



Universitat Autònoma de Barcelona

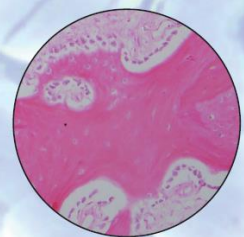
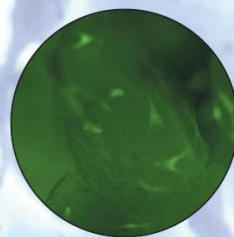
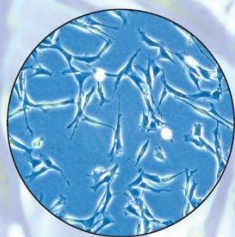
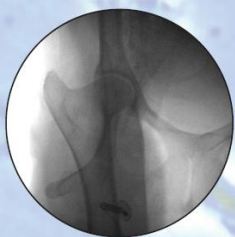
**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis Doctoral

Tratamiento con células madre  
mesenquimales en un modelo  
experimental ovino de osteonecrosis  
de cabeza femoral



Alba López Fernández



Tesis Doctoral

# **Tratamiento con células madre mesenquimales en un modelo experimental ovino de osteonecrosis de cabeza femoral.**

Tesis doctoral presentada por **Alba López Fernández**

Licenciada en Biología para optar al grado académico de doctora en  
Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tesis adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, programa  
de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, Facultad de  
Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

**Directores:**

Màrius Aguirre Canyadell

Roberto Vélez Villa

**Tutor:**

Joan Seoane Suárez

Barcelona, 2018



**Màrius Aguirre Canyadell**, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, y **Roberto Vélez Villa**, Profesor Asociado del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Certifican:

Que la licenciada **Alba López Fernández** ha realizado bajo nuestra dirección, en el Institut de Recerca Vall d'Hebron, la tesis doctoral titulada ***Tratamiento con células madre mesenquimales en un modelo ovino de osteonecrosis de cabeza femoral***, presentado en esta memoria y que se autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se presenta en la Escuela de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona dicha tesis firmando el presente certificado.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Septiembre de 2018

Màrius Aguirre Canyadell

Roberto Vélez Villa



**Joan Seoane Suárez**, Profesor Asociado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Certifica:

Que la licenciada **Alba López Fernández** ha realizado bajo mi tutoría, en el Institut de Recerca Vall d'Hebron, la tesis doctoral titulada ***Tratamiento con células madre mesenquimales en un modelo ovino de osteonecrosis de cabeza femoral***, presentado en esta memoria y que se autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se presenta en la Escuela de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona dicha tesis firmando el presente certificado.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Septiembre de 2018

Joan Seoane Suárez





## Financiación del proyecto



Esta tesis doctoral ha sido financiada por la Fundació La Marató de TV3, con número de proyecto 201220-30-31, titulado *Tratamiento de la osteonecrosis de cabeza femoral con terapia celular avanzada y biomateriales en un modelo experimental ovino*.



Esta tesis doctoral ha sido desarrollada en el contexto de ADVANCE(CAT) con el soporte de ACCIÓ (Agència per a la competitivitat de l'empresa; Generalitat de Catalunya) y por la Unión Europea en el marco del programa operativo FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) Catalunya 2014-2020.



“For myself, I am an optimist — it does not seem to be much use being anything else.”

Winston Churchill

“Above all, don’t fear difficult moments. The best comes from them.”

Rita Levi-Montalcini



Llegados a este punto es cuando, mirando hacia atrás, me doy cuenta del esfuerzo y sacrificio que ha supuesto este trabajo. Pero también de todo aquello que he ido recogiendo por el camino en forma de aprendizaje, tanto profesional como personal. Es por esta razón que quiero agradecer de la forma más sincera y profunda a todas las personas que me han acompañado y que gracias a ellas, sin lugar a dudas, este trabajo no habría sido posible.

En primer lugar, a mis directores, Màrius Aguirre y Roberto Vélez. Primero de todo por haber confiado en mí desde un principio cuando aterricé en el Grupo de Ingeniería Tisular Musculo-esquelética del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) sin saber qué era un hueso prácticamente, por encontrar siempre tiempo para responder a mis dudas e inseguridades (y alguna que otra perogrullada), por el apoyo que me habéis dado en todo momento y por vuestra comprensión y humanidad.

A Víctor Barro, por todo tu trabajo, esfuerzo y sacrificio en los interminables procedimientos quirúrgicos.

A todo el equipo del Servicio de Terapia Celular del Banc de Sang i Teixits. Gracias por dejarme formar parte de vuestro equipo y por aceptarme como una más en todo momento. En especial a Joaquim Vives, Blanca Reyes, Irene Oliver, Daniel Vivas, por su dedicación, conocimiento, pasión, entrega y por todo vuestro soporte. Quim, mil milions de gràcies per tot, per la teva guia, pel teu temps dedicat a aquest treball i pel teu optimisme infinit. Dani, otras tantas gracias por tu compañerismo dentro y fuera del laboratorio y por compartir sentido del humor y risas, te deseo lo mejor en tu camino tesimal.

A todos los miembros de la Unidad de Cirugía Experimental del VHIR, por ser excelentes profesional y personalmente. Especialmente a Àngel, Albert y Núria, por vuestra disposición, profesionalidad y paciencia en todo momento, y a la estupendas veterinarias Marielle, Carla y Marta. Marielle, no puedo agradecerte más tu adaptabilidad y tus ganas de innovar y mejorar siempre con buen humor, incluso en los momentos más difíciles pero sobretodo, tu entrega y disposición a facilitar el camino.

## Agradecimientos

---

A los miembros de la Plataforma de Imagen Preclínica del VHIR, Anna y Juanan. Gracias también por vuestra adaptabilidad, amabilidad y por todas las explicaciones que me habéis dado en todo momento.

A la Dra. Maria Pau Ginebra y al grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya. Principalmente a Mònica Ortiz Hernández, esto no habría sido posible sin tu entrega, tu motivación y tu infinita creatividad por encontrar soluciones. Gracias por hacer que los interminables días de trabajo fueran agradables y pudiera aprender tantas cosas a tu lado.

A la Dra. M<sup>a</sup> Cristina Manzanares, de la Unidad de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona y a su equipo, en especial a Eva Sánchez y Cristina Bucchi, por orientarme siempre entre tanto concepto histológico y por todos sus consejos y ayuda.

A la Dra. Rosa Rabanal, del Departamento de Anatomía Patológica, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, y a Ester Blasco, por su ayuda y guía en la parte histológica e inmunohistoquímica.

A todas mis compañeras y amigas del VHIR – Edificio de Traumatología y Rehabilitación, Alba, Pilar, Montse, Míriam, Almudena, Daniela, Lluïsa, Cesca, Clara, Lavina, Yaiza e Irene. Gràcies i gràcies. Treballar envoltada de gent tan maca i divertida fa que tot sigui més fàcil.

A les Mixines, per compartir (bio)consells, comprensió en els moments d'estrés i per tenir en tot moment paraules de confort i d'ànims. Perquè la ciència sempre és més *xaxí* amb vosaltres al costat.

A las Faguitas, Raquel, Rosa y Susana, porque mucho de lo poco que sé es gracias a vosotras, porque siempre me habéis contagiado vuestra motivación por la poyata y por todas vuestras palabras de optimismo y aliento.

A toda mi familia, por interesarse siempre por mi trabajo. Pero sobre todo a mis padres, Jose y Lola, y a mi hermano Guillem, por alentarme constantemente, tener paciencia y darme todo el cariño incondicional para seguir adelante pese a las dificultades, incluso desde la distancia. Paqui, Manel, Marta y Víctor, gracias también por estar a mi lado y animarme siempre. Y, finalmente y muy especialmente, a David, por ser mi sostén todos los días y por tu paciencia y comprensión en todas las horas que he dedicado a mi otro matrimonio científico.

# Índice

---





---

<b>Índice</b> .....	<b>14</b>
<b>Abreviaturas y acrónimos</b> .....	<b>20</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>24</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>28</b>
1.1. Osteonecrosis .....	30
1.1.1. Osteonecrosis de cabeza femoral .....	31
1.1.2. Etiología y patogénesis .....	32
1.1.3. Diagnóstico y clasificación .....	34
1.2. Aproximaciones terapéuticas al tratamiento de la ONCF .....	37
1.2.1. Tratamientos no quirúrgicos .....	37
1.2.2. Tratamientos quirúrgicos .....	38
1.3. Regeneración del tejido óseo .....	39
1.3.1. Función, estructura y fisiología del tejido óseo .....	39
1.3.2. Marcadores implicados en la regeneración ósea .....	43
1.4. Medicina regenerativa y terapias avanzadas .....	44
1.4.1. Ingeniería tisular en la regeneración ósea .....	44
1.4.2. Terapia celular en la regeneración ósea .....	50
1.5. Ingeniería tisular y terapia celular avanzada en el tratamiento de la ONCF .....	53
1.5.1. Estudios preclínicos .....	53
1.5.2. Estudios clínicos .....	62
<b>2. Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>68</b>
2.1. Hipótesis de trabajo .....	70
2.2. Objetivos .....	70

---

<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>72</b>
3.1. Modelo animal .....	74
3.2. Diseño experimental <i>in vivo</i> .....	75
3.3. Inducción de la lesión de ONCF experimental .....	76
3.4. Cultivos celulares de MSC.....	79
3.4.1. Extracción de sangre para obtención de suero ovino .....	79
3.4.2. Aspiración y recogida de médula ósea ovina .....	81
3.4.3. Obtención de MSC ovinas de origen autólogo .....	82
3.4.4. Obtención de MSC ovinas de origen alogénico.....	85
3.5. Caracterización de MSC ovinas .....	86
3.5.1. Caracterización fenotípica.....	86
3.5.2. Caracterización funcional.....	87
3.6. Cultivo celular de MSC ovinas en matrices óseas .....	89
3.6.1. Colonización de partículas óseas desvitalizadas.....	89
3.6.2. Preparación de los tratamientos de terapia celular avanzada .....	90
3.7. Cirugía de tratamiento de la ONCF experimental en un modelo ovino con terapia celular avanzada .....	91
3.8. Estudio clínico y analítico postoperatorio.....	93
3.9. Protocolo de eutanasia, obtención de muestras y necropsia .....	93
3.10. Criterios de punto final.....	94
3.11. Estudios de imagen .....	94
3.11.1. Radiología simple .....	94
3.11.2. Microtomografía computarizada (microCT) .....	94
3.12. Estudios de biomecánica mediante ensayos de indentación .....	97
3.13. Estudios de histología .....	99
3.13.1. Estudio macroscópico .....	99
3.13.2. Preparaciones histológicas no decalcificadas .....	99
3.13.3. Tinciones histológicas .....	101
3.13.4. Preparaciones histológicas decalcificadas .....	102

3.13.5. Análisis histológico.....	103
3.13.6. Tinción inmunohistoquímica para detección de eGFP.....	105
3.14. Determinación de los niveles circulantes de TGF- $\beta$ en plasma ovino .....	106
3.15. Análisis estadísticos .....	108
<b>4. Resultados .....</b>	<b>110</b>
4.1. Análisis del aislamiento, expansión y caracterización de las MSC ovinas .....	112
4.1.1. Caracterización morfológica.....	112
4.1.2. Caracterización fenotípica.....	115
4.1.3. Caracterización funcional.....	116
4.2. Análisis de la colonización de partículas óseas desvitalizadas con MSC ovinas .....	118
4.3. Diseño experimental <i>in vivo</i> .....	120
4.4. Evaluación clínica postoperatoria .....	121
4.4.1. Seguimiento clínico .....	121
4.4.2. Seguimiento analítico.....	124
4.5. Evaluación por estudios de imagen.....	126
4.5.1. Radiografía simple .....	126
4.5.2. Microtomografía computarizada (microCT).....	128
4.6. Evaluación biomecánica por test de indentación .....	134
4.7. Evaluación macroscópica e histológica .....	137
4.7.1. Evaluación macroscópica .....	137
4.7.2. Evaluación histológica.....	137
4.7.3. Evaluación inmunohistoquímica de eGFP.....	146
4.8. Evaluación de los niveles circulantes de TGF- $\beta$ en plasma ovino.....	147
<b>5. Discusión .....</b>	<b>152</b>
5.1. Tratamiento de la osteonecrosis de cabeza femoral ovina experimental con MSC ovinas autólogas y alogénicas a diferentes dosis .....	154
5.1.1. Modelo ovino de ONCF.....	154
5.1.2. Metodología de obtención, expansión y caracterización de las oMSC .....	157

---

5.1.3. Metodología de preparación de los tratamientos experimentales y colonización de partículas.....	159
5.1.4. Evaluación clínica y seguridad de los tratamientos aplicados .....	160
5.1.5. Evaluación de la eficacia en la regeneración ósea de los tratamientos ....	162
5.1.6. Evaluación de los niveles de TGF- $\beta$ como biomarcador de la regeneración ósea.....	167
5.2. Limitaciones del estudio .....	168
5.3. Trascendencia clínica del estudio.....	170
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>172</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>176</b>

# **Abreviaturas y acrónimos**

---



<b>β-TCP</b>	Fosfato tricàlcico beta	<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>μL</b>	Microlitro	<b>microCT</b>	Microtomografia computarizada
<b>μm</b>	Micròmetre	<b>min</b>	Minuto
<b>ALT</b>	alanina aminotransferasa	<b>mL</b>	Mililitro
<b>ARCO</b>	<i>Association Research Circulation Osseous</i>	<b>MO</b>	Médula ósea
<b>AST</b>	aspartato aminotransferasa	<b>MSC</b>	Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> o <i>Mesenchymal Stromal Cells</i> )
<b>BMP</b>	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>	<b>oMSC</b>	Células madre mesenquimales ovinas ( <i>ovine Mesenchymal Stem Cells</i> u <i>ovine Mesenchymal Stromal Cells</i> )
<b>BST</b>	Banc de Sang i Teixits	<b>ONCF</b>	Osteonecrosis de cabeza femoral
<b>CEEA</b>	Comité Ético de Experimentación Animal	<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>CMN</b>	Células mononucleares	<b>PDGF</b>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
<b>DC</b>	Descompresión central	<b>PF</b>	Paraformaldehído
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	<b>PMMA</b>	Polimetilmetacrilato
<b>eGFP</b>	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>	<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>	<b>SAO</b>	Suero autólogo ovino
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>	<b>SPO</b>	Suero <i>pool</i> ovino
<b>GGT</b>	gamma glutamiltranspeptidasa	<b>TC</b>	Tomografía computarizada
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua	<b>TCP</b>	Fosfato tricàlcico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>	Agua destilada	<b>TGF-β</b>	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno	<b>UPC</b>	Universitat Politècnica de Catalunya
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico	<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>IGF-I</b>	<i>Insulin-like Growth Factor-I</i>	<b>VHIR</b>	Vall d'Hebron Institut de Recerca
<b>iPSC</b>	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>	<b>VOI</b>	<i>Volume of Interest</i>
<b>ISCT</b>	<i>International Society for Cellular Therapy</i>		
<b>LPS</b>	Lipopolisacàrido		





# Resumen

---



La osteonecrosis de cabeza femoral (ONCF) se define como la muerte tisular asociada a un proceso isquémico y a la sucesiva destrucción del tejido óseo de la cabeza del fémur. Debido a las características anatómicas y vasculares, la articulación de la cadera presenta una propensión especial para la osteonecrosis. Esto conlleva una repercusión clínica muy trascendente debido al desarrollo de una artrosis y pérdida progresiva de la función articular en las fases más avanzadas, resultando en una situación muy dolorosa e incapacitante para los pacientes y con un elevado coste para el sistema sanitario. Los tratamientos actuales centrados en la regeneración del tejido óseo dañado presentan resultados de escasa fiabilidad y gran variabilidad, por lo que dentro del campo de la medicina regenerativa se está apostando en la ingeniería tisular y la terapia celular para desarrollar nuevos tratamientos enfocados en estimular la formación ósea e incluso revertir la osteonecrosis en los estadios más iniciales. La terapia celular con células madre mesenquimales (MSC) de origen autólogo se ha demostrado segura y con un potencial regenerativo reportado en varios estudios preclínicos y ensayos clínicos, pero la obtención de células del propio paciente conlleva el consiguiente coste de morbilidad, tiempo y producción. Un enfoque cuya aplicación celular tenga un origen alogénico y donde la dosis de células administradas pueda ser optimizada permitiría disponer de productos de ingeniería tisular y terapia celular avanzada en menores espacios de tiempo y de forma más sostenible.

El propósito de este trabajo de tesis doctoral ha sido la evaluación de la eficacia un producto de ingeniería tisular y terapia celular empleando MSC indiferenciadas de origen alogénico expandidas *ex vivo* a dosis variables asociadas a partículas óseas desvitalizadas y estudiar si su capacidad de estimulación de la regeneración ósea es equiparable a su versión con células de origen autólogo en un modelo experimental ovino de ONCF. La aplicación de los tratamientos experimentales en el modelo animal muestra que a las seis semanas postratamiento la capacidad de regeneración ósea de lesiones osteonecróticas en los grupos de origen alogénico es equiparable a los tratamientos de origen autólogo. Asimismo, esta estimulación mediante la aplicación de una dosis celular baja de  $0,5 \cdot 10^6$  MSC/cm<sup>3</sup> es equiparable a una dosis alta de  $5 \cdot 10^6$  MSC/cm<sup>3</sup>. No hemos observado respuesta inmunitaria ni tumorigénesis local o

sistémica *in vivo*, lo que reforzaría el perfil de seguridad de los tratamientos con MSC de origen alogénico en nuestro modelo. Por lo que los resultados obtenidos nos permiten afirmar que las MSC de origen alogénico a dosis bajas muestran capacidad de estimular la regeneración ósea en lesiones osteonecróticas de cabeza femoral, lo cual deberá ser considerado en el diseño de nuevos productos de ingeniería tisular y terapia celular avanzada para la clínica humana.

# 1. Introducción

---



La biomedicina aplica los principios de diferentes disciplinas como la bioquímica, la biología molecular y celular y la genética para aportar avances en la medicina clínica. Dentro de la biomedicina, encontramos que la ingeniería tisular y la terapia celular aplican algunos de estos conocimientos para aportar soluciones dentro de la medicina regenerativa y, de forma más concreta, en la cirugía ortopédica y traumatología. El hueso es uno de los pocos tejidos del cuerpo humano que tiene la capacidad de regenerar, es decir, de restaurar sus componentes y recuperar la función perdida o dañada total o parcialmente sin la formación de un tejido cicatricial. A pesar de esta característica propia del tejido óseo, encontramos situaciones en las que esta capacidad está disminuida o está afectada por un proceso isquémico que ha conducido a una necrosis y puede suponer un problema clínico. Actualmente existen diferentes tratamientos que pueden aportar soluciones en la recuperación de la funcionalidad o en la mejora clínica, pero pueden presentar limitaciones o una eficacia no demostrada. El desarrollo de nuevos conocimientos y nuevas terapias basadas en la ingeniería tisular y la terapia celular puede ayudar a estimular y acelerar la capacidad de este tejido para regenerarse, creando un nuevo enfoque terapéutico que sustituya técnicas clásicas de aporte de injertos óseos autólogos y alogénicos. Las aplicaciones podrán dirigirse a un amplio espectro de situaciones, desde fracturas hasta procesos patológicos concretos, donde el objetivo principal sería la formación de tejido óseo en situaciones desfavorables.

### **1.1. Osteonecrosis**

La osteonecrosis es la muerte celular del tejido óseo asociada a la interrupción de su irrigación sanguínea con la consiguiente destrucción de su estructura debilitando su función esquelética de soporte.

Podemos encontrar dos formas de osteonecrosis: secundaria y primaria. La forma secundaria está causada por una serie de factores de riesgo conocidos y puede dividirse en dos tipos, postraumática o no traumática. La osteonecrosis secundaria postraumática se debe a un traumatismo, fundamentalmente fracturas o luxaciones.

Una fractura puede causar la sección de los vasos sanguíneos de los huesos afectados o que porciones del hueso o huesos afectados queden con una irrigación precaria. Las fracturas del cuello del fémur, del astrágalo o del escafoides carpiano pueden tener dichas lesiones vasculares. Las luxaciones también pueden asociarse con la rotura de los vasos arteriales, o bien darse la obstrucción de los mismos debido a un exceso de presión intracapsular o por edema local. La osteonecrosis secundaria no traumática puede producirse como consecuencia de diferentes agentes, como la radiación, los corticoides o condiciones hiperbáricas, o también por patologías subyacentes sistémicas como anemia falciforme, enfermedades autoinmunes o coagulopatías. En la forma primaria o idiopática de osteonecrosis, no se identifica o se conoce su causa [1].

Independientemente del tipo de osteonecrosis, el proceso común es la disrupción del microambiente, regeneración y homeostasis del hueso. Esta alteración puede dar lugar a una pérdida de tejido y, en consecuencia, a morbilidad, pérdida de función o disminución de la calidad de vida. La osteonecrosis puede ocurrir en cualquier hueso del cuerpo, aunque la cabeza femoral y la mandíbula son zonas altamente susceptibles [1,2].

De todas estas situaciones en las que podemos encontrar un escenario de osteonecrosis, este trabajo se ha centrado concretamente en la osteonecrosis de cabeza femoral.

### 1.1.1. Osteonecrosis de cabeza femoral

La cabeza del fémur presenta unas características anatómicas particulares (una epífisis y una metáfisis intracapsular) y una precaria irrigación sanguínea (con vasos retinaculares intracapsulares) que condicionan una especial propensión para la osteonecrosis, tanto postraumática como para las diferentes formas no traumáticas. Además, por las características y la función de la articulación de la cadera, la repercusión clínica de la osteonecrosis de la cabeza femoral (ONCF) puede ser muy trascendente. El desarrollo de una artrosis y la pérdida progresiva de la función articular puede resultar dolorosa, incapacitante y con un elevado coste para el sistema sanitario [1,3].



### 1.1.2. Etiología y patogénesis

En la ONCF secundaria postraumática encontramos una clara relación con la interrupción mecánica del flujo sanguíneo responsable de la isquemia. Esta disrupción del aporte vascular puede tener lugar por una luxación traumática de la cadera, donde los vasos retinaculares pueden desgarrarse o seccionarse, o bien, pueden ser obliterados por el aumento de la presión intracapsular causada por un edema. En las fracturas intracapsulares del cuello del fémur, también llamadas fracturas cervicales, se pueden seccionar los vasos retinaculares y su aporte vascular a la cabeza del fémur. En ambos casos, la probabilidad de ONCF estará en relación con el desplazamiento inicial de la fractura o luxación, con la demora del tratamiento, con la reducción de la fractura o luxación y del abordaje quirúrgico empleado y con el daño ocasionado directamente por la cirugía.

