Clin North Am*. 2004;35(3):315-20, ix.
215. Liu BY, Yang L, Wang BJ, Wang ZH, Cheng LL, Xie H, et al. [Prevention for glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head: a long-term clinical follow-up trail]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2017;97(41):3213-8.

216. Zhao D, Qiu X, Wang B, Wang Z, Wang W, Ouyang J, et al. Epiphyseal Arterial Network and Inferior Retinacular Artery Seem Critical to Femoral Head Perfusion in Adults With Femoral Neck Fractures. *Clin Orthop Relat Res*. 2017;475(8):2011-23.
217. Lai KA, Shen WJ, Yang CY, Shao CJ, Hsu JT, Lin RM. The use of alendronate to prevent early collapse of the femoral head in patients with nontraumatic osteonecrosis. A randomized clinical study. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(10):2155-9.
218. Chen CH, Chang JK, Lai KA, Hou SM, Chang CH, Wang GJ. Alendronate in the prevention of collapse of the femoral head in nontraumatic osteonecrosis: a two-year multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*. 2012;64(5):1572-8.
219. Ajmal M, Matas AJ, Kuskowski M, Cheng EY. Does statin usage reduce the risk of corticosteroid-related osteonecrosis in renal transplant population? *Orthop Clin North Am*. 2009;40(2):235-9.
220. Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop Relat Res*. 2001(386):173-8.
221. Claßen T, Becker A, Landgraeber S, Haversath M, Li X, Zilkens C, et al. Long-term Clinical Results after Iloprost Treatment for Bone Marrow Edema and Avascular Necrosis. *Orthop Rev (Pavia)*. 2016;8(1):6150.
222. Glueck CJ, Freiberg RA, Sieve L, Wang P. Enoxaparin prevents progression of stages I and II osteonecrosis of the hip. *Clin Orthop Relat Res*. 2005(435):164-70.
223. Persiani P, De Cristo C, Graci J, Noia G, Gurzi M, Villani C. Stage-related results in treatment of hip osteonecrosis with core-decompression and autologous mesenchymal stem cells. *Acta Orthop Belg*. 2015;81(3):406-12.
224. Zhang HJ, Liu YW, Du ZQ, Guo H, Fan KJ, Liang GH, et al. Therapeutic effect of minimally invasive decompression combined with impaction bone grafting on osteonecrosis of the femoral head. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2013;23(8):913-9.
225. Hamanishi M, Yasunaga Y, Yamasaki T, Mori R, Shoji T, Ochi M. The clinical and radiographic results of intertrochanteric curved varus osteotomy for idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2014;134(3):305-10.
226. Konarski W, Poboży T, Śliwczyński A, Kotela I, Krakowiak J, Hordowicz M, et al. Avascular Necrosis of Femoral Head-Overview and Current State of the Art. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(12).
227. Xu Y, Jiang Y, Xia C, Wang Y, Zhao Z, Li T. Stem cell therapy for osteonecrosis of femoral head: Opportunities and challenges. *Regen Ther*. 2020;15:295-304.
228. Murab S, Hawk T, Snyder A, Herold S, Totapally M, Whitlock PW. Tissue Engineering Strategies for Treating Avascular Necrosis of the Femoral Head. *Bioengineering (Basel)*. 2021;8(12).
229. Qi X, Zeng Y. Biomarkers and pharmaceutical strategies in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: a literature review. *J Int Med Res*. 2015;43(1):3-8.
230. 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.
231. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004;329(1):77-84.
232. Kraus NA, Ehebauer F, Zapp B, Rudolphi B, Kraus BJ, Kraus D. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte*. 2016;5(4):351-8.
233. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
234. Lampignano JP, Kendrick LE, Bontrager KL. Bontrager's textbook of radiographic positioning and related anatomy. Ninth edition. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018. xvii, 830 pages p.
235. Mak MS, Teh J. Magnetic resonance imaging of the hip: anatomy and pathology. *Pol J Radiol*. 2020;85:e489-e508.
236. Nakamura J, Kishida S, Harada Y, Iida S, Oinuma K, Yamamoto S, et al. Inter-observer and intra-observer reliabilities of the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare type classification system for osteonecrosis of the femoral head. *Mod Rheumatol*. 2011;21(5):488-94.
237. Moore RJ. Bone. In: Woods AE ER, editors. *Laboratory histopathology*. New York: Churchill Livingstone; 1994.

238. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
239. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol*. 2010;658:43-9.
240. Whyte MP. Hypophosphatasia: An overview For 2017. *Bone*. 2017;102:15-25.
241. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. 2016;82:42-9.
242. Franchi A, Bullough PG. Secondary avascular necrosis in coxarthrosis: a morphologic study. *J Rheumatol*. 1992;19(8):1263-8.
243. Lee GC, Khoury V, Steinberg D, Kim W, Dalinka M, Steinberg M. How do radiologists evaluate osteonecrosis? *Skeletal Radiol*. 2014;43(5):607-14.
244. Chee CG, Cho J, Kang Y, Kim Y, Lee E, Lee JW, et al. Diagnostic accuracy of digital radiography for the diagnosis of osteonecrosis of the femoral head, revisited. *Acta Radiol*. 2019;60(8):969-76.
245. Hesketh K, Sankar W, Joseph B, Narayanan U, Mulpuri K. Inter-observer and intra-observer reliability in the radiographic diagnosis of avascular necrosis of the femoral head following reconstructive hip surgery in children with cerebral palsy. *J Child Orthop*. 2016;10(2):143-7.
246. Smith SW, Meyer RA, Connor PM, Smith SE, Hanley EN. Interobserver reliability and intraobserver reproducibility of the modified Ficat classification system of osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am*. 1996;78(11):1702-6.
247. Schmitt-Sody M, Kirchhoff C, Mayer W, Goebel M, Jansson V. Avascular necrosis of the femoral head: inter- and intraobserver variations of Ficat and ARCO classifications. *Int Orthop*. 2008;32(3):283-7.
248. Parajuli S, Fowler JR, Balasubramanian E, Reinus WR, Gaughan JP, Rosenthal DI, et al. Problems with the pathological diagnosis of osteonecrosis. *Skeletal Radiol*. 2016;45(1):13-7.
249. Humphreys S, Spencer JD, Tighe JR, Cumming RR. The femoral head in osteonecrosis. A quantitative study of osteocyte population. *J Bone Joint Surg Br*. 1989;71(2):205-8.
250. Lang P, Jergesen HE, Moseley ME, Block JE, Chafetz NI, Genant HK. Avascular necrosis of the femoral head: high-field-strength MR imaging with histologic correlation. *Radiology*. 1988;169(2):517-24.
251. Kim YH, Kim JS. Histologic analysis of acetabular and proximal femoral bone in patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86(11):2471-4.
252. Dermawan JK, Goldblum A, Reith JD, Kilpatrick SE. Accurate and Reliable Diagnosis of Avascular Necrosis of the Femoral Head From Total Hip Arthroplasty Specimens Requires Pathologic Examination. *Am J Clin Pathol*. 2021;155(4):565-74.
253. Yamamoto T, Yamaguchi T, Lee KB, Bullough PG. A clinicopathologic study of osteonecrosis in the osteoarthritic hip. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8(4):303-8.
254. Wang M, Liao Q, Zhou B, Qiu ZQ, Cheng LM. [Preliminary study of influence of bone tissue from osteonecrosis of femoral head on the proliferation and differentiation of canine bone marrow mesenchymal stem cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2013;93(11):856-9.
255. Wang Y, Ma X, Chai W, Tian J. Multiscale Stem Cell Technologies for Osteonecrosis of the Femoral Head. *Stem Cells Int*. 2019;2019:8914569.
256. Novack DV. Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell Res*. 2011;21(1):169-82.
257. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res*. 2011;21(2):223-44.
258. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*. 2008;453(7196):807-11.
259. Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19(2):109-24.
260. Walewska A, Janucik A, Tynecka M, Moniuszko M, Eljaszewicz A. Mesenchymal stem cells under epigenetic control - the role of epigenetic machinery in fate decision and functional properties. *Cell Death Dis*. 2023;14(11):720.
261. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:190-200.
262. Adamopoulos IE. Inflammation in bone physiology and pathology. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(1):59-64.

263. Wei B, Wei W, Zhao B, Guo X, Liu S. Long non-coding RNA HOTAIR inhibits miR-17-5p to regulate osteogenic differentiation and proliferation in non-traumatic osteonecrosis of femoral head. *PLoS One*. 2017;12(2):e0169097.
264. Jia J, Feng X, Xu W, Yang S, Zhang Q, Liu X, et al. MiR-17-5p modulates osteoblastic differentiation and cell proliferation by targeting SMAD7 in non-traumatic osteonecrosis. *Exp Mol Med*. 2014;46(7):e107.

Autor:

Adrián Alberto Cardín Pereda

Directora:

Flor María Pérez Campo

Tesis Doctoral

EVALUACIÓN INTEGRAL DE LA OSTEONECROSIS AVASCULAR DE LA CABEZA FEMORAL: DESDE EL DIAGNÓSTICO POR IMAGEN HASTA LA EXPLORACIÓN CELULAR Y MOLECULAR

PhD Thesis

AN INTEGRAL EVALUATION OF AVASCULAR OSTEONECROSIS OF THE FEMORAL HEAD: FROM IMAGING TO CELLULAR AND MOLECULAR DIAGNOSIS

**UC**Escuela de **Doctorado**