La ONCF no traumática puede dividirse en dos formas: secundaria o primaria. La ONCF secundaria no traumática o avascular está relacionada con muchos factores diferentes. La mayoría podrían deberse a condiciones o patologías subyacentes sistémicas, como desórdenes metabólicos que alteren el aporte sanguíneo de la cabeza femoral o que causen compresión vascular, vasoconstricción u oclusión intravascular. Entre un 75 y un 90 % de los casos se han relacionado factores de riesgo que incluyen el uso crónico de corticosteroides, el alcoholismo y el tabaquismo. Otros factores de riesgo potenciales son condiciones hiperbáricas, la enfermedad de Caisson, el lupus eritematoso sistémico y otros trastornos del tejido conectivo como enfermedades autoinmunes causantes de vasculitis, anemia de células falciformes, coagulopatías y la enfermedad de Gaucher, entre otros. También se han asociado alteraciones genéticas hereditarias de tipo autosómicas dominantes que podrían estar relacionadas con el desarrollo de la ONCF, como mutaciones en ciertos genes vinculados con factores de coagulación o en el gen del colágeno tipo II (COL2A1), o polimorfismos genéticos relacionados con genes de angiogénesis, hipoxia o con enzimas metabólicas del alcohol. La ONCF primaria o idiopática englobaría entre un 10 y un 20 % de los casos, donde no se pueden identificar claramente los factores de riesgo, y típicamente afecta a pacientes jóvenes y activos entre 20 y 50 años [1,4–8].

El tejido óseo precisa de un aporte sanguíneo constante para mantener su actividad metabólica que le permita la remodelación y la regeneración ósea continua para reparar las microfracturas que se producen constantemente en su estructura con las actividades de la vida diaria. Independientemente de la etiología, la interrupción o disminución del aporte sanguíneo al tejido óseo de la cabeza femoral conducen al cese de la actividad reparadora y a un aumento de la actividad de reabsorción del

## 1. Introducción

tejido necrótico y, con ello, a la debilidad de la estructura de soporte que constituye el tejido óseo en un área de carga como es la cabeza femoral. Las múltiples microfracturas en la zona de carga pueden ocasionar una fractura subcondral (debajo de la superficie articular de la cabeza femoral) que se extiende progresivamente y que no puede repararse debido a la falta de aporte sanguíneo. Esto provoca un hundimiento (colapso) de la arquitectura ósea dando lugar a una deformidad de la superficie articular de la cabeza femoral. La incongruencia entre las superficies articulares de la cabeza femoral y el acetábulo provoca una destrucción del cartílago articular y una serie de cambios degenerativos o artrósicos que provocan dolor, pérdida de movilidad y cojera (Figura 1.1.) [4,9,10].

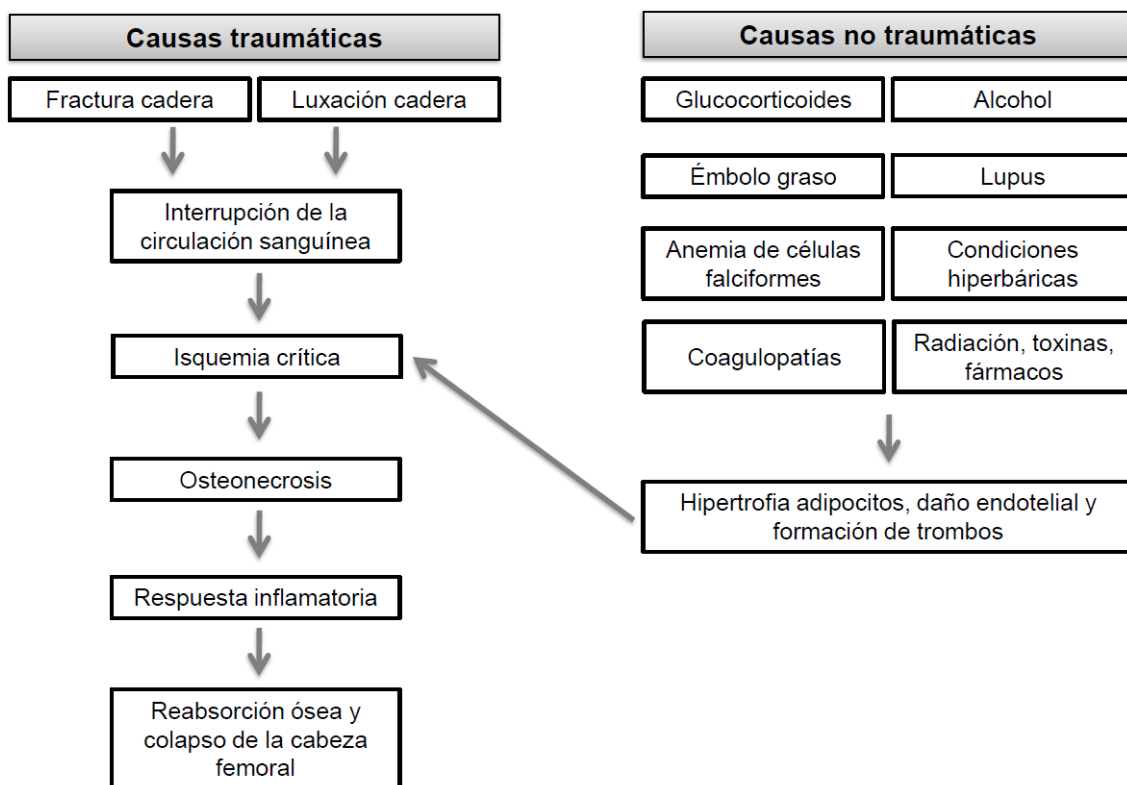


Figura 1.1. Mecanismos de la ONCF [3].

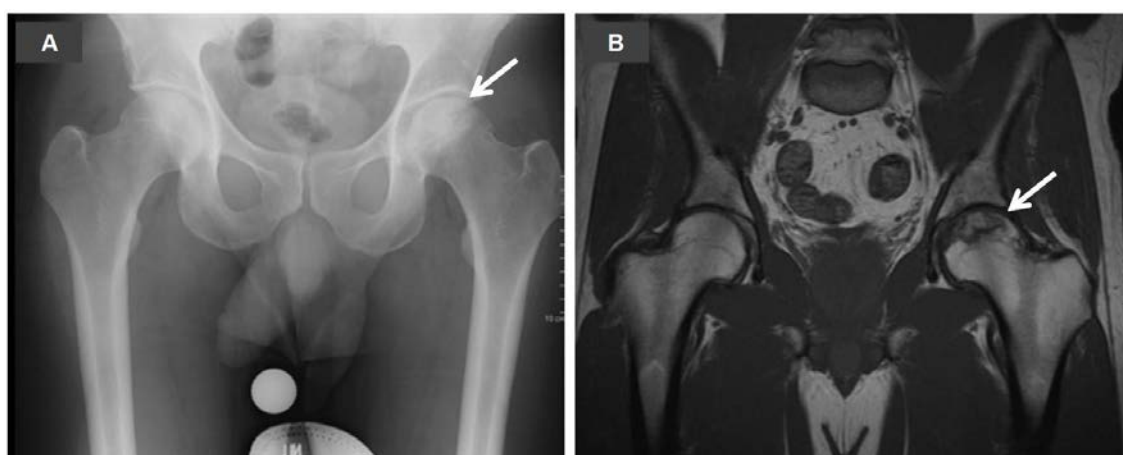
Finalmente, en los estadios más avanzados de la ONCF, en la que ya ha ocurrido el colapso y consecuente deformidad de la cabeza femoral y se encuentran cambios degenerativos como la artrosis, la reconstrucción con una artroplastia total de cadera es el método de elección. Esta técnica permite la rápida recuperación de la funcionalidad de la articulación y el alivio sintomático del dolor [4,8]. Sin embargo, a pesar de las ventajas a corto plazo de la reconstrucción de la articulación con una prótesis, hay que tener en cuenta la edad de la población mayoritariamente afectada y los riesgos asociados a la colocación de prótesis en pacientes jóvenes. Estos riesgos

generalmente están relacionados con la pérdida de hueso por cirugías de revisión, fracturas periprotésicas, luxaciones y otras complicaciones [5]. Por esa razón, es importante buscar nuevas estrategias que permitan detener la evolución de la enfermedad y potenciar y estimular la regeneración ósea del tejido afectado.

### 1.1.3. Diagnóstico y clasificación

La ONCF puede ser asintomática en las fases iniciales [8]. Por ello, un diagnóstico temprano es crítico para poder parar o revertir el progreso de la enfermedad, previniendo en última instancia el colapso de la articulación y su reconstrucción con una prótesis total de cadera.

Cuando la enfermedad se vuelve sintomática suele presentar como síntoma más común dolor inguinal y asociado a una limitación de la movilidad de la cadera, especialmente en rotación interna. La ONCF se suele diagnosticar con imagen radiológica. En los estadios más iniciales, normalmente se requieren herramientas de alta resolución como la resonancia magnética (RM) o tomografías computadas (TC), ya que las radiografías convencionales pueden parecer normales (Figura 1.2). En los estadios más avanzados sí se pueden observar cambios aparentes en radiografías convencionales, consistiendo en cambios quísticos o escleróticos en la cabeza femoral afectada. La pérdida de la esfericidad de la cabeza femoral representa la pérdida temprana de la lámina de cartílago adherida al tejido óseo de la articulación, apareciendo la marca de la media luna o *crescent sign*, correspondiendo a un signo de mal pronóstico y de fase muy avanzada de la enfermedad [8,11].



**Figura 1.2.** A) Imagen radiológica y B) MRI de ONCF en la cadera izquierda en un estadio de precolapso (imagen adaptada de Kaushik *et al.* [5]).

## 1. Introducción

La RM es la herramienta de diagnóstico de ONCF de preferencia gracias a ser una técnica no invasiva y a su alta sensibilidad y especificidad, superior al 95 %. Permite observar cambios en la médula ósea en las fases más iniciales y posibilita la evaluación del tamaño y localización de la zona osteonecrotica como factor pronóstico en las fases más avanzadas [5,12]. Otros sistemas de diagnóstico alternativos a los estudios de imagen son los estudios histológicos a partir de biopsias óseas, escáneres óseos con radioisótopos, angiografías, test específicos como la medición de la presión medular y la venografía; sin embargo, no son técnicas usadas de forma rutinaria debido a su menor sensibilidad y que son técnicas invasivas [4,5].

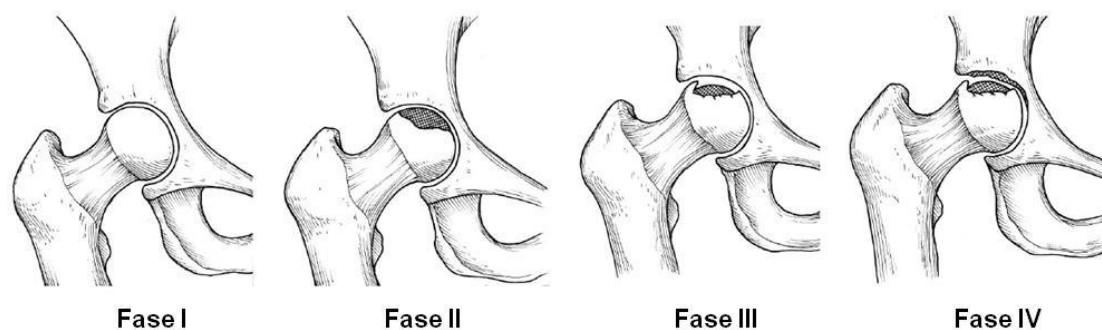
Existen varios sistemas de clasificación de la ONCF en distintos estadios de progresión de la enfermedad. Los sistemas más habituales de clasificación en su diagnóstico son el sistema propuesto por Ficat y Arlet, el sistema de Steinberg y el sistema de clasificación propuesto por la Asociación para el Estudio de la Circulación Ósea (ARCO, *Association Research Circulation Osseous*) (Tabla 1.1.) [3].

Tabla 1.1. Sistemas de Clasificación de la ONCF [5]

Estadio	Ficat y Arlet	Steinberg	ARCO
I	Radiografías normales	Radiografías normales	Radiografías normales
II	Formaciones quísticas subcondrales y esclerosis	Esclerosis de la cabeza femoral	Esclerosis de la cabeza femoral, no colapso
III	Aplanamiento de la cabeza femoral, colapso subcondral ( <i>crescent sign</i> )	Colapso subcondral sin aplanamiento de la cabeza femoral ( <i>crescent sign</i> )	Colapso de la cabeza femoral ( <i>crescent sign</i> ), sin estrechamiento del espacio articular
III A			Colapso < 3mm
III B			Colapso > 3mm
IV	Estrechamiento del espacio articular, cambios degenerativos, artrosis	Colapso subcondral, aplanamiento de la cabeza femoral, espacio articular normal	Cambios degenerativos, artrosis
V		Aplanamiento con estrechamiento del espacio articular, cambios acetabulares, o ambos	
VI		Cambios degenerativos avanzados, artrosis secundaria	

El sistema de Ficat y Arlet (Figura 1.3.) se basa en cuatro estadios que describen la progresión de la ONCF en función de los cambios radiográficos observados de la cabeza femoral. Steinberg, de la Universidad de Pensilvania, expandió el sistema de Ficat y Arlet en seis estadios e incluyó la cuantificación de la parte de la cabeza

femoral involucrada en cada estadio a partir de las imágenes de alta resolución de MR y TC. Posteriormente, en 1992, el sistema ARCO sugirió la combinación de las radiografías convencionales, las imágenes de MR y TC y los hallazgos histológicos. De esta forma, combina varios sistemas de clasificación para poder proporcionar el esquema de clasificación más completo [4,5].



**Figura 1.3.** Sistema de clasificación de la progresión de la osteonecrosis de cabeza femoral por el Sistema de Ficat y Arlet [13].

Los factores pronósticos para la progresión de la ONCF incluyen la extensión de la lesión osteonecrótica, la localización de la lesión dentro de la cabeza femoral y la presencia de edema en la médula ósea del fémur proximal, y están significativamente relacionados con la evolución hacia una fase sintomática con colapso de la cabeza femoral [8].

La ONCF también puede encontrarse en una población más joven, afectando a pacientes pediátricos de edades comprendidas entre los dos y los catorce años. En este contexto se conoce como la enfermedad de Legg-Calvé-Perthes. Del mismo modo que en la ONCF en adultos, varios factores etiológicos que combinarían causas genéticas y ambientales podrían conducir hacia el inicio de un proceso isquémico común pero que tendría una evolución diferente al tratarse de individuos en fase de crecimiento. La interrupción del aporte sanguíneo a la cabeza femoral en desarrollo conduciría a la necrosis del tejido cartilaginoso y óseo. La subsiguiente revascularización de la cabeza femoral y la reabsorción del tejido necrótico darían lugar a una situación de fragilidad mecánica del tejido óseo que, junto con la aplicación de cargas mecánicas en la articulación, deformaría la característica estructura esférica. El gran potencial regenerativo en este rango de edad estimula la formación de nuevos centros de osificación y la restauración del tejido óseo pero en muchos casos presentando una deformidad que, a la larga, podría suponer un incremento en el riesgo de artrosis de la articulación de la cadera y de forma prematura [14,15].

### 1.2. Aproximaciones terapéuticas al tratamiento de la ONCF

El objetivo del tratamiento de la ONCF es prevenir el colapso de la articulación y regenerar el tejido óseo para mantener o recuperar la funcionalidad. Encontramos diferentes aproximaciones terapéuticas en función del objetivo del tratamiento, ya sea de tipo clínico o de tipo regenerador.

Los tratamientos clínicos se enfocan en la prevención del dolor con la administración de fármacos analgésicos, en la recuperación de la movilidad con fisioterapia o en el restablecimiento de la funcionalidad con técnicas reconstructivas como la artroplastia total de cadera. Los tratamientos regeneradores se centran en disminuir el daño tisular y aumentar la regeneración ósea con la intención de prevenir el colapso de la cabeza femoral y revertir el proceso de necrosis ósea causada por la isquemia. Dentro de los tratamientos regeneradores podemos encontrar aproximaciones no quirúrgicas y quirúrgicas.

#### 1.2.1. Tratamientos no quirúrgicos

Los tratamientos regeneradores no quirúrgicos incluyen el uso de los bifosfonatos y los tratamientos biofísicos. Los bifosfonatos, fármacos ampliamente usados para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis, inhiben la actividad osteoclástica. Esta actividad inhibitoria de la reabsorción ósea podría ralentizar la progresión hacia el colapso de la cabeza femoral. Sin embargo, hay pocos estudios clínicos que establezcan un criterio uniforme y un nivel de evidencia que garantice el éxito del tratamiento [8,16]. Los tratamientos biofísicos incluyen las ondas de choque, que según los autores restablecen la oxigenación tisular, reducen el edema e inducen angiogénesis; la estimulación electromagnética, cuya acción se cree que estimula la osteogénesis y angiogénesis; y la terapia con oxígeno hiperbárico, cuya aplicación incrementa la concentración de oxígeno extracelular y reduce la isquemia y edema mediante la inducción de una vasoconstricción. Aunque estos tratamientos mostrarían una mejoría en la funcionalidad y en la disminución del dolor, no hay suficientes estudios clínicos randomizados y controlados que establezcan una evidencia científica alta, a lo que habría que sumar la larga duración, alta frecuencia y disponibilidad limitada de estos tratamientos [3,16,17].

### 1.2.2. Tratamientos quirúrgicos

Los tratamientos quirúrgicos disponibles para la ONCF centrados en la prevención del daño tisular y la regeneración ósea se basan en la descompresión central. La descompresión central (DC) fue uno de los primeros tratamientos aplicados y es una técnica quirúrgica empleada en los estadios iniciales en fase de precolapso [5]. El origen de esta técnica era parte de un protocolo diagnóstico para la obtención de una muestra histológica del tejido óseo de la cabeza femoral. Los pacientes a los que se realizó esta técnica reportaron una disminución de dolor, por lo que se instituyó como tratamiento para la ONCF puesto que se asoció la DC con la reducción de la presión intraósea, la estimulación de la revascularización y regeneración del tejido necrótico y una mejora del dolor [8]. Esta técnica presenta variaciones en cuanto a aproximaciones quirúrgicas, número de perforaciones y diámetro de trefina. No obstante, a pesar de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos clínicos donde se ha visto un retraso de la progresión de la ONCF, la efectividad de esta técnica sigue siendo controvertida [3,4].

La DC puede combinarse con la aplicación de aloinjertos o autoinjertos, con o sin vascularización, de hueso cortical o esponjoso. Estos injertos rellenan la zona de tejido necrótico actuando como soporte estructural y promoviendo el crecimiento vascular y la regeneración ósea en la zona afectada [4,5]. Por otro lado, la DC se ha combinado también con la aplicación de proteínas morfogénicas, concentrados de médula ósea o células madre mesenquimales en la zona de necrosis para potenciar el efecto regenerativo del procedimiento con las capacidades osteogénicas y osteoinductivas de estos agentes biológicos [3,8,11].

Actualmente esta técnica es ampliamente utilizada, de forma aislada o en combinación con las técnicas adyuvantes descritas anteriormente, para preservar la cabeza femoral y evitar la progresión hacia estadios más avanzados.

### 1.3. Regeneración del tejido óseo

#### 1.3.1. Función, estructura y fisiología del tejido óseo

El tejido óseo es el constituyente principal del esqueleto, su función es de soporte de las partes blandas y proteger órganos vitales como el cerebro, el corazón y la médula ósea. Es un tipo especializado de tejido conjuntivo formado por células y material intercelular calcificado llamado matriz ósea. Aloja en su interior la médula ósea y proporciona apoyo a los músculos esqueléticos. Además, actúa como un depósito de calcio, fósforo y otros iones, almacenándolos o liberándolos para mantener una concentración constante en los líquidos orgánicos. A pesar de su resistencia a las presiones y de su dureza, es un tejido muy plástico que es capaz de remodelar y adaptar su estructura interna en respuesta tanto a modificaciones de las fuerzas y de las cargas mecánicas soportadas como a factores hormonales [18,19].

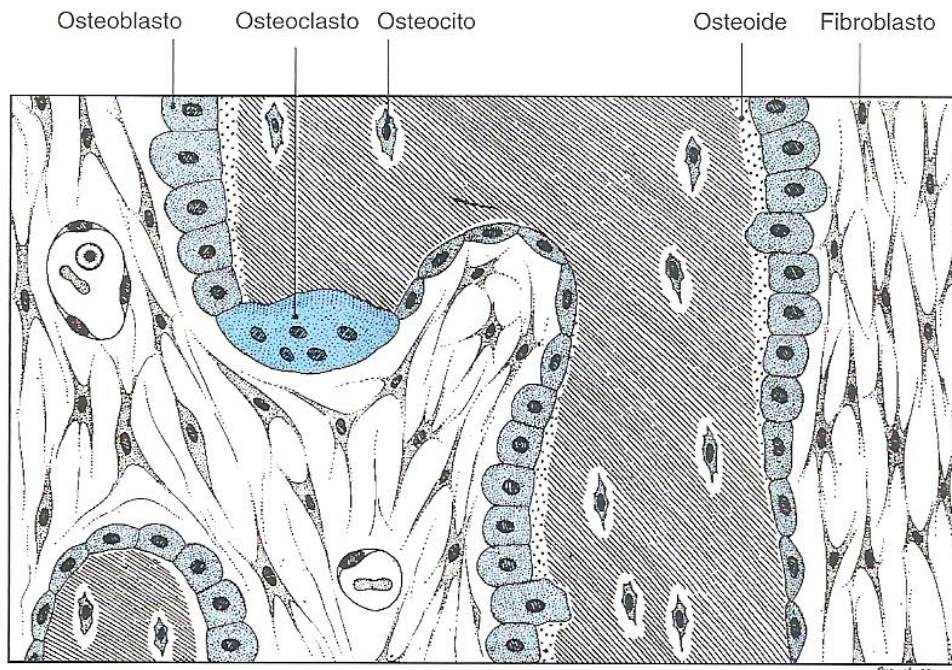
La matriz ósea está formada por tejido conectivo compuesto por colágeno tipo I rodeado por un gel de glucosaminoglucanos que contiene glucoproteínas específicas que fijan fuertemente el calcio. El depósito de sales minerales, cristales de hidroxiapatita, en el tejido conectivo confiere al hueso su rigidez característica y su resistencia funcional [19].

Los componentes celulares de este tejido son:

- Los osteocitos, que son células con morfología estrellada que se encuentran en cavidades o lagunas en el interior de la matriz. Los osteocitos están conectados entre ellos mediante los canalículos, a través de los cuales sus prolongaciones establecen contactos mediante uniones comunicantes que permiten el flujo de iones y moléculas y la transducción de señales mecanosensoras.
- Los osteoblastos, que son células cuboides que sintetizan la parte orgánica de la matriz ósea y se originan a partir de precursores mesenquimales. Secretan colágeno de tipo I y otras proteínas no colagenosas que forman parte de la matriz ósea y regulan el proceso de mineralización de la matriz concentrando fósforo cálcico. Se encuentran en la superficie ósea, en una disposición en fila, similar a un epitelio simple. Cuando la matriz sintetizada se deposita alrededor de su cuerpo celular y de sus prolongaciones, los osteoblastos quedan aprisionados formándose así las lagunas y los canalículos, pasando a llamarse osteocitos.
- Los osteoclastos son células gigantes, móviles y plurinucleadas que reabsorben el tejido óseo participando en los procesos de remodelación de los huesos. Las



depresiones de matriz excavadas por los osteoclastos por acción enzimática se denominan Lagunas de Howship. Los osteoclastos tienen un origen hematopoyético y se originan a partir de precursores mononucleares de la médula ósea que, una vez unidos al tejido óseo, pasan a formar los osteoclastos plurinucleados.



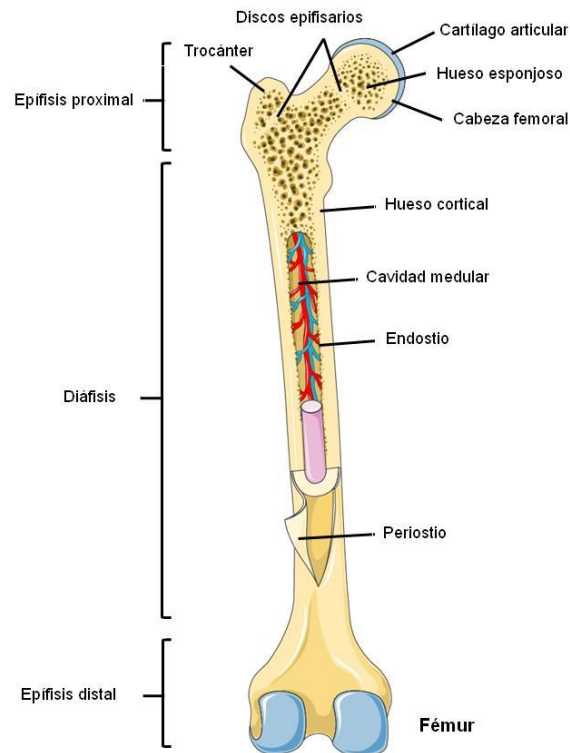
**Figura 1.4.** Distribución de los componentes celulares del tejido óseo [18].

Los huesos están revestidos por membranas en su superficie externa e interna, el periostio y el endostio, respectivamente. La capa más superficial del periostio contiene principalmente fibras de colágeno y fibroblastos, mientras que la capa más interna es más celular y es donde se encuentran las células osteoprogenitoras. El endostio está formado generalmente por una capa de células osteogénicas aplanadas, que recubren la cavidad de los huesos esponjosos, el conducto medular y los conductos de Havers y Volkmann [18]. Estas células progenitoras pueden diferenciarse hacia un fenotipo osteoblástico en respuesta a estímulos mecánicos que den lugar a señales osteoinductivas, formando parte de la red celular que regula la remodelación ósea [20].

Macroscópicamente, los huesos están formados por partes sin cavidades visibles —el hueso compacto o cortical— y por partes con muchas cavidades intercomunicantes —el hueso esponjoso o trabecular—. Las extremidades o epífisis de los huesos largos están formadas por hueso trabecular con una capa superficial compacta. La diáfisis está casi totalmente formada por tejido óseo cortical con pequeñas cantidades de hueso

## 1. Introducción

esponjoso en su parte más interna, delimitando el conducto medular. Las cavidades del hueso trabecular y el conducto medular de la diáfisis de los huesos largos están ocupadas por la médula ósea (Figura 1.5.) [18].



**Figura 1.5.** Esquema de la estructura de un hueso largo (imagen extraída y adaptada de Servier Medical Art).

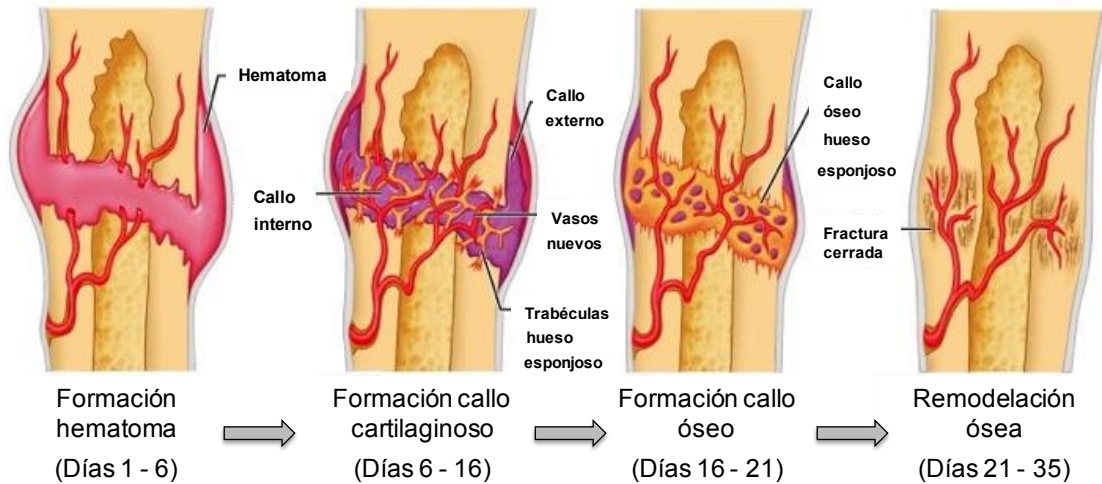
Microscópicamente, se pueden identificar dos tipos de hueso según las características del colágeno que forma la matriz ósea: el hueso reticular y el hueso laminar. El hueso reticular se caracteriza por fibras colágenas desordenadas al azar y es mecánicamente débil; se forma cuando los osteoblastos producen matriz ósea rápidamente como, por ejemplo, en la reparación de una fractura. Este hueso es posteriormente remodelado y sustituido por hueso laminar, que se caracteriza por una alineación regular y paralela del colágeno formando láminas y es mecánicamente fuerte [19].

La formación ósea tiene lugar por dos tipos de procesos diferentes, la osificación intramembranosa y la osificación endocondral. La formación ósea de tipo intramembranoso se caracteriza por la diferenciación de las células progenitoras mesenquimales a células de tejido condroide y la matriz extracelular del tejido condroide experimenta la subsiguiente mineralización. El tejido condroide es remodelado por la acción sucesiva de los osteoclastos y los osteoblastos que formarán el tejido óseo definitivo –osteonal o trabecular– de las estructuras óseas, como partes de la mandíbula, la clavícula y

muchos de los huesos craneales. La mayoría de los huesos, sin embargo, como los huesos largos o las vértebras, presentan una formación ósea de tipo endocondral. Este tipo de osificación involucra la diferenciación de las células progenitoras en condrocitos que son los responsables de formar un patrón cartilaginoso, que posteriormente es mineralizado y reemplazado por el tejido óseo [18,19].

El tejido óseo está sometido a cambios durante toda la vida del individuo. Durante el periodo de crecimiento el hueso está expuesto a procesos de remodelado óseo en los cuales los huesos cambian en forma o tamaño como consecuencia de influencias fisiológicas, enfermedades o fuerzas mecánicas ejercidas sobre éste. En la vida adulta estos procesos de remodelado óseo siguen activos como consecuencia de los diferentes cambios de carga mecánica, microfracturas o el mantenimiento de una homeostasis celular y mineral en el organismo. La remodelación ósea involucra dos procesos que se dan de forma simultánea, la reabsorción de hueso por parte de los osteoclastos y la formación de hueso nuevo por parte de los osteoblastos. Un desajuste en este equilibrio puede ocasionar enfermedades como osteoporosis, cuando hay un exceso de resorción ósea, u osteopetrosis, cuando hay un exceso de formación ósea [21].

En una situación de fractura o lesión ósea se activa una compleja cascada de eventos biológicos que inicia un proceso regenerativo y que da como resultado la reparación y restauración del tejido óseo y su función. Este proceso regenerativo involucra la osificación intramembranosa y endocondral al mismo tiempo, y también redes de señalización extra e intracelular entre los diferentes tipos celulares presentes en el tejido óseo y circundantes [22]. El daño tisular y vascular ocasionado genera la formación de un hematoma e inflamación, donde se liberan factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias que sirven de estímulo para que se activen los procesos de regeneración ósea. En las zonas alejadas de la fractura se inicia la formación de un callo óseo por acción de células osteoprogenitoras o células mesenquimales indiferenciadas que residen en el periostio, y que favorecidas por la revascularización, experimentan osificación intramembranosa, demostrado recientemente por Gallardo-Calero *et al.* [23]. En la zona adyacente a la fractura, la respuesta inflamatoria inicial estimula la angiogénesis y la formación de un tejido de granulación fibroso que servirá de base y en donde las células madre mesenquimales se diferenciarán en condroblastos y formarán un tejido cartilaginoso. Posteriormente, este tejido cartilaginoso será calcificado y reemplazado por tejido óseo que con el tiempo se remodelará y será sustituido por hueso laminar, regenerando y restaurando la estructura anatómica y funcional dañada (Figura 1.6.) [24,25].



**Figura 1.6.** Esquema de los procesos regenerativos en una fractura ósea (imagen extraída y adaptada de la página web <https://www.orthobullets.com/basic-science/9009/fracture-healing>).

### 1.3.2. Marcadores implicados en la regeneración ósea

Los procesos de regeneración ósea están regulados por factores y proteínas que involucran cascadas de señalización molecular intracelular y extracelular. Estas moléculas de señalización se engloban dentro de las citoquinas proinflamatorias (interleucinas IL-1 e IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa, *Tumor Necrosis Factor-alpha*, TNF- $\alpha$ ), los factores de crecimiento y diferenciación (la superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta –*Transforming Growth Factor-beta*, TGF- $\beta$ –) y los factores angiogénicos (factor de crecimiento vascular endotelial –*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF–) [24]. Estos factores y proteínas podrían ser útiles como biomarcadores para evaluar el metabolismo óseo, diagnosticar enfermedades óseas en fases iniciales o incluso monitorizar la evolución y eficiencia de tratamientos. La determinación de biomarcadores óseos en suero plasmático o muestras de orina podría suponer un buen método analítico no invasivo como alternativa a las actuales técnicas de imagen u otras metodologías de tipo invasivo como biopsias. Estos biomarcadores deben cumplir ciertos requisitos, como que puedan ser detectados de forma sensible y específica y que sean capaces de predecir procesos regenerativos óseos; de esta forma, podrían ayudar a evaluar la progresión en una situación de fractura o en otras situaciones en las que se requiera la reparación del tejido óseo, como en el caso de la necrosis ósea [26,27].

Varios estudios han evaluado diferentes marcadores óseos cuya asociación podría estar relacionada con diferentes estadios del proceso regenerativo óseo. Estos marcadores óseos podrían ayudar a predecir fases de formación o resorción ósea; sin embargo, los resultados aún no validan marcadores concretos que puedan ser del

todo predictivos y los resultados son heterogéneos, tanto a nivel preclínico [28,29] como a nivel clínico [27]. Uno de los marcadores que podría ser candidato a predecir el proceso de regeneración ósea sería la proteína reguladora TGF- $\beta$ 1. Esta proteína perteneciente a la familia de TGF- $\beta$  tiene un papel clave en la regeneración ósea en el aumento de la proliferación y la diferenciación de los progenitores mesenquimales y en la estimulación de la producción de matriz extracelular y la quimiotaxis de células osteoprogenitoras [27,30].

### **1.4. Medicina regenerativa y terapias avanzadas**

El tejido óseo presenta la ventaja innata, a diferencia de la mayoría de tejidos del organismo, de poder regenerarse completamente después de una lesión traumática gracias a un conjunto de procesos complejos altamente organizados. A pesar de esta capacidad, encontramos situaciones en la que se necesita un soporte terapéutico para facilitar la regeneración y la completa regeneración. Este soporte terapéutico podría venir facilitado por una nueva aproximación dentro de la medicina regenerativa y las terapias avanzadas, donde se engloban aquellos productos o medicamentos basados en el uso de genes o células o componentes derivados de la ingeniería tisular.

#### **1.4.1. Ingeniería tisular en la regeneración ósea**

La ingeniería tisular es el campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular o un órgano entero [31]. Dentro del campo de la cirugía ortopédica, la ingeniería tisular puede suponer una alternativa al uso de los injertos óseos para la regeneración ósea.

La cirugía ortopédica emplea el uso de injertos óseos en la reparación de pseudoartrosis, tumores óseos, osteonecrosis, artroplastias revisadas y fusiones vertebrales [32]. El tratamiento de elección actual para la regeneración ósea es el uso de autoinjertos óseos obtenidos del propio paciente de zonas como la cresta ilíaca. Estos injertos presentan propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas, además de ser histocompatibles y no inmunogénicos; sin embargo, están limitados en cantidad y presentan una morbilidad asociada al lugar de obtención. Los aloinjertos solventarían la disponibilidad de la cantidad y la morbilidad del lugar donante pero están asociados a un riesgo de infección y una posible respuesta inmune del tejido huésped. Los aloinjertos presentan propiedades osteoconductoras,

propiedades osteoinductivas reducidas y no presentan propiedades osteogénicas debido a que el procesado del tejido elimina el componente celular [32,33].

El desarrollo de productos de ingeniería tisular puede suponer un cambio en la práctica clínica al ofrecer una alternativa a los injertos óseos autólogos o alogénicos y puede ser beneficioso para aquellos pacientes que presenten un potencial regenerativo óseo reducido a causa de la edad, osteoporosis, alteraciones metabólicas, osteomielitis, tratamientos con radioterapia o defectos óseos segmentarios críticos [34,35]. La ingeniería tisular ósea se basa en el conocimiento de la estructura, la mecánica y la formación del tejido óseo para generar productos que permitan regenerar o reparar el tejido óseo dañado y requiere de procesos osteoproduktivos, osteoinductivos, osteoconductivos y de estímulos mecánicos [33,36].

Los productos de ingeniería tisular deben presentar una serie de elementos que pueden usarse solos o en combinación: una matriz o andamiaje biocompatible con el tejido huésped, señales morfogénicas y células osteogénicas; además, es necesaria una suficiente vascularización que permita el crecimiento y el aporte de nutrientes al tejido [20,33].

### **Matrices o andamiajes**

Las matrices o andamiajes, también llamados *scaffolds*, empleados en la ingeniería tisular ósea, deberían presentar una serie de características: deben ser biocompatibles, deben permitir su reabsorción para poder actuar como un marco temporal para las células hasta que se genere hueso *de novo*, deben presentar una integridad estructural y también características osteoconductivas; es decir, deben permitir que la matriz o el material facilite la adhesión, migración y diferenciación de progenitores osteoblásticos [34,37,38]. Idealmente deberían sustentar la formación ósea junto con una mineralización temprana, permitiendo su propia biodegradación una vez hayan cumplido su función, y conferir soporte estructural y estabilidad mecánica.

Entre los diferentes tipos de biomateriales usados en los *scaffolds* encontramos cerámicas naturales o sintéticas, siendo los más utilizados los basados en hidroxiapatita o en fosfatos de calcio ya que presentan propiedades osteoconductivas y biocompatibles y pueden ser integrados en el hueso huésped. Existen otros biomateriales que mimetizan el tejido óseo y presentan propiedades osteoinductivas y diferentes grados de porosidad basados en polímeros o compuestos que combinan cerámicas y polímeros en diferentes proporciones [32,33].

### Señales morfogénicas

La incorporación de factores de crecimiento y proteínas dentro o en la superficie de los *scaffolds* puede promover la formación ósea. Estos impulsarían la proliferación y la actividad de los osteoblastos, actuando como estímulos osteoinductivos, o la formación angiogénica induciendo la creación de nuevos vasos sanguíneos. Estos factores o proteínas pueden actuar localmente a nivel autocrino o paracrino [38]. Las proteínas óseas morfogénicas (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMP) forman parte de la superfamilia de TGF- $\beta$  y presentan actividades mitogénicas, diferenciadoras, quimiotácticas y osteolíticas [39]. Aunque existen más de 20 tipos de BMP, en el campo de la ingeniería tisular ósea se han empleado principalmente BMP-2 y BMP-7 como inductores de la formación ósea [40]. La incorporación de factores angiogénicos, como el VEGF, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*, FGF) promoverían la estimulación de la formación de nueva vascularización y de esta manera el aporte sanguíneo al *scaffold* implantado [11,34]. Estos factores angiogénicos están además relacionados con la regulación de la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos [20].

### Células osteogénicas

El componente celular de la ingeniería tisular ósea debe estar formado por células con capacidad de diferenciación hacia osteoblastos y que puedan promover la reparación y regeneración ósea, es decir, que sean osteoproductivas. Las células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells* o *Mesenchymal Stromal Cells*, MSC) presentan un papel predominante en la ingeniería tisular ósea debido a que son células madre adultas multipotentes con capacidad de auto-renovación y potencial para diferenciarse en diferentes tejidos como hueso, cartílago, tejido adiposo y otros tipos celulares (Figura 1.7.) [22,34,41].

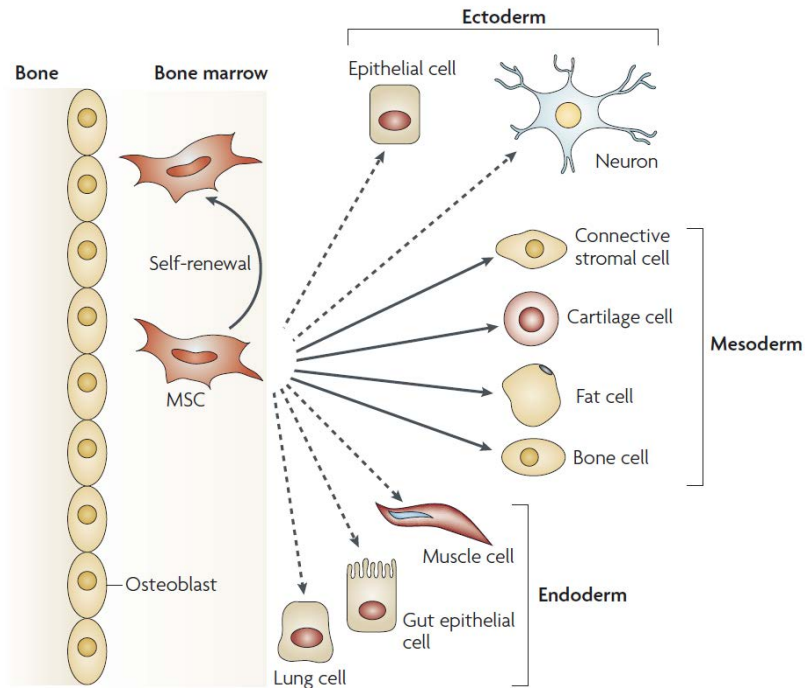


Figura 1.7. Esquema de la multipotencialidad de las MSC [41].

A pesar de que se ha considerado la médula ósea como la principal fuente de MSC, estas células se han aislado de diferentes tipos de tejidos, que incluyen tanto las de origen embrionario, las de origen fetal así como las de origen adulto [22,33,42,43]. Los tejidos de donde se han obtenido MSC están listados en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Tejidos de origen de las MSC [22,33,42,43]

<b>Embrionario</b>	Blastocisto	
<b>Fetal</b>	Tejido de cordón umbilical	
	Sangre de cordón umbilical	
	Placenta	
<b>Adulto</b>	Médula ósea	Dientes de leche
	Tejido adiposo	Cerebro
	Sangre periférica	Piel
	Membrana sinovial	Corazón
	Tejido muscular	Riñón
	Periostio	Hígado

Además de estos tejidos, se postula que las MSC también podrían encontrarse en el nicho perivascular de la mayoría de órganos del organismo [44]. Varios estudios sugieren que las MSC incluso podrían corresponderse *in vivo* con las células adyacentes al tejido endotelial conocidas como pericitos y con las células adventicias



localizadas en la capa más externa de las grandes arterias y venas puesto que en cultivo comparten similitudes [42,44,45].

También se han obtenido a partir de células madre pluripotentes inducidas (*Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC), manteniendo sus características de MSC *in vitro* e *in vivo* junto con una mayor capacidad de proliferación y menor senescencia. Aunque el uso de las MSC de origen embrionario y de iPSC presenta ciertas limitaciones a nivel de seguridad y regulación así como cuestiones éticas en su uso [22,33,42,43].

La médula ósea es un repositorio natural de MSC y se emplea como fuente de estas células madre adultas. Las MSC obtenidas a partir de la médula ósea presentan un interés dentro de la ingeniería tisular ósea debido a su alta capacidad osteogénica y a su extensiva caracterización a nivel *in vitro* y preclínico en diferentes modelos animales. Sin embargo, representan una pequeña fracción del total de las células nucleadas de la médula ósea (entre el 0,001-0,01 %) y necesitan su expansión *in vitro* para poder obtener un número elevado de células. Las MSC también pueden obtenerse de tejido adiposo, abundante y de fácil obtención a partir de liposucción, donde se encuentran en mayor proporción que en la médula ósea (entre el 1-5 % de las células aisladas). Las MSC derivadas de tejido adiposo pueden diferenciarse hacia varios linajes mesenquimales y también presentan características osteogénicas; a pesar de ello, algunos estudios resaltan que su capacidad osteogénica sería menor respecto a la de MSC obtenidas de médula ósea [33,34,42,43,46].

Debido a las diferentes fuentes de obtención y metodologías de aislamiento y expansión de las MSC descritas en la literatura, la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) [47] propuso en el año 2006 los criterios mínimos para definir las MSC humanas y así poder establecer un consenso entre la comunidad científica, resumidos en la Tabla 1.3. En primer lugar, deben presentar la capacidad de adherirse al plástico en condiciones de cultivo estándar. En segundo lugar, fenotípicamente, deben expresar marcadores de superficie característicos CD105, CD73 y CD90, y no expresar los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19 y HLA-DR. Y, finalmente, deben presentar la capacidad de multiplicarse y diferenciarse *in vitro* en los tres tipos principales de linajes mesenquimales, osteogénico, condrogénico y adipogénico, en condiciones de cultivo estándar de inducción de la diferenciación.

Tabla 1.3. Criterios mínimos de las MSC establecidos por la ISCT [47]

1. Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar		
2. Fenotipo	Positivo ( $\geq 95\%$ +)	Negativo ( $\leq 2\%$ +)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 o CD11b
		CD79 $\alpha$ o CD19
	HLA-DR	
3. Diferenciación <i>in vitro</i> a osteoblastos, condroblastos y adipocitos		

La propiedad de adherencia al plástico es compartida con otros tipos celulares y no garantiza una homogeneidad en la población celular aislada ni un potencial de proliferación y diferenciación [48]. Es necesario, por lo tanto, aplicar los tres criterios implantados por la ISCT para poder establecer una uniformidad entre los diferentes estudios con MSC que encontramos en la literatura.

Las MSC presentan la característica de poseer efectos regulatorios sobre las células del sistema inmune [41]. Se consideran células inmunoprivilegiadas puesto que expresan niveles intermedios de moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) HLA de tipo I, niveles bajos de moléculas HLA de tipo II y no expresan las moléculas coestimuladoras CD40, CD40L, CD80 y CD86. A pesar de la expresión de moléculas del MHC, no inducen una respuesta inmunogénica en el huésped [49,50]. Además, presentan propiedades inmunosupresoras al inhibir la respuesta alorreactiva de las células T en cultivos mixtos de linfocitos de origen alogénico, tanto las MSC indiferenciadas como diferenciadas a los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico [51]. La aplicación terapéutica de MSC de origen alogénico en constructos de ingeniería tisular estaría reforzada por estas propiedades.

Aunque estas características las proponen como excelentes candidatas para su uso en terapias alogénicas, diferentes estudios proponen que a medida que el proceso de diferenciación de las MSC tiene lugar, su condición de células inmunoprivilegiadas podría disminuir o revertirse hacia un estado inmunogénico. Esto podría condicionar su supervivencia *in vivo* a largo plazo y que sus propiedades terapéuticas se atribuyeran a un efecto paracrino al inicio de su trasplante, pero sin comprometer la seguridad en el organismo receptor [52].

La combinación del alto potencial proliferativo de las MSC junto con su capacidad de resistir las condiciones de criopreservación, permite que puedan expandirse de forma *in vitro* para obtener cantidades de células clínicamente relevantes. Estas

características, sumadas a sus propiedades inmunomoduladoras, permitirían proponer la creación de una línea celular universal alogénica dando lugar a un producto listo para usar a corto plazo (*off the shelf*) [33,53]. De esta manera, se podría evitar la morbilidad asociada a la extracción de médula ósea o tejido adiposo, se podría disponer de los tratamientos a través de bancos celulares donde se establecerían líneas con parámetros y características controladas previamente seleccionadas y se podría asegurar la esterilidad y compatibilidad a través de extensivos controles antes de llegar a los pacientes. Todo esto permitiría reducir el tiempo de disponibilidad en llegar al paciente, disminuyendo la duración de cultivo y caracterización celular así como los costes económicos [34].

Un último punto a tener en cuenta es la vascularización de los constructos de ingeniería tisular ósea, ya que juega un papel importante en cuanto al proceso regenerativo e integración de éstos en el tejido huésped. Es un desafío especialmente importante en el caso de aquellos defectos óseos de tamaño relevante, donde la difusión de los nutrientes a través de los capilares es limitada y la viabilidad de las células se reduce a aquellas localizadas más superficialmente. Existen diferentes estrategias que permitan la viabilidad celular del constructo una vez implantado, como el diseño de una matriz con poros que permitan el crecimiento vascular en su interior, la prevascularización *in vitro*, la combinación de cultivos de tipos celulares con capacidad intrínseca para formar estructuras vasculares o la adición de factores de crecimiento angiogénicos como el VEGF [33,43].

El éxito de las nuevas terapias basadas en la ingeniería tisular ósea debería juzgarse por los buenos resultados clínicos finales, es decir, la ausencia de deformidades u otros efectos adversos y la completa o parcialmente completa recuperación funcional del paciente. Para ello, el hueso nuevo formado debe integrarse estructuralmente con el hueso huésped y debe ser remodelado de manera que pueda proporcionar propiedades mecánicas de carga y resistencia a la fatiga, necesarias para una función duradera y efectiva [37,38].

### **1.4.2. Terapia celular en la regeneración ósea**

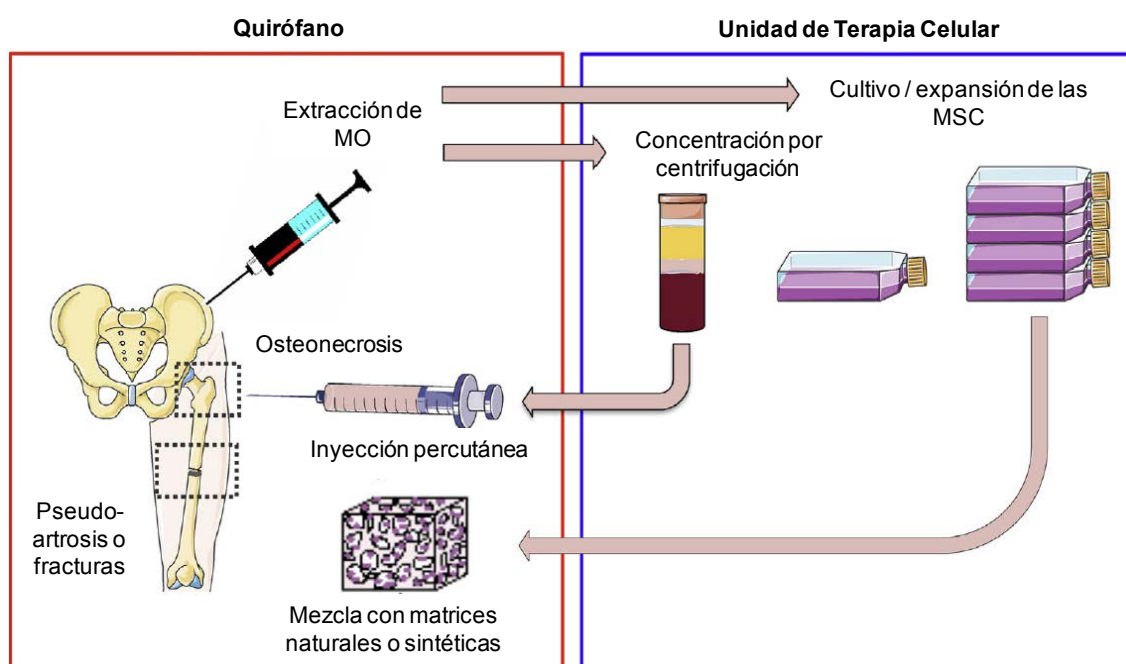
La cirugía ortopédica ha empezado a introducir en la práctica clínica procedimientos de terapia celular para el tratamiento de la patología musculoesquelética. Estos procedimientos se han centrado en la regeneración ósea de fracturas, osteonecrosis, pseudoartrosis y defectos segmentarios, en la regeneración de cartílago articular en articulaciones artrósicas o lesionadas, en la regeneración de lesiones en tendones y

ligamentos y en el reemplazo de discos intervertebrales. En el caso de la regeneración ósea de forma concreta, la terapia celular basada en el uso de MSC puede suponer una alternativa al uso de injertos óseos autólogos para promover la reparación tisular, ayudando a conservar las existencias autólogas de hueso y a hacer los tratamientos menos invasivos [53,54]. Esta aplicación también se extendería a situaciones en las que habría una deficiencia de células osteoprogenitoras, como en los defectos óseos segmentarios, en zonas extensas con tejido cicatricial por una lesión o cirugía previa, en lugares donde ha habido una infección previa o radiación, alteraciones o enfermedades del tejido óseo como osteonecrosis u osteoporosis, o en zonas con una vascularización comprometida. Estas circunstancias, juntamente con la aplicación de tratamientos farmacológicos o quimioterapéuticos, podrían limitar el número o la función de estos progenitores óseos y alterar los procesos regenerativos en los pacientes afectados [38]. Por otro lado, se ha estudiado que con la edad el número de MSC de la médula ósea desciende [55,56] y su capacidad de diferenciación estaría desviada hacia el linaje adipogénico a costa del osteogénico [57]. Por lo tanto, el uso de MSC en terapia celular para la regeneración ósea parte de las ventajas que estas células presentan y que se reportan en estudios *in vitro*, preclínicos y clínicos: su capacidad para promover una reparación estructural y funcional de los tejidos mediante la diferenciación a osteoblastos y la secreción de moléculas anti-inflamatorias, antiapoptóticas y tróficas que promueven un ambiente regenerativo en la zona afectada, así como su baja inmunogeneicidad y efectos inmunomoduladores [41]. Se han descrito muy pocos efectos adversos y, aunque pueda existir un riesgo potencial de tumorigénesis asociado a respuestas por la supresión del sistema inmune, hay un acuerdo general que sustenta su seguridad basado en la ausencia de casos de transformación tumoral de estas células tanto a nivel *in vitro* y preclínico como en los ensayos clínicos realizados en humanos hasta la fecha [41,42,58,59].

Existen diferentes modalidades terapéuticas en las que se pueden emplear MSC de médula ósea, expandidas *ex vivo* o sin expandir, y en combinación o no con diferentes tipos de matrices [60]. Asimismo, las MSC pueden aplicarse en monocultivos, o bien, en cocultivos combinándolas con otros tipos celulares como, por ejemplo, con progenitores o células endoteliales [61].

Uno de los primeros métodos de tratamiento que se propuso consistió en la aspiración de médula ósea autóloga y su posterior reinyección percutánea en la zona lesionada. La fracción de células mononucleadas (CMN) presentes en la médula ósea y que se inyecta se compone de monocitos, linfocitos y precursores hematopoyéticos y mesenquimales. Una de las limitaciones que presentaría este sistema es el reducido

número de precursores mesenquimales presentes en la médula ósea, pero que podría solventarse mediante la concentración por centrifugación del número de CMN obtenidas en la fracción aspirada. De esta manera se aumentaría la concentración celular y, por lo tanto, de MSC aplicadas [53,60]. Otra aproximación consistiría en el tratamiento con MSC expandidas *ex vivo*. Tal y como se ha explicado en el apartado anterior, gracias a las excelentes propiedades de cultivo de las MSC es posible expandirlas *in vitro* y así obtener elevados números celulares antes de reimplantarlas nuevamente. Las MSC expandidas pueden inyectarse de forma percutánea, aplicarse en combinación con biomateriales o cultivarse en la superficie de diferentes biomateriales o matrices antes de su aplicación en el defecto (Figura 1.8.) [43,49,53].



**Figura 1.8.** Aplicaciones de terapia celular avanzada en cirugía ortopédica (imagen adaptada de Stanovici *et al.* [53]).

Gracias a que las MSC tienen la capacidad de auto-renovación y diferenciación hacia el tejido óseo, unas excepcionales capacidades de cultivo y expansión *ex vivo* y que su origen de la médula ósea podría involucrar una mayor capacidad osteogénica respecto de otros tejidos, su aplicación en terapias celulares para la regeneración ósea en un escenario de osteonecrosis podría suponer el enfoque terapéutico que queremos encontrar para solventar las limitaciones en las terapias disponibles actualmente y aumentar las posibilidades de regeneración y mejora en la calidad de vida de los pacientes afectados.

### 1.5. Ingeniería tisular y terapia celular avanzada en el tratamiento de la ONCF

Un claro ejemplo donde la combinación de la ingeniería tisular y la terapia celular avanzada podrían suponer una solución terapéutica que ayude a estimular la formación ósea, es en una situación tan desfavorecida e incapacitante como la ONCF.

A pesar de que este campo se está desarrollando e incrementando de forma exponencial en los últimos años y que promete la posibilidad de un gran abanico de terapias alternativas a las que actualmente conocemos, aún queda un largo camino por recorrer tanto a nivel preclínico como clínico. A continuación repasaremos los estudios preclínicos y clínicos aplicados en el tratamiento de la ONCF que podemos encontrar en la literatura actualmente.

#### 1.5.1. Estudios preclínicos

Los resultados obtenidos en estudios *in vitro* pueden ser difíciles de extrapolar a situaciones *in vivo*. Por esta razón, el uso de modelos animales es necesario para poder evaluar la seguridad y la eficacia de nuevas terapias antes de dar el salto a un uso clínico en humanos. Aunque los ensayos *in vitro* son un paso inicial necesario en el desarrollo de nuevos tratamientos, estos tipos de test nos aportan información sobre mecanismos biológicos fundamentales, citotoxicidad, genotoxicidad, proliferación y diferenciación celular, pero no son capaces de darnos información acerca de la respuesta de los tejidos a esos materiales, es decir, de la biocompatibilidad. Los modelos preclínicos *in vivo* pueden ofrecer la reproducción de una situación aproximada a la clínica real, además de resultados en relación a la cinética y distribución de fármacos o agentes bioactivos y a la biocompatibilidad y propiedades de degradación de los materiales implantados [62,63].

Podemos encontrar diferentes tipos de modelos experimentales empleados en el ámbito de la investigación en ortopedia para el estudio de nuevas terapias de ingeniería tisular y celular. Pequeños mamíferos, principalmente rata y ratón, se emplean sobretodo en estudios de viabilidad o bioactividad donde los resultados pueden determinarse después de periodos cortos de estudio. Ofrecen las ventajas de un fácil manejo, reducido coste y disponibilidad de variantes modificadas genéticamente. Sin embargo, biológicamente presentan diferencias en comparación con los humanos en cuanto a un crecimiento óseo continuo, la ausencia de cierre fisario, un contenido limitado en hueso trabecular y la falta de remodelación secundaria

o Haversiana. Por otro lado, los grandes mamíferos como el conejo, el perro, la cabra, la oveja y el cerdo, permiten realizar procedimientos quirúrgicos más complejos, la aplicación de implantes o materiales de mayor tamaño o similares a los empleados en los humanos y la aplicación de cargas *in vivo* sobre éstos y, además, el estudio de difusión a larga distancia. Concretamente, los estudios preclínicos traslacionales en ortopedia se centran en animales grandes, maduros esqueléticamente, donde el perro, la oveja y el cerdo son las especies de elección gracias a su tamaño y similitudes en composición y metabolismo óseo. Cada animal presenta sus ventajas y desventajas, aunque cabe remarcar que en los últimos años el número de ovejas empleadas en estudios ortopédicos ha ido en aumento. Este incremento podría deberse principalmente a cuestiones éticas y de percepción pública en el uso de animales de compañía para investigaciones médicas [62–66]. Además, las ovejas presentan la ventaja de tener un comportamiento apacible, lo que facilita el manejo y permite la obtención de una cantidad de muestras sanguíneas en mayor cantidad y frecuencia respecto a otras [67]. Por otro lado, las ovejas presentan un peso y unas dimensiones de los huesos largos similares a los humanos pero también semejanzas en el metabolismo y remodelación ósea. A nivel histológico, se ha descrito que las ovejas jóvenes presentan una estructura ósea predominantemente primaria o reticular pero que con la edad va prevaleciendo una estructura secundaria u osteonal, asemejándose al tejido óseo humano [62–66]. A pesar de ser un animal cuadrúpedo, la anatomía de las extremidades posteriores permite que puedan compararse a las extremidades inferiores en humanos. Esto se debe a que las fuerzas biomecánicas aplicadas en el fémur y tibia ovinas presentan un vector similar al de los humanos, permitiendo que la locomoción cuadrúpeda en estos animales sea parecido a la de los bípedos [65], aunque la distribución de cargas sea distinta. Por todas estas razones explicadas anteriormente, el modelo ovino puede suponer un buen modelo animal en los estudios preclínicos traslacionales en ortopedia.

### **Modelos preclínicos experimentales de ONCF**

El estudio de la ONCF se ha realizado en varios modelos animales experimentales donde se ha replicado un estado de carencia vascular o se ha inducido una lesión directa en la cabeza femoral para crear una situación de osteonecrosis. Estos modelos animales son necesarios para, en primer lugar, poder entender la evolución de este proceso y, en segundo lugar, poder estudiar nuevos tratamientos de forma preclínica antes de trasladarlos a la clínica humana. Es necesario tener en cuenta que la situación clínica y la experimental son similares, no equivalentes. La experimentación

de nuevas aproximaciones terapéuticas para la ONCF se lleva a cabo principalmente en animales sanos, cuyo tejido y capacidad regenerativa está en óptimas condiciones. Sin embargo, en una situación clínica, los pacientes frecuentemente presentan enfermedades musculoesqueléticas o sistémicas asociadas o concomitantes [68].

Podemos encontrar modelos preclínicos experimentales donde una situación de ONCF se produce de forma espontánea o puede ser inducida de forma experimental. Los modelos animales donde la ONCF se produce de forma espontánea no son los más habituales, se centran en las especies de rata y perro y se asemejan más concretamente a la enfermedad de Legg-Calvé-Perthes. Kikkawa *et al.* [69] describieron un modelo de ratas hipertensivas espontáneas en las que una expresión defectuosa del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor-1*, IGF-I) impedía la correcta mineralización y osificación de la epífisis femoral generando una oclusión vascular por la vulnerabilidad mecánica del tejido, que acababa colapsando. Esta interrupción física del aporte sanguíneo sería la causante de la situación de ONCF pero no de forma irreversible. Brenig *et al.* [70] describieron que algunas razas de perros pequeños presentan una patología similar a la ONCF de origen idiopático, también muy parecida a la enfermedad de Legg-Calvé-Perthes.

Los modelos animales donde se induce de forma experimental tienen el objetivo de crear lesiones osteonecróticas de forma irreversible en la cabeza femoral. La inducción puede realizarse mediante varias metodologías, como la privación vascular por acción quirúrgica, por el tratamiento con corticosteroides, mediante la aplicación de bajas dosis de lipopolisacáridos (LPS), por una reacción inmune en animales sensibilizados o mediante la creación de una lesión química o física directamente en la cabeza femoral [68,71].

La privación vascular puede realizarse por acción quirúrgica o de forma traumática. La acción quirúrgica consiste en la cauterización, ligación o embolización de los vasos sanguíneos que cubren la cabeza femoral para producir una situación de isquemia y posterior necrosis del tejido óseo y se han descrito estos procedimientos en ratas [72], conejos [73], perros [74,75] y cerdos [76,77]. La disrupción del aporte sanguíneo de forma traumática por dislocación y osteotomía del cuello femoral se ha descrito principalmente en perros [78,79].

La medicación con corticosteroides en pacientes se ha relacionado como un factor de riesgo en la aparición de ONCF [7]. De modo que la administración de altas dosis de corticosteroides en conejos se ha visto que puede dar al lugar al desarrollo de émbolos grasos que bloqueen los vasos que irrigan la cabeza femoral causando la necrosis del



tejido óseo [68]. Este tipo de inducción también se ha realizado mediante la administración de glucocorticoides en ratas [80] y en conejos [81,82], donde se ha observado la generación de osteonecrosis en el tejido óseo femoral posterior a su aplicación.

Mediante un mecanismo similar al uso de corticosteroides, la inyección intravenosa de bajas dosis de LPS daría lugar a una necrosis multifocal debido a la gran cantidad de trombos de fibrina formados por reacción a la endotoxina y que bloquearían la irrigación de la cabeza femoral [68]. Este sistema se ha descrito principalmente en conejos, con la aplicación de solamente LPS [83] o en combinación con corticosteroides [84], y en un modelo bípedo en emú [85]. Y de forma también parecida, la aplicación de sueros exógenos a conejos sensibilizados puede producir lesiones osteonecróticas en la cabeza femoral debido a la formación de complejos antígeno-anticuerpo que se depositan en las paredes vasculares que la irrigan [68]. Se ha descrito la creación de un modelo en conejo de ONCF inducido con la inyección intravenosa de suero de caballo inactivado por calor [86] o combinándola con la administración de corticosteroides [87].

La inyección intraósea de etanol puede generar lesiones químicas en el tejido óseo. La aplicación de este agente tóxico se ha empleado en modelos animales como la cabra [88], oveja [89,90] y perro [91], donde se genera una situación de deshidratación celular afectando tanto directamente a los osteocitos como causando daño a la microvasculatura de la cabeza femoral.

Finalmente, las lesiones físicas como la criogenia o la hipertermia pueden causar la muerte celular por estrés térmico e inducir apoptosis y daño vascular mediante la oclusión trombótica en la microvasculatura [71]. La combinación de ciclos de criogenia, por aplicación directa de nitrógeno líquido sobre la cabeza femoral, alternados con ciclos de hipertermia por aplicación de suero salino caliente, se ha empleado en el desarrollo de modelos animales de ONCF en conejo [92], avestruz [93] y cerdo [94]. En otros modelos se han combinado los ciclos de criogenia-hipertermia con la ligadura vascular de las arterias circunflejas femorales, descritos en emú [95], cabra [96,97], oveja [98] y cerdo [94]. Otros sistemas más avanzados consisten en el uso de criosondas con circulación interna de nitrógeno líquido acopladas a un sistema de inducción de calor, descritos en la literatura en un modelo en emú [99,100], o con un sistema interno de gases presurizados de argón-helio en conejos [101]. Estas criosondas permiten además combinar ciclos de frío y calor de manera controlada y monitorizada asegurando una metodología con una mayor reproducibilidad y de una forma menos invasiva que los métodos anteriores. Otro tipo de lesiones físicas para la generación de

modelos animales de ONCF se han realizado mediante la aplicación de microondas en conejos [102] o de ultrasonidos de alta intensidad en perros [103] que inducen una lesión en el tejido óseo por hipertermia con temperaturas superiores a los 45° C.

Independientemente del tipo de inducción, la finalidad es poder conseguir un modelo animal que permita reproducir una situación de ONCF donde posteriormente poder aplicar los tratamientos experimentales y estudiar su seguridad y eficacia.

### **Estudios preclínicos de regeneración ósea en modelos experimentales de ONCF**

En la literatura podemos encontrar diferentes estudios preclínicos en los que se ha estudiado la seguridad de la aplicación de MSC de origen autólogo o alogénico y los beneficios que puedan presentar en la estimulación de la osteogénesis y la reparación del tejido necrótico. En cuanto a la seguridad, se ha estudiado la respuesta del organismo a la implantación en forma de potenciales efectos adversos y su biodistribución. En relación a la eficacia, se ha estudiado la capacidad de las MSC, previamente expandidas en cultivo e implantadas, para diferenciarse en osteoblastos y promover de forma directa o indirecta la formación de hueso nuevo y de esta forma evitar el progreso hacia el colapso de la cabeza femoral. El uso de tipos celulares homólogos en los modelos animales empleados es fundamental para evitar el rechazo que podría ocasionar la administración de células de origen humano [104].

Uno de los primeros estudios descritos fue el de Yan *et al.* [78], donde en un modelo canino de ONCF traumática inyectaron MSC de médula ósea autólogas expandidas *ex vivo* y marcadas con GFP (*Green Fluorescent Protein*) por el túnel de DC a través del trocánter mayor. Observaron que era posible detectar MSC marcadas con GFP en la región necrótica de la cabeza femoral desde la semana 2 hasta la semana 12 postimplantación y que, además, expresaban el marcador osteoblástico de osteocalcina. Los resultados histológicos demostraron una mayor formación ósea en el grupo trasplantado con MSC respecto al grupo control. Posteriormente, Song *et al.* [84] implantaron MSC de médula ósea autólogas expandidas *ex vivo* en un modelo de ONCF en conejo. La implantación de MSC en suspensión a través del túnel de DC aumentó la presencia de osteoblastos envolviendo las trabéculas de la cabeza femoral y también los capilares, en comparación con el grupo control, al que no se administraron MSC. Otro estudio similar fue realizado por Lebouvier *et al.* [105] en un modelo porcino, al cual administraron MSC expandidas porcinas autólogas o de origen humano por el túnel de DC y estudiaron la biodistribución de las MSC a los 30 minutos y a las 24 horas postimplantación. Observaron que las células permanecían

confinadas en el lugar de implantación y no se detectaron en otros tejidos como sangre, pulmones, hígado, etc., o tejidos periféricos como la cápsula femoral o músculos periarticulares. Por otro lado, en un cerdo joven diagnosticado de ONCF aplicaron MSC porcinas autólogas y reportaron la completa regeneración del tejido necrótico a las 9 semanas. En otro modelo canino de ONCF, Jin *et al.* [106] administraron a través de la arteria femoral una solución con MSC autólogas expandidas marcadas con bromodesoxiuridina (BrdU). A las 8 semanas posinfusión, encontraron que parte de las MSC positivas para BrdU migraron hacia el tejido necrótico de la cabeza femoral pero también fueron detectadas en otros tejidos, especialmente en el corazón, vesícula biliar, riñón, hígado y estómago. La mayoría de las MSC marcadas con BrdU encontradas en la cabeza femoral expresaban, además, osteocalcina, sugiriendo que no solamente migraron hacia la región necrótica sino que además se diferenciaron hacia osteoblastos. Los resultados histológicos mostraron que el grupo que recibió las MSC mostró un volumen de tejido óseo necrótico menor y un porcentaje de volumen trabecular óseo mayor respecto al grupo control. Estos estudios descritos tienen en común la administración de MSC de origen autólogo en suspensión en diferentes modelos preclínicos de ONCF y el resultado de que las MSC tendrían la capacidad de migrar hacia la zona osteonecrotica de la cabeza femoral así como un posible papel en la mejora de la regeneración tisular.

Incorporando el uso de matrices asociadas a las MSC, Vélez *et al.* [107] estudiaron, en un modelo ovino de ONCF previamente descrito [98], la capacidad de regeneración de un producto de ingeniería tisular y terapia celular basado en MSC de médula ósea autóloga ovina expandidas *ex vivo* y cultivadas en partículas óseas desvitalizadas provenientes de banco de tejidos. Estas partículas óseas colonizadas se mezclaron con fibrina y se implantaron de forma percutánea a través del túnel de DC, estableciendo una técnica con una baja morbilidad y mínimamente invasiva que podría ser transferida a una situación clínica. Observaron que el grupo tratado con este producto experimental presentó una tendencia hacia un mayor volumen de hueso nuevo formado respecto al grupo del producto sin carga celular y el grupo control al que solamente se le realizó la DC. La aplicación de MSC ovinas de origen autólogo y expandidas *ex vivo* en esta matriz estimularía la formación de hueso nuevo de forma mucho más efectiva que en los otros dos grupos, ya que combinaría las propiedades estructurales y osteoconductoras de las partículas óseas con la capacidad osteoprodutiva de las células. Siguiendo el mismo procedimiento de inducción de la lesión y técnica de tratamiento, Caminal *et al.* [104] trataron una oveja con el mismo producto, pero en este caso las MSC ovinas autólogas estaban marcadas con eGFP

(*enhanced Green Fluorescent Protein*) y durante un periodo de tiempo más extenso. Observaron que al cabo de los tres meses posteriores a la implantación se detectaron células positivas para eGFP en el análisis histológico, confirmando que las MSC autólogas expandidas *ex vivo* implantadas sobrevivieron a ese periodo de tiempo y se diferenciaron a osteoblastos y osteocitos funcionales.

De forma global, estos estudios demuestran que la administración de MSC autólogas expandidas es segura, puesto que no reportaron alteraciones clínicas en los animales que cuestionara la seguridad y no habría riesgo de transformación celular debido al cultivo y expansión *ex vivo*. Además, las MSC autólogas implantadas podrían sobrevivir, proliferar y diferenciarse hacia osteoblastos en una cabeza femoral isquémica y que podrían haber contribuido a acelerar el proceso regenerativo óseo endógeno.

La aplicación de MSC de origen alogénico para la regeneración ósea también se ha utilizado en modelos preclínicos de ONCF para estudiar su seguridad y eficacia terapéutica. En el estudio de Li *et al.* [92], MSC de origen alogénico marcadas con GFP se administraron a través de la vena auricular en un modelo de conejo con ONCF inducida por crioterapia. Reportaron la presencia de células marcadas en la zona de tejido necrótico de la cabeza femoral al cabo de 2, 4 y 6 semanas posteriores a la administración, pero también en otros tejidos como la cabeza femoral contralateral, pulmones e hígado, aunque en menor cantidad. Estos resultados llevarían a pensar que las MSC alogénicas podrían migrar hacia el tejido lesionado y sobrevivir durante ese periodo de estudio. No observaron manifestaciones agudas o crónicas de reacciones tóxicas posteriores a la implantación en estos animales. En un modelo similar posterior, Li *et al.* [108], observaron que esta administración además podría fomentar la regeneración del tejido óseo y vascular, así como estimular la expresión de genes relacionados con la formación ósea.

El uso de MSC alogénicas en la regeneración ósea también se ha estudiado en otros modelos preclínicos basados en la creación de defectos segmentarios críticos. Uno de los primeros estudios descritos fue el Arinzeh *et al.* [109] que implantaron en un modelo canino de defectos segmentarios críticos diafisarios femorales, cilindros de hidroxiapatita y TCP cargados con MSC caninas alogénicas expandidas. Los investigadores observaron que sin la aplicación de terapia inmunosupresora no se detectaron respuestas inmunes de tipo adverso en ninguno de los animales; además, la implantación habría estimulado la formación de hueso nuevo en las zonas de unión huésped-material y en el interior de los poros de los cilindros implantados. Un resultado similar obtuvieron Berner *et al.* [110] después de implantar *scaffolds* de policaprolactona y  $\beta$ -TCP cargados con MSC ovinas alogénicas expandidas en un

modelo ovino de defectos segmentarios críticos en tibia. El seguimiento clínico y analítico de las ovejas después de la implantación no reveló ninguna evidencia detectable de reacción a cuerpo extraño o rechazo celular a las MSC de origen alogénico. En cuanto a la capacidad regenerativa, los grupos celulares de origen autólogo y alogénico presentaron resultados equiparables en cuanto a propiedades biomecánicas y radiológicas y en la nueva formación ósea. Asimismo, Guo *et al.* [111] observaron resultados similares 16 semanas después de trasplantar matrices de  $\beta$ -TCP cargadas con MSC porcinas alogénicas y autólogas expandidas en un modelo de defectos segmentarios críticos en tibia. En su estudio, no observaron cambios en la expresión de los linfocitos T de sangre periférica ni alteraciones en la expresión de las interleucinas IL-2 e IL-10 que indicaran una situación de respuesta inmunitaria. La regeneración ósea, en su estudio, también fue similar en ambos grupos celulares. Finalmente, Udehiya *et al.* [112] y Kang *et al.* [113] llegaron a la misma conclusión que los estudios anteriormente mencionados al comparar el potencial regenerativo de MSC de médula ósea de conejos expandidas *in vitro* de origen autólogo o alogénico implantadas en sus modelos animales. Ambos grupos celulares presentaron de forma comparable la regeneración del tejido en el defecto óseo sin evidenciar una respuesta inmune contra los tratamientos alogénicos.

Dando un paso más adelante en el desarrollo biomédico, la incorporación de la ingeniería genética podría aportar un aumento en la cantidad de factores de crecimiento o proteínas osteoinductores liberados por las MSC. Los estudios preclínicos que han incorporado esta herramienta muestran buenos resultados a nivel de estimulación en una respuesta osteogénica, o incluso podría ser mayor en comparación con la aplicación de MSC no modificadas genéticamente, como en el caso del estudio reportado por Hang *et al.* [79]. A pesar de poder obtener unos resultados efectivos, hay que tener en cuenta que la traslación de las terapias celulares avanzadas con modificaciones genéticas a un entorno clínico puede verse dificultada por el hecho de usar células transducidas con plásmidos o vectores de origen viral, como adenovirus, lentivirus o virus adenoasociados, y el consiguiente riesgo de respuesta inmunológica o mutagénesis.

En la Tabla 1.4. se resumen las características de los modelos preclínicos y los tratamientos experimentales recibidos descritos en los párrafos anteriores.

Tabla 1.4. Estudios preclínicos con terapia celular para regeneración ósea

Autor (Año)	Modelo Animal	Tipo de lesión	Tipo celular	Origen	Solución o scaffold implantado	Administración
Yan <i>et al.</i> (2009) [78]	Perro	ONCF traumática por dislocación y osteotomía	MSC expandidas transfectadas con GFP	Autólogo	5 mL suspensión celular	Inyección a través de un catéter epidural en la cabeza femoral
Vélez <i>et al.</i> (2012) [107]	Oveja	ONCF inducida por ligación vascular y crioterapia	MSC expandidas	Autólogo	Partículas de hueso desvitalizado colonizadas	Implantación a través del túnel de DC
Song <i>et al.</i> (2015) [84]	Conejo	ONCF inducida por LPS y esteroides	MSC expandidas	Autólogo	1 mL PBS	Implantación a través del túnel de DC
Lebouvier <i>et al.</i> (2015) [105]	Cerdo	Sin inducción / ONCF natural	MSC expandidas	Autólogo y xenogénico	7 mL albúmina de suero humano 5 %	Implantación a través del túnel de DC
Jin <i>et al.</i> (2016) [106]	Perro	ONCF inducida por nitrógeno líquido	MSC expandidas marcadas con BrdU	Autólogo	1 mL solución salina 0,9 %	Perfusión a través de la arteria femoral
Caminal <i>et al.</i> (2016) [104]	Oveja	ONCF inducida por ligación vascular y crioterapia	MSC expandidas transfectadas con GFP	Autólogo	Partículas de hueso desvitalizado colonizadas	Implantación a través del túnel de DC
Arinze <i>et al.</i> (2003) [109]	Perro	Defecto segmentario crítico	MSC expandidas	Alogénico	Scaffold de hidroxiapatita-TCP	Implantación en el defecto de la diáfisis femoral
Guo <i>et al.</i> (2009) [111]	Cerdo	Defecto segmentario crítico	MSC expandidas e inducidas al linaje osteogénico	Alogénico y autólogo	Scaffold de $\beta$ -TCP	Implantación en el defecto de la diáfisis tibial
Li <i>et al.</i> (2011) [92]	Conejo	ONCF inducida por crioterapia	MSC expandidas transfectadas con GFP	Alogénico	3 mL suspensión celular	Inyección a través de la vena auricular
Li <i>et al.</i> (2013) [108]	Conejo	ONCF inducida por crioterapia	MSC expandidas	Alogénico	2 mL suspensión celular	Inyección a través de la vena auricular
Berner <i>et al.</i> (2013) [110]	Oveja	Defecto segmentario crítico	MSC expandidas e inducidas al linaje osteogénico	Alogénico y autólogo	Scaffold de policaprolactona y $\beta$ -TCP	Implantación en el defecto de la diáfisis tibial
Udehiya <i>et al.</i> (2013) [112]	Conejo	Defecto segmentario	MSC expandidas	Alogénico y autólogo	Gránulos de hidroxiapatita	Implantación en el defecto de la diáfisis radial
Kang <i>et al.</i> (2014) [113]	Conejo	Defecto segmentario	MSC expandidas	Alogénico y autólogo	Gránulos de hueso trabecular	Implantación en el defecto de la diáfisis radial

### 1.5.2. Estudios clínicos

A nivel clínico encontramos que la ingeniería tisular y la terapia celular se han ido introduciendo de forma progresiva como nuevas opciones terapéuticas para los estadios iniciales de la ONCF. A pesar del esfuerzo y de las técnicas en desarrollo de la ingeniería tisular en el campo de la regeneración ósea, pocas estrategias han sido trasladadas a la práctica clínica y ninguna de ellas se ha convertido en un estándar de tratamiento todavía [46]. En el caso de productos de ingeniería tisular, con o sin terapia celular, actualmente están limitados a aplicaciones en casos puntuales de pacientes [61] pero se espera que en un futuro representen una solución extendida dentro del campo de la ortopedia. La aplicación de MSC como terapia celular sí que está más extendida en la práctica clínica y se han desarrollado varios ensayos clínicos de fase I-II para demostrar la seguridad y la eficacia de su aplicación, tanto para la ONCF como para otras enfermedades [114]. Una de las razones para apostar por la terapia con MSC es que se ha descrito que la patogénesis de la ONCF humana podría estar relacionada con un origen celular en la cual los niveles de actividad y número de MSC estarían reducidos [115], así como su capacidad de replicación [116] y de diferenciación [117]. Esto reforzaría la aplicación de tratamientos basados en terapia celular avanzada con MSC, podría tener un gran potencial regenerativo a nivel clínico y sería un nuevo planteamiento para disminuir la tasa de fallo terapéutico y detener la progresión de la ONCF hacia una situación de colapso de la articulación de la cadera en los estadios iniciales [10,118–120].

Hernigou *et al.* [121] fueron pioneros en la aplicación de trasplantes de médula ósea como terapia celular para estimular la regeneración ósea en un paciente con osteonecrosis en la cabeza del húmero izquierdo secundaria a anemia de células falciformes. Observaron que tras el trasplante de médula ósea de un donante compatible sano, el tejido óseo necrótico de la cabeza del húmero presentó signos de regeneración, posiblemente relacionados con el restablecimiento de la microcirculación sanguínea. El trasplante de médula ósea en la cabeza femoral supondría la aplicación de MSC y células endoteliales dotadas de propiedades osteogénicas y angiogénicas en la zona lesionada. Estas células incrementarían, por un lado, el número de células funcionales propiamente y, por otro lado, el aporte de factores osteogénicos y angiogénicos. Estos factores presentes en la médula ósea como FGF, TGF- $\beta$ , PDGF y VEGF serían un complemento terapéutico añadido para promover la formación ósea [118,119].

Posteriormente, se iniciaron los primeros ensayos clínicos aplicando concentrados de CMN provenientes de médula ósea autóloga para el tratamiento de la ONCF con el

objetivo de incrementar el número de células progenitoras. Estos primeros ensayos planteados por Gangji *et al.* [122] y Hernigou *et al.* [123] aplicaron concentrados de médula ósea mediante su inyección en la cabeza femoral de forma percutánea mediante un trocar. Se basaron en la hipótesis de que su aplicación promovería la repoblación de progenitores óseos del tejido necrótico y favorecería la revitalización y remodelación ósea. Los resultados de Gangji *et al.* [122] mostraron que el grupo de estudio al que aplicaron los concentrados reportó una disminución en el dolor y un retraso en la progresión de la enfermedad durante el tiempo de seguimiento del ensayo. Hernigou *et al.* [123] observaron diferencias en la progresión de la enfermedad entre pacientes en función del número de CMN recibidas en los concentrados. Los pacientes que recibieron concentrados con mayor número de células presentaron un mejor resultado clínico y un menor ratio de colapso de la cabeza femoral respecto a aquellos pacientes que recibieron un menor número de células trasplantadas.

A partir de entonces se han seguido realizando otros ensayos clínicos en los que se han aplicado concentrados de médula ósea autóloga en solución o mezclados con diferentes matrices y mediante diversos métodos de trasplante. Entre estos métodos se incluye la aplicación directa de la solución o matriz a través del túnel de DC, mediante la perfusión selectiva por la arteria femoral o por la cateterización de las arterias que irrigan la cabeza femoral [3,124]. La limitación en el uso de concentrados de médula ósea es debida a la alta variabilidad en el número de CMN obtenidas en cada extracción. La aplicación de MSC expandidas *ex vivo* permitiría resolver las variaciones de dosis de cada concentrado obtenido. Kawate *et al.* [125] aplicaron esta estrategia y trataron a tres pacientes afectados de ONCF con MSC expandidas y cultivadas en una matriz de  $\beta$ -TCP para inducir la diferenciación osteogénica, en combinación con un injerto de peroné vascularizado. Durante los meses de seguimiento los pacientes no experimentaron una progresión de la enfermedad y se observaron signos de regeneración ósea y revascularización. Siguiendo un procedimiento similar pero con MSC indiferenciadas, Aoyama *et al.* [126] trataron a diez pacientes sin reportar ningún evento adverso serio relacionado con la aplicación de las MSC expandidas. Tampoco observaron anomalías genéticas durante la expansión *in vitro* o en sus propiedades de diferenciación ni formación de tumores *in vivo* en ratones inmunodeprimidos inoculados y monitorizados durante seis meses. Müller *et al.* [127] trataron a cinco pacientes con osteonecrosis en el cóndilo femoral realizando una DC de la zona a tratar e instilando MSC autólogas expandidas en cultivo celular durante tres semanas. Los investigadores caracterizaron las MSC *in*



*vitro* para establecer su inmunofenotipo, su capacidad de diferenciarse hacia el linaje osteogénico, estudiar las citoquinas y factores de crecimiento secretados en los sobrenadantes de los cultivos y detectar la presencia de alteraciones cromosómicas en muestras de MSC en cultivo a corto y largo término. Observaron que el uso de MSC autólogas expandidas era seguro y sin eventos adversos registrados como consecuencia de su aplicación. Los pacientes tratados presentaron una mejora clínica en cuanto al dolor y una estabilidad en progresión de la lesión que podría estar relacionada con la secreción de IGF y VEGF estudiadas *in vitro* y que están implicadas en la regulación de los procesos de regeneración ósea y vascularización. La principal limitación de estos estudios es el reducido número de pacientes para poder establecer cambios significativos en la efectividad de los tratamientos, aunque mostrarían indicios de regeneración ósea y una mejoría en la sintomatología de los pacientes.

Zhao *et al.* [128] realizaron un ensayo clínico aumentando el número de pacientes a 100, donde trataron a la mitad con  $2 \cdot 10^6$  MSC autólogas expandidas *ex vivo* obtenidas de la médula ósea subtrocanterica. Compararon este grupo celular con el grupo control al cual solamente se realizó el procedimiento de DC. Observaron que la aplicación del tratamiento celular a través del túnel de DC era un método seguro en los pacientes del grupo de estudio. Estos pacientes presentaron una reducción significativa del dolor y otros síntomas, así como un retraso en la evolución hacia estadios más avanzados o colapso, respecto al grupo control.

Recientemente, Hernández A. [129] ha realizado un ensayo clínico aleatorizado en fase I-II donde trataron a 14 pacientes afectados de ONCF en fases iniciales incorporando un producto de ingeniería tisular y terapia celular basado en MSC autólogas expandidas *ex vivo* colonizando una matriz ósea desvitalizada. Después de un año de seguimiento, la aplicación del tratamiento celular a través del túnel de DC se demostró segura y viable y no se reportaron reacciones adversas relacionadas con la implantación del producto. No obstante, no vieron diferencias significativas entre el grupo de estudio y el grupo control –al que solamente se le realizó la DC– en cuanto a los resultados clínicos y funcionales ni en la detención de la progresión de la ONCF. A pesar de ello, los resultados obtenidos en pacientes del grupo de estudio por RM y PET demostraron indicios prometedores de neovascularización y un aumento de la actividad osteoblástica a nivel de la zona necrótica.

Todos estos trabajos se han basado en el uso de MSC autólogas expandidas *ex vivo* como terapia celular, y parecen ser seguros y eficaces en el tratamiento de las fases iniciales de la ONCF, pero debemos tener en cuenta que están ligados a la obtención de las células del propio paciente y a su posterior aislamiento y expansión en un

entorno certificado para poder obtener la dosis celular requerida. Esto supone una demora en los tratamientos y conlleva unos costes de expansión asociados. El uso de MSC de origen alogénico, por lo tanto, supondría una nueva aproximación terapéutica atractiva debido a las ventajas logísticas y económicas explicadas anteriormente.

La aplicación clínica de MSC alogénicas con fines de regeneración ósea se inició con el tratamiento de pacientes pediátricos afectados con osteonecrosis secundaria a anemia de células falciformes [121] y osteogénesis imperfecta [130]. En ambos estudios se observó que los pacientes tratados no evidenciaron signos de toxicidad o rechazo a las células alogénicas y presentaron indicios de regeneración ósea. Más tarde, Horwitz *et al.* [131] emplearon MSC alogénicas expandidas y transducidas con retrovirus para su posterior detección en diferentes tejidos, en seis pacientes pediátricos afectados de osteogénesis imperfecta. Detectaron la presencia de MSC alogénicas en los tejidos de cinco de los pacientes tratados y un aumento en la velocidad de crecimiento en los primeros 6 meses posteriores al tratamiento, que se podría atribuir a la generación de osteoblastos funcionales provenientes de las MSC alogénicas injertadas en el tejido óseo.

Recientemente, en un estudio clínico de fase I en 10 pacientes realizado por de Windt *et al.* [132], aplicaron MSC de médula ósea alogénicas mezcladas con condrocitos autólogos para el tratamiento de defectos en el cartílago de la rodilla. Observaron que su aplicación no provocó ninguna respuesta inmunitaria ni se detectaron signos de inflamación en los seguimientos analíticos de las primeras 6 semanas. Clínicamente, los pacientes reportaron una mejoría significativa en relación al dolor y a la sintomatología después del tratamiento. En los casos en los que pudieron obtener biopsias de la zona tratada un año postimplantación no detectaron la presencia de DNA proveniente de las células alogénicas, sugiriendo un mecanismo de acción por efecto paracrino en lugar del injerto y diferenciación de las propias células alogénicas.

Resumiendo lo explicado anteriormente, los ensayos clínicos realizados con MSC autólogas y alogénicas realizados hasta la fecha evidencian la ausencia de efectos adversos relacionados con la aplicación de los tratamientos celulares y muestran que podrían ser un tratamiento potencial para estimular y regenerar el tejido óseo dañado. Pero es necesario realizar ensayos randomizados y con mayor número de pacientes así como establecer guías y protocolos para poder comparar los diferentes trabajos descritos en la literatura y establecer conclusiones sobre la efectividad clínica.

En la Tabla 1.5. se recogen los ensayos clínicos realizados en pacientes con terapia celular con MSC de origen autólogo y alogénico mencionados en este apartado.

Tabla 1.5. Ensayos clínicos con terapia celular para regeneración ósea

Autor (Año)	Terapia celular	Tejido de obtención	Tipo celular	Origen	Patología	Solución o scaffold empleado	Administración
Hernigou <i>et al.</i> (2002) [123]	Concentrado de médula ósea	Médula ósea de cresta ilíaca	CMN	Autólogo	ONCF	No	Inyección a través de un trocar
Gangji <i>et al.</i> (2004) [122]	Concentrado de médula ósea	Médula ósea de cresta ilíaca	CMN	Autólogo	ONCF	No	Inyección a través de un trocar
Kawate <i>et al.</i> (2006) [125]	MSC expandidas <i>ex vivo</i> colonizando una matriz de $\beta$ -TCP y autoinjerto óseo vascularizado	Médula ósea de cresta ilíaca	MSC	Autólogo	ONCF	Gránulos de $\beta$ -TCP	Compactación en el CD de la cabeza femoral
Müller <i>et al.</i> (2008) [127]	MSC expandidas <i>ex vivo</i>	Médula ósea	MSC	Autólogo	Osteonecrosis del cóndilo femoral	3 mL solución salina con 0,1 % albúmina humana	Inyección a través de un trocar
Zhao <i>et al.</i> (2012) [128]	MSC expandidas <i>ex vivo</i>	Médula ósea subtrocanterica	MSC	Autólogo	ONCF	2 mL solución salina	Inyección a través de un trocar
Aoyama <i>et al.</i> (2014) [126]	MSC expandidas <i>ex vivo</i> colonizando una matriz de $\beta$ -TCP y autoinjerto óseo vascularizado	Médula ósea de cresta ilíaca	MSC	Autólogo	ONCF	Gránulos de $\beta$ -TCP	Compactación en el CD de la cabeza femoral
Hernández A. (2015) [129]	MSC expandidas <i>ex vivo</i> colonizando una matriz ósea desvitalizada	Médula ósea de cresta ilíaca	MSC	Autólogo	ONCF	Matriz ósea desvitalizada y fibrina	Compactación en el CD de la cabeza femoral
Hernigou <i>et al.</i> (1997) [121]	Trasplante de médula ósea	Médula ósea	CMN	Alogénico	Anemia de células falciforme	No	Infusión intravenosa
Horwitz <i>et al.</i> (1999) [130]	Trasplante de médula ósea	Médula ósea	CMN	Alogénico	Osteogénesis imperfecta	No	Infusión intravenosa
Horwitz <i>et al.</i> (2002) [131]	Trasplante de MSC expandidas	Médula ósea	MSC transducidas con un retrovirus	Alogénico	Osteogénesis imperfecta	10 mL solución salina con 5 % albúmina de suero humano	Infusión intravenosa
de Windt <i>et al.</i> (2016) [132]	Trasplante de MSC expandidas mezcladas con condrocitos autólogos	Médula ósea	MSC	Alogénico	Defectos en el cartilago del cóndilo femoral o tróclea	Fibrina	Inyección en el defecto

Puesto que las propiedades de las MSC las posicionarían como unas excelentes candidatas como elementos principales en las terapias avanzadas en la regeneración ósea y que en nuestra experiencia preclínica [104,107] y clínica [129] previa hemos podido corroborar la seguridad y el potencial de los tratamientos autólogos con MSC en la ONCF, hemos querido seguir apostando por esta línea de investigación. El salto hacia un enfoque de terapia alogénica con MSC podría aportar nuevas perspectivas en el tratamiento de la ONCF y otras situaciones donde la osteonecrosis puede suponer un reto clínico, solventando las limitaciones económicas y de disponibilidad que llevan asociados los tratamientos autólogos y que prevemos que podrían ir en aumento con el envejecimiento de la sociedad actual. Aunque podemos encontrar en la literatura estudios preclínicos y clínicos donde se han aplicado MSC de origen alogénico, es necesario seguir validando la viabilidad, seguridad y potencial regenerativo de este tipo de terapias. Pero también, optimizando los tratamientos de modo que la dosis celular aplicada pueda ser determinada cumpliendo los criterios de seguridad y eficacia y permita acotar la producción y los costes de los productos de ingeniería tisular y terapia celular antes de su traslación a un entorno clínico.

## **2. Hipótesis y objetivos**

---



### 2.1. Hipótesis de trabajo

En un modelo preclínico de osteonecrosis de cabeza femoral, un producto de ingeniería tisular y terapia celular compuesto de matrices óseas y células madre mesenquimales adultas de origen alogénico puede estimular la regeneración ósea de forma equiparable a un producto de ingeniería tisular y terapia celular compuesto de matrices óseas y células madre mesenquimales adultas de origen autólogo.

### 2.2. Objetivos

El propósito de este estudio es evaluar la eficacia de la descompresión ósea central asociando la terapia celular avanzada autóloga o alogénica en dosis variables para el tratamiento de la osteonecrosis de cabeza femoral en un modelo experimental ovino.

1. Verificar la capacidad de estimulación de la regeneración ósea con la implantación de matrices óseas colonizadas con células madre mesenquimales alogénicas expandidas *ex vivo*.
2. Verificar la capacidad de estimulación de la regeneración ósea con la implantación de matrices óseas colonizadas con células madre mesenquimales autólogas expandidas *ex vivo*.
3. Determinar si la estimulación de la regeneración ósea con células madre mesenquimales de origen autólogo o alogénico es equiparable.
4. Determinar si la estimulación de la regeneración ósea con la dosis celular baja es equiparable a la dosis celular alta.
5. Evaluar la supervivencia, la multiplicación y diferenciación *in vivo* de las células madre mesenquimales alogénicas implantadas en la lesiones osteonecróticas.
6. Valorar la correlación de los niveles circulantes de TGF- $\beta$  en plasma con la regeneración ósea.





## **3. Material y métodos**

---



#### 3.1. Modelo animal

Como modelo experimental se utilizó la oveja (*Ovis aries*) de la raza Ripollesa x *Lacaune*. Un total de 27 ovejas adultas esqueléticamente maduras de entre 24 y 72 meses de edad, con un rango de peso entre 41 y 63 kg ( $52,35 \pm 6,26$  kg) se incluyeron en el estudio. Se comprobó mediante ecografía que las ovejas no fueran gestantes y mediante radioscopia que las fisis de crecimiento óseo en la tibia proximal estuvieran cerradas [133,134].

Antes de iniciar los procedimientos experimentales, los animales fueron aclimatados durante un periodo mínimo de una semana y, teniendo en cuenta que las ovejas son animales gregarios [135], fueron estabuladas en grupos de varios animales.

Las condiciones ambientales de estabulación fueron las siguientes: la temperatura ambiental se mantuvo entre 17 y 21° C y la humedad entre un 45 y 65 %. El aire impulsado fue 100 % exterior, prefiltrado y filtrado con un 95 % de eficacia, con una tasa de renovación de 15-20 ciclos/h. El fotoperiodo se programó en 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua, dispensada a través de un bebedero automático de cazoleta, donde la calidad química y microbiológica fue controlada periódicamente. La dieta se compuso de heno *ad libitum*, un suplemento de pienso granulado administrado dos veces al día y un complemento de sal en bloque, durante todo el periodo experimental.

Las ovejas se monitorizaron diariamente durante todo el período del estudio, controlando el aspecto y la condición corporal de la oveja, la observación de su conducta y hábitos, la ingesta de alimento y bebida, el seguimiento clínico del procedimiento, así como cualquier anomalía o incidencia.

Los animales provenían del centro proveedor de animales A.M. Animalia Bianya S.L. (Girona, España), inscrito en el registro de centros de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación, con el número G9900009. Las ovejas eran trasladadas en un vehículo autorizado para el transporte de animales de experimentación desde el centro proveedor hasta las instalaciones del Estabulario del

### 3. Material y métodos

VHIR. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las legislaciones locales (Decret 214/97 de 30 de juliol), nacionales (Real Decreto 53/2013) y europeas (Directiva 2010/63/UE). Los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del VHIR (número de registro 72/13) y recibió el visto bueno del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya (número de orden 8127).

#### 3.2. Diseño experimental *in vivo*

El diseño experimental preclínico *in vivo* se dividió en diferentes procedimientos detallados a continuación. Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron en condiciones asépticas y bajo anestesia general en los quirófanos experimentales de grandes animales de la Unidad de Cirugía Experimental del Servicio de Animal de Laboratorio del VHIR.

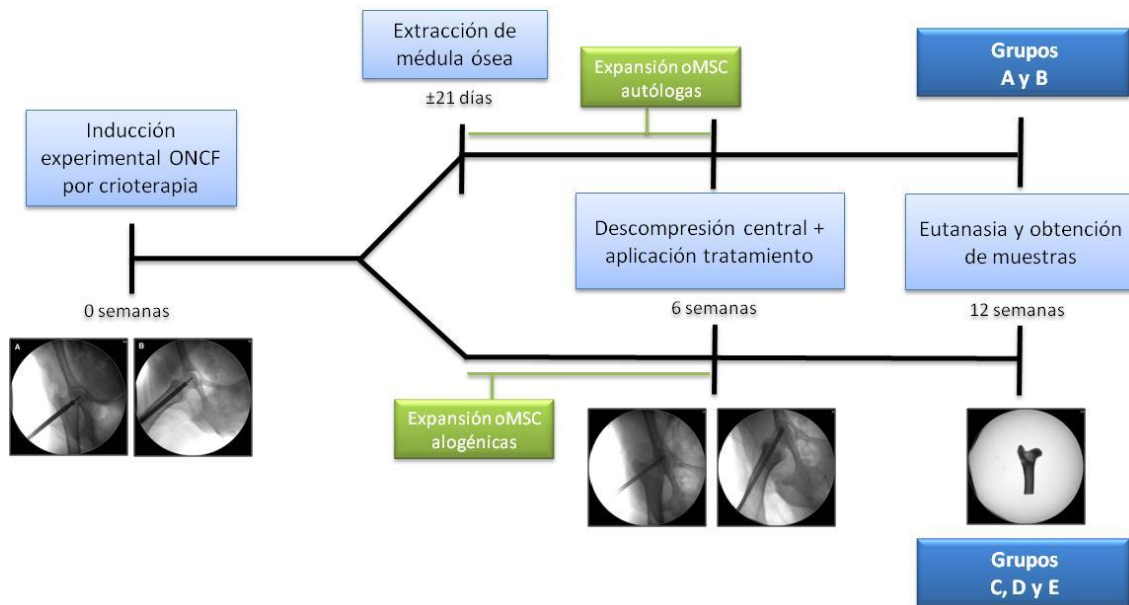
Una vez las ovejas habían superado el periodo de aclimatación y la verificación de su correcto estado de salud y peso, eran incluidas en el estudio. En todas las ovejas, el primer procedimiento fue la inducción experimental de la lesión de ONCF por crioterapia en la cabeza femoral derecha en la semana 0. A las 6 semanas posteriores a la inducción de la lesión de ONCF se realizó la cirugía de descompresión central y aplicación del tratamiento experimental, asignando las ovejas en los diferentes grupos de estudio (Tabla 3.1.).

Tabla 3.1. Grupos experimentales

Grupo	Tratamiento	Número ovejas tratadas
A	oMSC autólogas dosis alta ( $5 \cdot 10^6$ oMSC/cm <sup>3</sup> )	4
B	oMSC autólogas dosis baja ( $0,5 \cdot 10^6$ oMSC/cm <sup>3</sup> )	4
C	oMSC alogénicas dosis alta ( $5 \cdot 10^6$ oMSC/cm <sup>3</sup> )	4
D	oMSC alogénicas dosis baja ( $0,5 \cdot 10^6$ oMSC/cm <sup>3</sup> )	4
E	Descompresión central (control)	4

Las ovejas asignadas en los grupos de tratamiento con MSC ovinas (oMSC) autólogas a dosis alta (grupo A) y dosis baja (grupo B) se les realizó una extracción de médula

ósea  $21 \pm 3$  días antes de la cirugía de aplicación del tratamiento. Transcurridas un total de 12 semanas, se procedió a la eutanasia de los animales y a la extracción de las cabezas femorales para su posterior análisis. La cronología y los procedimientos llevados a cabo en la parte *in vivo* de este estudio preclínico en el modelo animal ovino de ONCF experimental se muestran esquematizados en la Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Esquema de la cronología del diseño experimental *in vivo*.

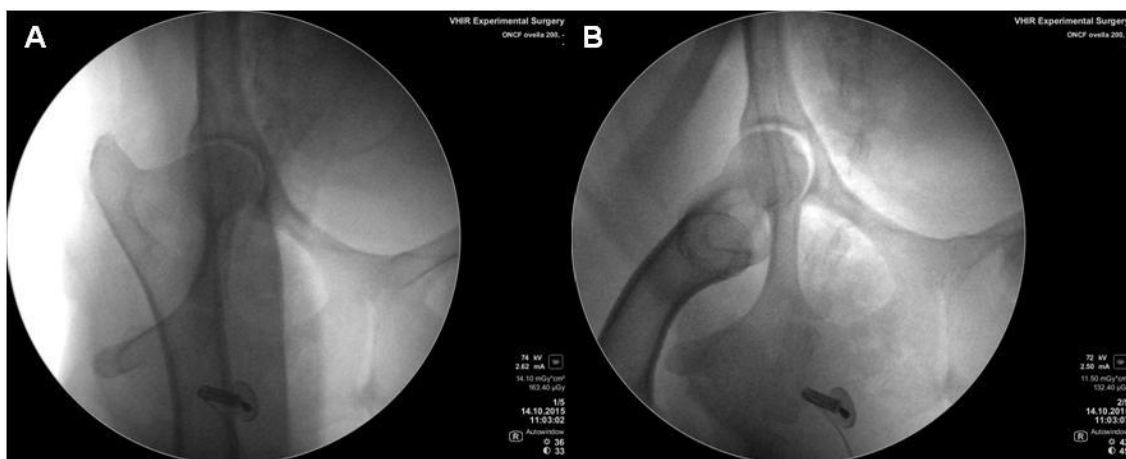
### 3.3. Inducción de la lesión de ONCF experimental

Todas las ovejas incluidas en los procedimientos recibieron un parche transdérmico de 2,5-5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de fentanilo (Fendivia<sup>®</sup>, Nycomed) en el antebrazo 24 horas antes de la intervención. El día de la inducción de la lesión de ONCF experimental, los animales se premedicaron con 0,5 mg/kg de midazolam (Midazolam Sala, Lab. Ramon Sala, S.L.) administrado por vía intramuscular mientras estaban en la corralina. A continuación, se transportaron hasta la zona de quirófano donde se prepararon para la intervención. Se colocó un acceso endovenoso en la vena cefálica y a continuación la extremidad posterior derecha se rasuró y se limpió con povidona yodada hasta la altura de la cadera. Una vez ya en el quirófano experimental, se administró propofol a dosis-efecto, aproximadamente 4 mg/kg, (Propofol Fresenius, Fresenius Kabi) por vía intravenosa para la inducción anestésica, se realizó la intubación endotraqueal y la colocación de una sonda orogástrica. El mantenimiento anestésico se realizó con 2 % de isoflurano inhalado (Isoflurano Forane<sup>®</sup>, AbbVie Farmacéutica, S.L.U.). Durante el procedimiento quirúrgico se infundió de manera continua la solución de Ringer lactato (Viaflo Hartmann, Baxter) a 2-3 mL/kg/h y como

### 3. Material y métodos

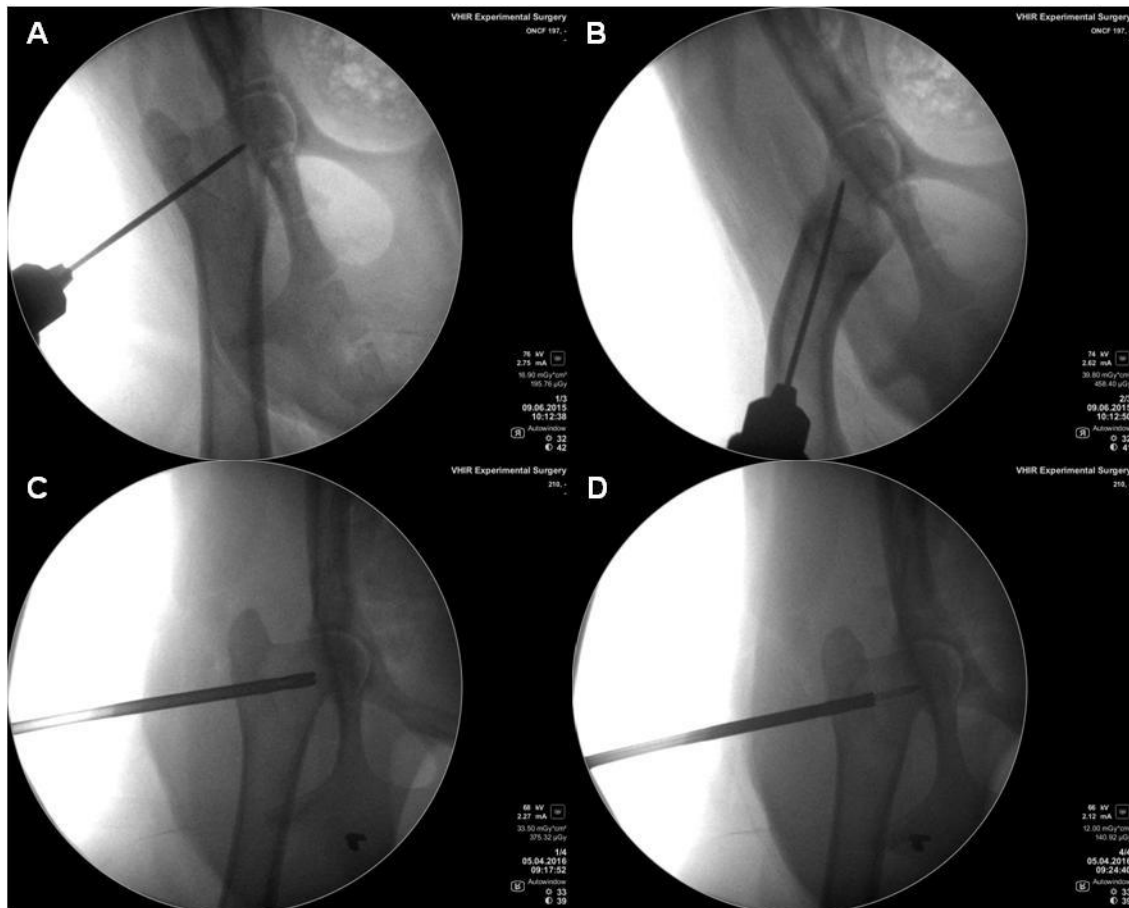
analgésia intraoperatoria se administró una infusión continua de citrato de fentanilo (Fentanest®, Kern Pharma) a una velocidad de 10 µg/kg/h. Seguidamente, el animal se colocó en decúbito supino y se preparó el campo quirúrgico en la extremidad posterior derecha a intervenir.

Bajo control radioscópico (OEC Fluorostar 7900 Compact, GE Healthcare), se localizó el punto de entrada a nivel de la cortical lateral del fémur proximal mediante las proyecciones anteroposterior (AP) con rotación interna y axial (Figura 3.2.).



**Figura 3.2.** Imágenes radioscópicas. A) Proyección AP con rotación interna. B) Proyección axial.

Se realizó una pequeña incisión cutánea y se introdujo una aguja de Kirschner de 2,5 mm de diámetro (Synthes) a través del cuello femoral hasta la cabeza femoral. La colocación de la aguja de Kirschner tenía como objetivo definir el punto de entrada en la cortical inferior al trocánter y el lugar exacto del centro de la cabeza femoral. La localización de la aguja era verificada por control radioscópico con las proyecciones anteroposterior con rotación interna y axial. Posteriormente, una broca canulada de 5 mm de diámetro externo (Synthes) era introducida siguiendo la aguja de Kirschner a modo de guía. A continuación, la aguja era retirada y a través de la broca canulada se introducía la sonda de crioterapia de 2,4 mm de diámetro y 15 cm de longitud (R2.4 Renal Cryoprobe, Endocare Cryocare, HealthTronics) (Figura 3.3.).

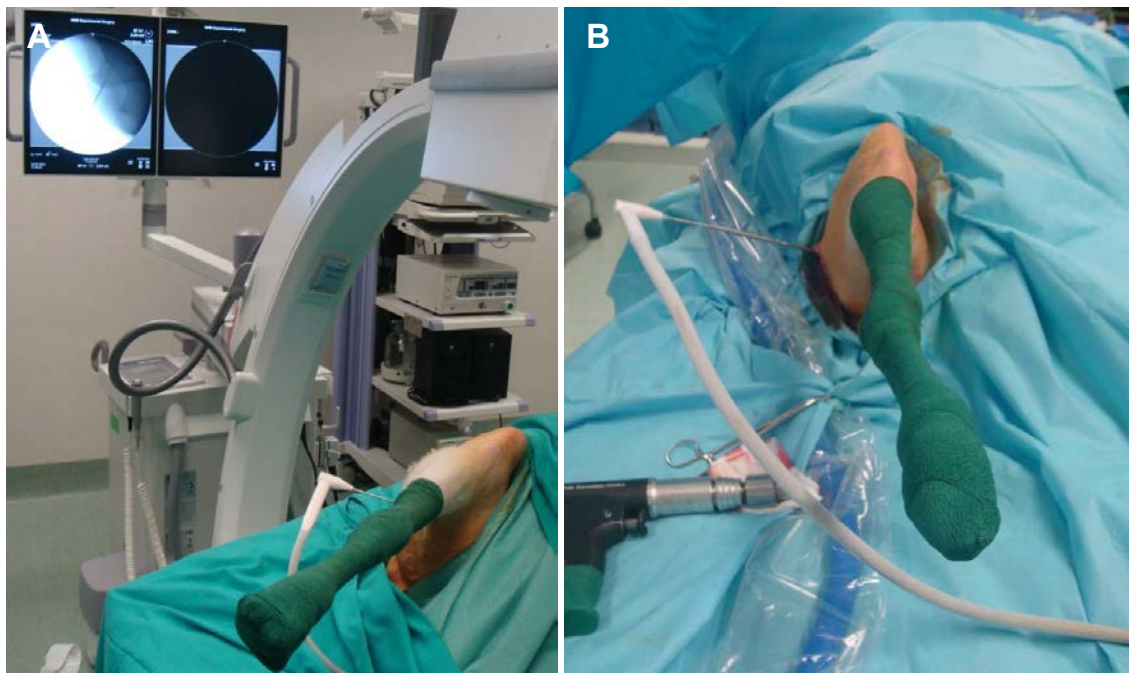


**Figura 3.3.** Imágenes radioscópicas. A y B) Colocación de la aguja de Kirschner y comprobación de la orientación mediante las proyecciones AP y axial. C) Introducción de la broca canulada siguiendo el mismo recorrido que la aguja de Kirschner. D) Colocación de la sonda de crioterapia a través de la broca hasta el centro de la cabeza femoral.

Una vez colocada la criosonda en el punto de inducción de la lesión en la cabeza femoral y comprobada su posición por la imagen de radioscopia, era conectada al aparato de control de criogenia (Endocare Cryocare, HealthTronics) y se iniciaba el procedimiento de crioterapia (Figura 3.4.). Se alternaron dos ciclos consecutivos de frío y de calor inducidos por los gases presurizados argón y helio (Air Liquide Medicinal S.L.U.), respectivamente. Cada ciclo tenía una duración de 10 minutos. Una vez finalizados los cuatro ciclos, la criosonda y la broca canulada eran retiradas y la incisión del abordaje percutáneo se cerraba con puntos de sutura Vycril® 2-0 (Ethicon, Johnson&Johnson). Como profilaxis antibiótica, todos los animales recibieron 22 mg/kg de cefazolina por vía intravenosa (Cefazolina Sala, Lab. Ramon Sala, S.L.) en el momento de la inducción anestésica y 15 mg/kg de amoxicilina por vía intramuscular (Duphamox LA, Zoetis) en el postoperatorio. Una vez los animales se recuperaban de la anestesia, eran devueltos a la corralina junto con el resto de ovejas. El refuerzo

### 3. Material y métodos

analgésico se realizó mediante el mantenimiento de los parches transdérmicos de fentanilo hasta 72 horas después de la intervención.



**Figura 3.4.** A) Montaje del sistema quirúrgico de inducción de la lesión de ONCF experimental. B) Detalle del abordaje quirúrgico mediante la criosonda colocada en la extremidad posterior derecha.

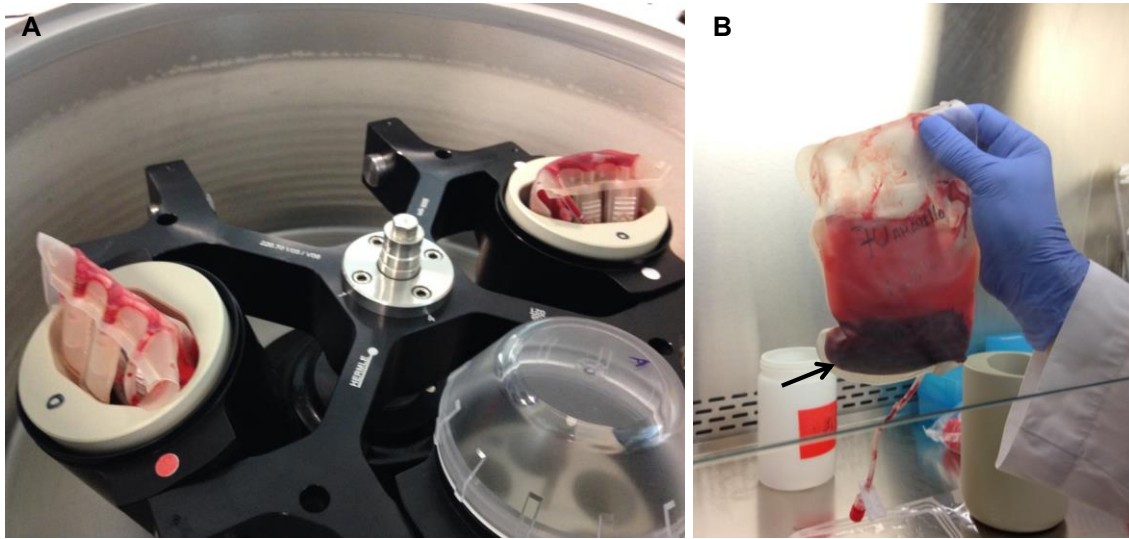
## 3.4. Cultivos celulares de MSC

### 3.4.1. Extracción de sangre para obtención de suero ovino

Como suplemento de los medios de cultivo celular de las oMSC se empleó suero de origen ovino obtenido a partir de sangre periférica. Con las ovejas inmovilizadas y el cuello en hiperextensión, se afeitó y limpió la zona de punción. Se realizaron extracciones de sangre periférica a partir de punciones de la vena yugular hasta un máximo de un 10 % por animal (entre 200 y 400 mL). La sangre obtenida de cada animal era recogida mediante una aguja de 16 G (arterial-venous fistula set 16 G x 25 mm, Kawasumi Laboratories America, Inc.) conectada a una bolsa de transferencia estéril de 600 mL (Transfer Grifols 600 luer, Grifols). Una vez recogido el volumen necesario, la aguja era descartada y la conexión sellada para descartar contaminaciones. La bolsa era inmediatamente colocada en un recipiente refrigerado donde se dejó coagular *overnight* a 4° C. Una vez formado el coágulo, la bolsa era centrifugada (Hermle Z513K, HERMLE Labortechnik GmbH) en posición vertical mediante unos adaptadores especiales para bolsas de sangre en las siguientes condiciones, 1300 g,



25 min, 22° C y con el freno desconectado. La centrifugación permitía separar el coágulo del suero obtenido (Figura 3.5.).



**Figura 3.5.** A) Procedimiento de centrifugación de las bolsas de recogida de sangre. B) Aspecto de la bolsa una vez centrifugada. La flecha indica el coágulo depositado en la parte inferior.

Una vez finalizada la centrifugación, con cuidado de no verter restos del coágulo, el suero autólogo ovino (SAO) era transferido a tubos de 50 mL estériles con la ayuda de un perforador extractor. El volumen repartido en diferentes tubos se volvió a centrifugar en dos centrifugaciones consecutivas de 1300 g, 25 min y 22° C, recuperando el sobrenadante en cada paso y evitando verter el pellet, con el objetivo de eliminar restos celulares y eritrocitarios. El SAO obtenido era alicuotado en tubos de 50 mL debidamente etiquetados y congelados a -20° C/-30° C durante un mínimo de 12 horas. Se realizaron test de esterilidad con muestras de 5 mL de cada tubo congelado, que fueron incubadas a 37° C durante un mínimo de 5 días para descartar contaminaciones durante el procedimiento.

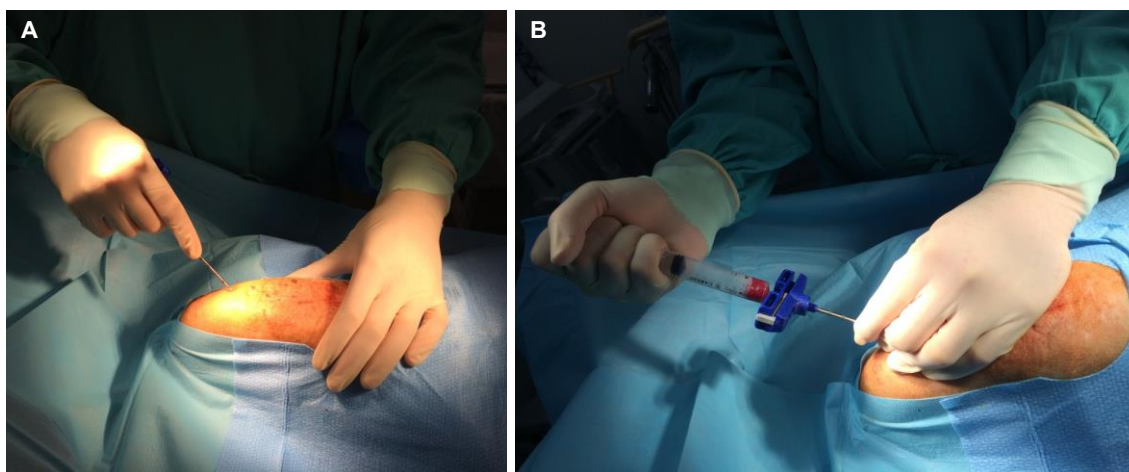
Para la creación de un *pool* de suero ovino (SPO), SAO provenientes de 5 ovejas diferentes, eran descongelados y posteriormente incubados a 56° C en un baño térmico durante 30 minutos para inactivar el complemento presente en el suero. A continuación, el SPO era generado mezclando los SAO en un recipiente estéril y homogeneizando todo el volumen final. Finalmente, el SPO obtenido era alicuotado en tubos estériles de 50 mL debidamente etiquetados y almacenados a -20° C/-30° C hasta su uso. Del mismo modo que en el procedimiento de obtención de SAO, se realizaron test de esterilidad de cada tubo para descartar posibles contaminaciones.

### 3. Material y métodos

El SPO era usado como suplemento del medio de cultivo celular DMEM (ref. 31885, Gibco, Life Technologies) empleado en la expansión celular de las oMSC. Todos los medios DMEM se suplementaron con un 10 % v/v de SPO.

#### 3.4.2. Aspiración y recogida de médula ósea ovina

Los animales pertenecientes a los grupos de tratamiento celular autólogo de los grupos A y B fueron intervenidos para la extracción de médula ósea (MO),  $21 \pm 3$  días antes de la cirugía de descompresión central y aplicación del tratamiento experimental. En todos los procedimientos, los animales fueron sedados y anestesiados siguiendo el mismo procedimiento del apartado 3.3. *Inducción de la lesión de ONCF experimental*. Una vez colocados en decúbito supino, el esternón fue preparado asépticamente y se colocó el campo quirúrgico alrededor de la zona de punción. Empleando un trocar de biopsia para MO (11 Ga x 4", ref. RBN-114S, Ranfac Corp.), previamente impregnado con suero fisiológico estéril heparinizado (Heparina 5000 UI/mL, ref. Q63004, Hospira Prod. Farm. Y Hosp., S.L.), se perforó la capa cortical esternal y se aspiró la MO mediante la conexión a una jeringa estéril (Figura 3.6.). Cada 2 mL de MO aspirada, el trocar era redireccionando y se volvían a reaspirar otros 2 mL, y así sucesivamente hasta obtener la cantidad de MO necesaria. El volumen obtenido era recogido en un tubo estéril de 50 mL previamente impregnado con 1 mL de ACD-A (Grifols). Cada 7 mL de MO aspirada y recogida, se añadía 1 mL adicional de ACD-A para evitar la formación de coágulos. Finalizada la extracción, el volumen recogido era transportado hasta los laboratorios de la División de Terapias Avanzadas del Banc de Sang i Teixits (BST) para realizar el aislamiento de células mononucleares (CMN) a partir de la médula ósea ovina y establecer las líneas celulares de oMSC para los tratamientos experimentales.



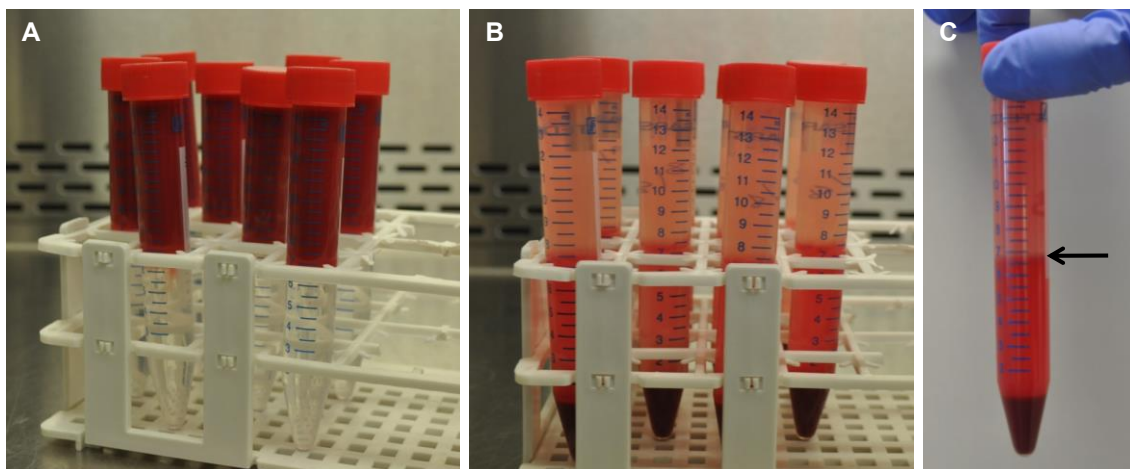
**Figura 3.6.** Punción y aspiración de médula ósea en el esternón ovino.

### 3.4.3. Obtención de MSC ovinas de origen autólogo

#### Aislamiento de CMN a partir de médula ósea

Antes de iniciar el protocolo de aislamiento de CMN en todos los casos, una pequeña muestra de MO se utilizó para realizar un test de esterilidad con el objetivo de garantizar la ausencia de contaminación del material de partida durante el proceso de aspiración, recogida y transporte.

Seguidamente, la MO se diluyó con PBS 1x estéril (ref. 14190-094, Gibco, Life Technologies) en una proporción 1:1 y se mezcló de forma homogénea. Un gradiente de densidad 1,077 g/mL (ref. 10771-100mL, Histopaque®, Sigma-Aldrich) se utilizó para aislar las CMN. En tubos estériles de 15 mL, se añadieron 7,5 mL de medio Histopaque® y, a continuación, se añadieron 7,5 mL de la mezcla homogénea de MO:PBS muy lentamente, evitando que se mezclaran las dos fases. Los tubos se centrifugaron a 1000 g, 35 min, 22° C y con el freno desconectado. Una vez completada la centrifugación, se procedió a recoger la fracción de CMN con pipetas Pasteur estériles evitando recoger eritrocitos (Figura 3.7.).



**Figura 3.7.** Imágenes representativas del proceso de aislamiento de CMN por gradiente de densidad. A) Aspecto de los tubos antes de la centrifugación donde se observan ambas fases. B) Aspecto de los tubos después de centrifugación. C) La flecha indica la localización de la fracción de CMN después de la centrifugación.

Las fracciones de CMN se recogieron en un tubo falcon de 50 mL estéril, se diluyeron con PBS 1x estéril y se volvieron a centrifugar a 400 g, 10 min y 22° C para descartar el sobrenadante. Al pellet obtenido se añadió 1 mL de solución de lisis de eritrocitos estéril (160 mM NH<sub>4</sub>Cl en H<sub>2</sub>O estéril, ref. 101/450500, Merck Millipore). Una vez pasados 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 10 mL de

### 3. Material y métodos

---

PBS 1x y se volvió a centrifugar 400 g, 10 min y 22° C. El sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SPO. La suspensión celular de CMN obtenida era contada directamente mediante una cámara de Neubauer (Brand) usando el método de exclusión celular por tinción con azul de tripano (ref. 17-942E, BioWhittaker®, Lonza) para estimar la concentración de células viables. Para el recuento, se realizó una dilución 1:1 de suspensión celular con 0,2 % de solución de azul de tripano en PBS, que era homogéneamente mezclada con ayuda de una micropipeta y posteriormente cargada en la cámara de Neubauer por capilaridad. A partir del recuento de células nucleadas se pudo obtener el rendimiento de CMN obtenidas por cada mL de MO extraída aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento MO} = \frac{\text{Nº total CMN}}{\text{volumen MO procesada (mL)}}$$

Una vez determinada la concentración celular, las CMN se sembraban en frascos de cultivo (T25, T75 o T150, Cell Culture Flask, Corning) a una densidad de  $2 \cdot 10^5$  CMN/cm<sup>2</sup> con medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SPO. Los frascos de cultivo celular contienen un revestimiento en su superficie plástica óptimo para la adhesión celular, de este modo las oMSC pueden ser aisladas por su capacidad de adherencia a esta superficie. Las células eran mantenidas en una incubadora de CO<sub>2</sub> (Steri-Cult CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Scientific) con una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, una humedad relativa del 90 % y una temperatura de 37° C.

#### **Expansión de oMSC de médula ósea**

Después de tres días de cultivo, el sobrenadante era descartado y se realizaban dos lavados con PBS 1x, con el objetivo de eliminar todas las CMN no adheridas a la superficie de cultivo celular pero manteniendo las oMSC adheridas previamente. A continuación, se añadía medio fresco DMEM suplementado con 10 % de SPO y se volvían a mantener en el incubador. El medio de cultivo era cambiado cada 3-4 días. Alrededor de los 10 días de cultivo después del aislamiento de las oMSC y que éstas presentaran un aspecto confluyente, se procedía a la recuperación de las células adheridas mediante la incubación con Tripsina/EDTA 0,05 % (ref. 25300, Gibco, Life Technologies) a 37° C durante 5 min. El sobrenadante recuperado de la tripsinización era inactivado con medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SPO y se

realizaba el recuento celular de la misma manera que se explicó anteriormente. Las oMSC se resembraban en nuevos frascos de cultivo celular a una densidad celular entre  $1 \cdot 10^3$  MSC/cm<sup>2</sup> y  $5 \cdot 10^3$  MSC/cm<sup>2</sup> para obtener la dosis celular necesaria para cada grupo experimental. El procedimiento de cultivo de las oMSC tenía lugar  $21 \pm 3$  días desde la obtención de MO y el aislamiento de CMN hasta la fecha de preparación de los productos experimentales con oMSC para la cirugía de tratamiento de la ONCF inducida experimentalmente en las ovejas.

Al finalizar las expansiones, de cada cultivo de oMSC obtenidas de MO ovina, parte de las células se congelaron en viales en nitrógeno líquido para su posterior caracterización fenotípica y funcional.

Para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de las oMSC obtenidas de cada oveja se calculó la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ , día<sup>-1</sup>), el tiempo de duplicación celular (TD, día) y el factor de expansión.

Para el cálculo de la velocidad máxima de crecimiento se aplicó la siguiente fórmula:

$$\mu_{\max} = \ln \frac{\text{densidad celular final}}{\text{densidad celular inicial}} / \frac{\text{tiempo final}}{\text{tiempo inicial}}$$

El tiempo de duplicación celular se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$TD = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

El cálculo del factor de expansión se obtuvo aplicando la fórmula:

$$\text{Factor de expansión} = CPD \cdot e^2$$

Donde previamente se obtuvo la duplicación de la población celular (*cumulative population doublings*, CPD), aplicando la siguiente fórmula:

$$CPD = \frac{\ln \frac{\text{número celular final}}{\text{número celular inicial}}}{\ln 2}$$

#### 3.4.4. Obtención de MSC ovinas de origen alogénico

Los grupos de tratamiento celular alogénico a dosis alta y baja de los grupos C y D, respectivamente, se realizaron con una línea celular de oMSC marcadas con eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) mediante infección por lentivirus, caracterizada y establecida a partir de estudios previos [104,107] y almacenada en nitrógeno líquido en las instalaciones de la División de Terapias Avanzadas del BST.

#### Descongelación de oMSC marcadas con eGFP

Viales de oMSC marcadas con eGFP de pase 13 con densidad celular de  $1 \cdot 10^6$  MSC/mL eran recuperados del tanque de nitrógeno líquido y transportado en nieve carbónica hasta el laboratorio. El contenido de cada criotubo, 1 mL, era descongelado a 37° C e inmediatamente el volumen era transferido a un falcon de 15 mL, previamente enfriado a 4° C, donde se realizaba una dilución 1:1 con medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SPO de forma progresiva hasta obtener un volumen final de 2 mL. Transcurridos 2 minutos a 4° C, la suspensión celular se diluía con 8 mL de medio de cultivo. El volumen final, 10 mL de suspensión celular, era dividido y transferido a dos frascos de cultivo celular T150. Seguidamente, 10 mL de medio de cultivo eran añadidos por frasco y se mantenían en el incubador a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad relativa. Pasadas 24 horas, el medio de cultivo era reemplazado por medio de cultivo fresco con el objetivo de eliminar cualquier resto residual de DMSO.

#### Cultivo celular de oMSC marcadas con eGFP

Las oMSC marcadas con eGFP para los tratamientos alogénicos eran cultivadas en frascos de cultivo celular y mantenidas a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad relativa. El medio de cultivo DMEM suplementado con un 10 % de SPO se cambiaba dos veces por semana por medio de cultivo fresco y se tripsinizaban al llegar al 80 o 90 % de confluencia. Llegados a ese punto, las células se sembraban en nuevos frascos de cultivo celular a una densidad celular entre  $1 \cdot 10^3$  MSC/cm<sup>2</sup> y  $5 \cdot 10^3$  MSC/cm<sup>2</sup> hasta obtener la dosis celular necesaria para cada grupo experimental.

Del mismo modo que para las oMSC obtenidas de MO, se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento de las oMSC marcadas con eGFP de velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx.}}$ , día<sup>-1</sup>), el tiempo de duplicación celular (TD, día) y el factor de expansión.

### 3.5. Caracterización de MSC ovinas

#### 3.5.1. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de las oMSC aisladas de MO ovina y expandidas en cultivo celular se realizó mediante el análisis de la expresión de CD45, MHC de clase II-DR, CD31, CD44 y CD166 por citometría de flujo de tres líneas celulares correspondientes a tres ovejas expandidas a pase 3. Los criterios para definir la caracterización fenotípica por expresión de antígenos de superficie se basaron en las recomendaciones de la ISCT [47] y en estudios previos con oMSC [104,136].

Tres viales de oMSC almacenadas en nitrógeno líquido se descongelaron y cultivaron siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.4.4. *Obtención de MSC ovinas de origen alogénico*. Una vez confluentes, los cultivos se tripsinizaron y se obtuvieron suspensiones celulares de cada uno. Las suspensiones celulares se añadieron a tubos de citometría a una concentración de aproximadamente  $2,5 \cdot 10^5$  oMSC/tubo y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos monoclonales seleccionados (detallados en la Tabla 3.2.).

**Tabla 3.2. Tabla de anticuerpos monoclonales e isotipos empleados en la caracterización fenotípica de las oMSC autólogas obtenidas a partir de MO ovina**

Receptor Membrana	Conjugación fluorocromo	Isotipo	Especificidad	Casa comercial	Referencia	Clon
CD45	PE	IgG1	Anti-ovina	AbD Serotec, Bio-Rad	MCA2220PE	1.11.32
CD31	FITC	IgG2a	Anti-ovina	AbD Serotec, Bio-Rad	MCA1097F	CO.3E1D4
MHC Class II-DR Monomorphic	FITC	IgG2a	Anti-ovina	AbD Serotec, Bio-Rad	MCA2226F	37.68
CD44	FITC	IgG1	Anti-ovina	AbD Serotec, Bio-Rad	MCA2219F	25.32
CD166	PE	IgG1	Anti-humana	BD Pharmingen	5559263	3A6
Isotipo IgG1	PE	IgG1	Anti-ratón	Tonbo Biosciences	50-4714	MOPC-21
Isotipo IgG1	FITC	IgG1	Anti-ratón	Tonbo Biosciences	35-4714	MOPC-21
Isotipo IgG2a	FITC	IgG2a	Anti-ratón	Tonbo Biosciences	35-4724	C1.18.4

Pasado el tiempo de incubación, se realizó un lavado con 2 mL de PBS 1x y las oMSC se centrifugaron a 340 g, 10 min. Una vez finalizada la centrifugación, el sobrenadante era descartado y las oMSC se resuspendieron con 150  $\mu$ L de PBS 1x. Las oMSC

### 3. Material y métodos

---

marcadas con cada anticuerpo se adquirieron con el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) y los resultados se analizaron con el programa CellQuestPro (Becton Dickinson).

#### 3.5.2. Caracterización funcional

El potencial funcional de las oMSC se estudió a partir de su capacidad para diferenciarse en los tres linajes mesenquimales, tal y como describió la ISCT [47]. Para ello, se emplearon oMSC obtenidas de tres extracciones de MO expandidas a pase 3 y se ensayaron cultivando las células *in vitro* con medios de diferenciación comerciales osteogénico, condrogénico y adipogénico. Como controles negativos se usaron las mismas células cultivadas en medio de cultivo basal.

#### Diferenciación osteogénica

Para la diferenciación osteogénica, las oMSC se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $1 \cdot 10^4$  oMSC/cm<sup>2</sup> y se incubaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SPO (0,5 mL/pocillo) a 37° C durante 24 horas. Pasado este tiempo, el medio de cultivo fue retirado y se añadió medio de diferenciación osteogénico comercial (StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, ref. A10066-01, Gibco). Se realizaron cambios de medio de diferenciación dos veces por semana. Pasados 29 días, la capacidad de diferenciación al linaje osteogénico se estudió mediante tinción específica de la fosfatasa alcalina y mediante tinción de los depósitos de calcio con Alizarin Red.

La tinción específica de la fosfatasa alcalina se realizó de la siguiente manera: el medio de diferenciación se retiró y las células se prefijaron con paraformaldehído (PF) 4 % diluido en PBS 1x (PF 4 %, ref. 47608, Sigma-Aldrich) durante 5 min. A continuación, las células se fijaron con PF 4 % durante 5 min a temperatura ambiente y seguidamente se lavaron 2 veces con agua destilada (H<sub>2</sub>Od) (ref. 75/441451/1013, BBraun). La actividad de la fosfatasa alcalina se detectó empleando el reactivo SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (ref. B5655, Sigma) que consiste en un sustrato cromogénico que permite detectar aquellas células que expresan este marcador enzimático característico de osteoblastos. La solución sustrato de la fosfatasa alcalina se preparó siguiendo las instrucciones de la casa comercial (una pastilla de reactivo diluida en 10 mL de H<sub>2</sub>Od). Las células se incubaron con la solución sustrato durante aproximadamente 1 hora a 37° C en oscuridad hasta que se detectó coloración. Seguidamente, las células se lavaron tres veces con H<sub>2</sub>Od y se examinó la presencia de células teñidas.



Para la tinción con Alizarin Red, el medio de diferenciación se retiró, las células se lavaron con PBS 1x y se incubaron con PF 4 % a temperatura ambiente. Después de 15 min de fijación, las células se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O. La solución de tinción de Alizarin Red (ref. 2003999, Temecula) se añadió a las células y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Pasado este tiempo, las células se lavaron cuatro veces con H<sub>2</sub>O para retirar el exceso de tinción y se examinaron en el microscopio óptico.

#### **Diferenciación adipogénica**

Para la diferenciación adipogénica, las oMSC se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $1 \cdot 10^4$  oMSC/cm<sup>2</sup> y se incubaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SPO (0,5 mL/pocillo) a 37° C durante 24 horas. Pasado este tiempo, el medio de cultivo fue retirado y se añadió medio de diferenciación adipogénico comercial (StemPro<sup>®</sup> Adipogenesis Differentiation Kit, ref. A10065-01, Gibco). Se realizaron cambios de medio de diferenciación dos veces por semana. Pasados 21 días, se evaluó la capacidad de diferenciación al linaje adipogénico mediante la presencia de depósitos lipídicos intracelulares con la tinción Oil Red O.

El protocolo de tinción se inició prefijando las células con PF 4 % sin retirar el medio de diferenciación durante 10 min. A continuación, el sobrenadante se retiró, se añadió nuevamente PF 4 % y las células se fijaron durante 10 min. Pasado este tiempo, el sobrenadante se retiró, se realizaron dos lavados con PBS 1x y las células se incubaron con propilenglicol puro (1,2-propanediol, ref. 398039, Sigma-Aldrich) durante 2 min. Las células se tiñeron con el colorante Oil Red O (ref. O0625, Sigma-Aldrich) precalentado a 37° C durante 10 min. Finalmente, las células se lavaron con H<sub>2</sub>O dos veces para eliminar el exceso de colorante y las vesículas lipídicas intracelulares se observaron en el microscopio óptico.

#### **Diferenciación condrogénica**

Para la diferenciación condrogénica, las oMSC se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de  $1,6 \cdot 10^7$  oMSC/mL. En cada pocillo, se dispensó una gota de 5  $\mu$ L en el centro para generar agregados celulares, también conocidos como *micromass*, que se incubaron durante 2 horas a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad relativa. Pasado este tiempo, se comprobó la formación de los agregados celulares y se añadió medio de diferenciación condrogénico comercial (StemPro<sup>®</sup> Chondrogenesis Differentiation Kit, ref. A10064-01, Gibco), muy lentamente para no alterar los

### 3. Material y métodos

---

*micromass*. Se realizaron cambios de medio de diferenciación dos veces por semana. La diferenciación al linaje condrogénico se estudió mediante la presencia de proteoglicanos con la tinción con Safranina O a los 21 días.

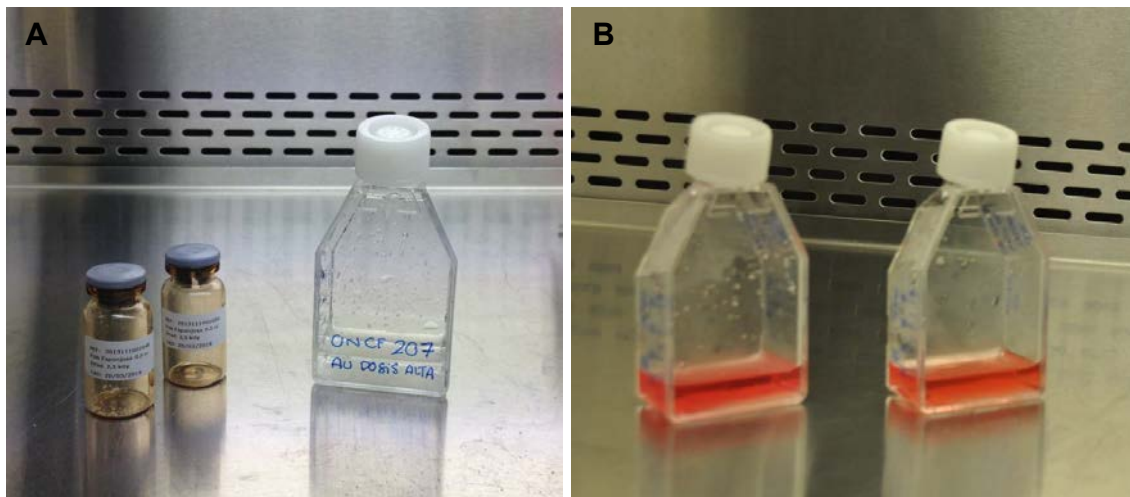
El protocolo de tinción se inició prefijando los *micromass* con PF 4 % durante 1 min. A continuación, el sobrenadante se retiró y se añadió nuevamente PF 4 % y se fijaron durante 30 min. Pasado este tiempo, el sobrenadante se retiró y se realizaron dos lavados con PBS 1x. Los *micromass* se incubaron con ácido acético al 0,1 % (acetic acid, ref. A6283-500ML, Sigma-Aldrich) durante 10 segundos y seguidamente se incubaron con la tinción con Safranina O 0,1 % (ref. S8884, Sigma-Aldrich) durante 5 min. Finalmente, las células se lavaron con PBS 1x dos veces para retirar el exceso de tinción y los *micromass* teñidos se observaron en el microscopio óptico.

## 3.6. Cultivo celular de MSC ovinas en matrices óseas

### 3.6.1. Colonización de partículas óseas desvitalizadas

Las líneas celulares de oMSC autólogas obtenidas de MO o marcadas con eGFP de origen alogénico, se cultivaron y expandieron hasta obtener las dosis requeridas, alta (5 millones) o baja (0,5 millones), para los grupos experimentales A, B, C y D.

La matriz ósea usada en los tratamientos experimentales consistió en partículas óseas desvitalizadas y liofilizadas de origen humano de grado clínico procedentes de banco de tejidos (vial polvo esponjosa 0,5 cc, Transplant Service Foundation, Banc de Sang i Teixits). En cada tratamiento se empleó 1 cm<sup>3</sup> de partículas óseas de un tamaño entre 0,05 y 1 mm, que en un primer paso eran transferidas a un frasco T25 con superficie no adherente (Nunc™ EasYFlask™ 25 cm<sup>2</sup> Nunclon™ Delta Surface, Thermo Scientific) y rehidratadas con 10 mL de PBS 1x durante un mínimo de 10 min. Pasado este tiempo, el PBS 1x era descartado e inmediatamente se añadían las oMSC en suspensión en 10 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SPO (Figura 3.8.). Para el proceso de colonización se dejaron las oMSC en contacto con las partículas óseas un mínimo de 12 horas con el frasco T25 inmovilizado, sin agitación, en posición vertical y a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad relativa.



**Figura 3.8.** Procedimiento de colonización de partículas óseas desvitalizadas. A) Rehidratación de las partículas óseas antes de la colonización. B) Partículas óseas en contacto con las oMSC en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SPO.

### 3.6.2. Preparación de los tratamientos de terapia celular avanzada

Transcurrido el tiempo de colonización, se obtuvo una muestra del sobrenadante para el recuento de oMSC presentes no adheridas y así poder calcular la tasa de colonización de forma indirecta:

$$\text{Células adheridas} = N^{\circ} \text{ células inicial} - N^{\circ} \text{ células sobrenadante}$$

$$\text{Tasa de colonización (\%)} = \frac{\text{Células adheridas}}{N^{\circ} \text{ células inicial}} \cdot 100$$

Los frascos T25 se observaron en el microscopio óptico invertido (Leica DMIL LED, Leica Microsystems) para observar la presencia de células en el medio de cultivo no adheridas a las partículas óseas. En el caso de los grupos con oMSC marcadas con eGFP (grupos C y D), estos se observaron bajo fluorescencia (filtro L5ET, Leica DMIL LED, Leica Microsystems) para comprobar la presencia de oMSC eGFP positivas adheridas a las partículas óseas.

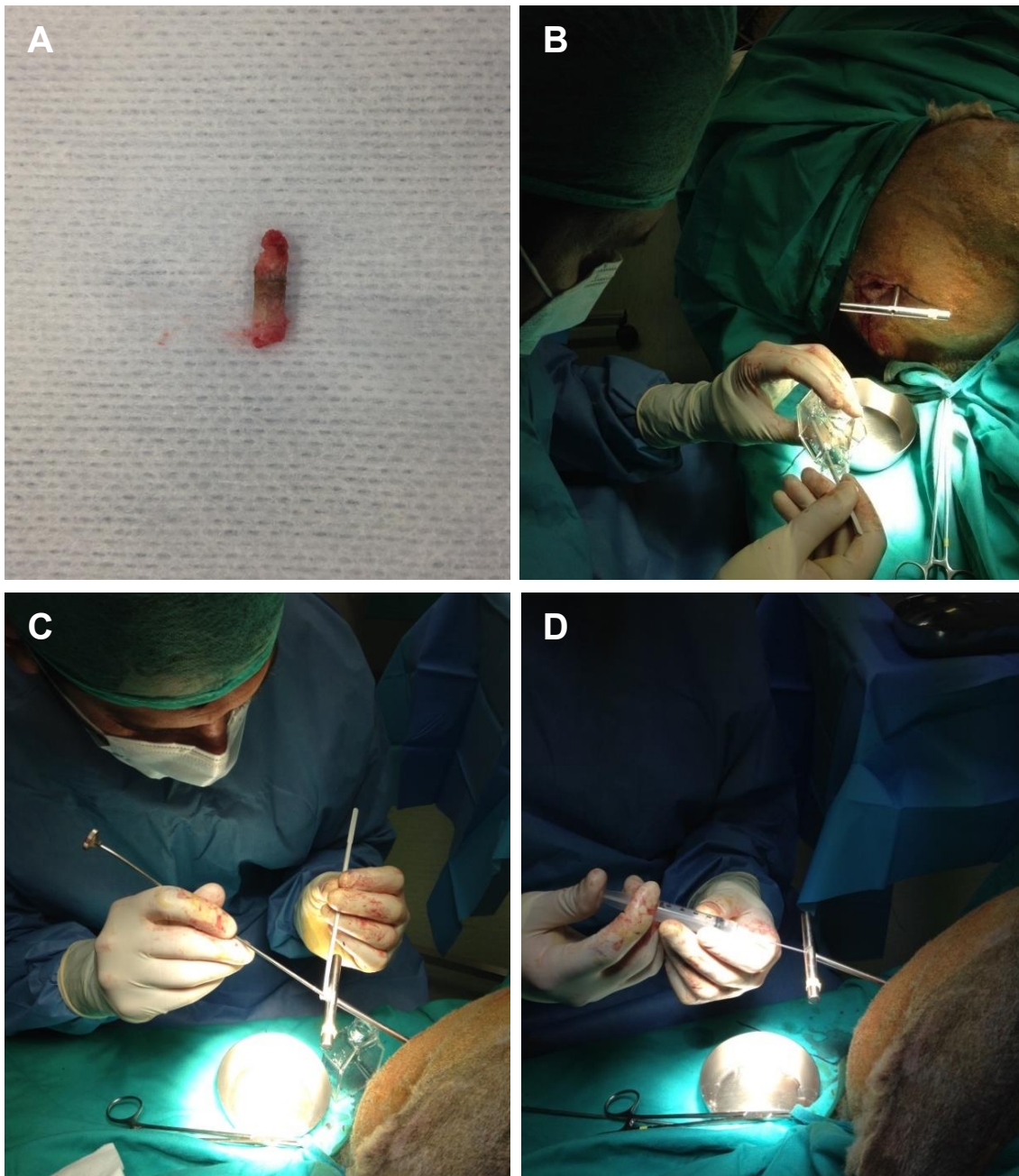
A continuación, los frascos T25 se rellenaron en su totalidad con solución para perfusión Plasmalyte (ref. 654436.5, Baxter) con 2 % de albúmina (albutein 20 %, ref. 670620.6, Grifols) y se empaquetaron en condiciones estériles para su transporte a temperatura ambiente desde los laboratorios de la División de Terapias Avanzadas del BST hasta los quirófanos experimentales del Estabulario del VHIR y su implantación en los animales receptores de cada grupo experimental.

#### 3.7. Cirugía de tratamiento de la ONCF experimental en un modelo ovino con terapia celular avanzada

Seis semanas después de la inducción de la ONCF en las ovejas se procedió a la administración de los tratamientos de terapia celular avanzada, preparados tal y como se explica en el apartado anterior. En cada animal se implantó el tratamiento correspondiente a cada grupo experimental asignado a través del túnel de DC, tal y como se detalla a continuación.

En todas las ovejas se realizó el mismo procedimiento de sedación, anestesia, preparación y profilaxis detallado en el apartado 3.3. *Inducción de la lesión de ONCF experimental* y un procedimiento quirúrgico parecido. En un primer momento, se realizó una incisión en la misma zona donde se introdujo el trocar y la sonda de crioterapia. Bajo control radioscópico, se localizó el túnel de DC realizado en la fase de inducción de la lesión y se introdujo una aguja de Kirschner de 2,5 mm de diámetro hasta la cabeza femoral. La localización y posición de la aguja se comprobaba bajo control radioscópico con las proyecciones AP y axial y seguidamente se introducía un trocar canulado de 5 mm de diámetro externo (Synthes) siguiendo la aguja a modo de guía. Una vez posicionado el trocar, la aguja era retirada. La trefina avanzaba unos milímetros y al retirarla, se extraía un cilindro óseo con una muestra de tejido trabecular (Figura 3.9.A.). Este cilindro óseo se sumergía en una solución al 10 % de formaldehído tamponado para la fijación de los tejidos y su posterior procesamiento para preparación histológica y confirmación de la osteonecrosis del tejido.

En el momento de administración del tratamiento experimental (Figura 3.9.B. y C.), el frasco T25 era trasladado al campo quirúrgico donde se decantaba todo el sobrenadante de Plasmalyte con 2 % de albúmina. Las partículas de hueso colonizadas con las oMSC eran recogidas con una microespátula e introducidas en la boca del trocar. A medida que se añadían las partículas, se añadía fibrinógeno (Tissucol Duo 5,0 mL, ref. 690503.6, Baxter) directamente al trocar con la ayuda de una jeringa para que fuera mezclándose y amalgamando las partículas introducidas (Figura 3.9.D.). Una vez añadido todo el contenido del frasco, con la ayuda de un punzón (romo para no dañar las partículas óseas colonizadas), se empujaba todo el contenido hacia el interior de la cabeza femoral suavemente. Finalmente, se verificaba que todo el contenido aplicado estuviera en el interior de la zona de la lesión mediante control radioscópico y se retiraba el punzón romo y el trocar. La incisión del abordaje se cerraba con puntos de sutura Vycril 2-0. Una vez los animales se recuperaban de la anestesia, se devolvían a la corralina junto con el resto del rebaño.



**Figura 3.9.** Procedimiento de administración de los tratamientos de la ONCF en el modelo experimental ovino. A) Cilindro óseo extraído tras la realización de la descompresión central. B) Obtención de las partículas óseas colonizadas en el campo quirúrgico. C) Adición de las partículas óseas colonizadas en el trocar colocado en la cabeza femoral derecha. D) Adición de 1 mL de fibrinógeno para amalgamar el contenido implantado.

#### 3.8. Estudio clínico y analítico postoperatorio

El seguimiento clínico de los animales consistió en el control de peso semanal, en la evaluación de la condición y temperatura corporal y en la evaluación de la herida quirúrgica. Los cambios de peso semanal respecto el peso inicial se analizaron para las 20 ovejas que completaron las 12 semanas de estudio con el objetivo de evidenciar incrementos o descensos de peso comparables entre los diferentes grupos. Los análisis se realizaron, en primer lugar, en función de la aplicación de terapia celular o no; en segundo lugar, en función del origen celular del tratamiento, autólogo o alogénico, o de la dosis recibida, alta o baja y, en tercer lugar, en función de cada tratamiento experimental individual (grupos A-E).

Para el seguimiento analítico se obtuvieron muestras de sangre periférica a partir de punciones de la vena yugular que se recolectaron en tubos de 3 mL para hemograma, bioquímica y hemostasia. Las muestras para hemograma se procesaron con el analizador hematológico BC-5000 Vet (Mindray Medical España S.L.) con opción para muestras sanguíneas de especie ovina. En los Laboratorios Clínicos Vall d'Hebron se realizaron análisis completos de hemograma, bioquímica y hemostasia (XN-2000™ Hematology Analyzer, Sysmex). Las muestras sanguíneas se obtuvieron en tres tiempos: antes de cualquier intervención para saber el valor de referencia basal de cada animal (basal, semana 0); a las 6 semanas de la creación de la lesión de ONCF, antes de la aplicación de los tratamientos experimentales (pretratamiento, semana 6); y a las 6 semanas de la aplicación del tratamiento experimental, antes de la eutanasia (semana 12). Del hemograma se estudiaron los recuentos eritrocitario, leucocitario y plaquetario. De las pruebas de bioquímica y hemostasia se estudiaron los valores de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y gamma glutamiltranspeptidasa (GGT), los valores de la proteína C reactiva (PCR) y los parámetros de glucosa, urea, creatinina y proteína.

#### 3.9. Protocolo de eutanasia, obtención de muestras y necropsia

A las 12 semanas de estudio experimental de cada oveja se procedía a la eutanasia mediante la sedación con midazolam intramuscular y la posterior aplicación de una sobredosis de 50-60 mg/kg de tiopental sódico endovenoso (Tiobarbital Braun 1 g, ref. 635581, BBraun Medical S.A.). El fémur derecho era extraído utilizando el material quirúrgico. Durante el procedimiento de extracción de la cabeza femoral, la articulación de la cadera y el tejido blando se examinaron para identificar la presencia de

reacciones adversas locales en los tejidos circundantes a la zona de implantación de los tratamientos experimentales. Finalmente, se realizaba un corte en la diáfisis medial del fémur derecho y se resecaban las partes blandas adheridas y las inserciones musculares. Las cabezas femorales obtenidas eran inmediatamente procesadas por radioscopia y transportadas a la Plataforma de Imagen Preclínica del VHIR para ser escaneadas por microCT. A continuación, las cabezas femorales eran transportadas al laboratorio del grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Politécnica de Catalunya (UPC) para procesar las muestras para los ensayos de biomecánica y preparaciones histológicas.

#### **3.10. Criterios de punto final**

Los criterios de punto final aplicados en las ovejas que han participado en este estudio y aprobados por el CEEA del VHIR fueron los siguientes:

1. No incorporación a la cuadripedestación del animal en el postoperatorio con grave estado general.
2. Infección con supuración de la herida quirúrgica.
3. La cojera durante las primeras semanas no es por sí misma criterio de punto final, pero podría serlo si se asocia a un mal estado general.
4. Pérdida de peso superior al 20 %. El animal no consume agua ni alimento.

#### **3.11. Estudios de imagen**

Las cabezas femorales derechas extraídas se estudiaron por radiología simple y por microCT inmediatamente después de su extracción.

##### **3.11.1. Radiología simple**

Las cabezas femorales, finalizadas las 12 semanas de estudio, fueron procesadas por radiografía simple en diferentes proyecciones mediante el aparato de fluoroscopia OEC Fluorostar 7900 Compact (GE Healthcare).

##### **3.11.2. Microtomografía computarizada (microCT)**

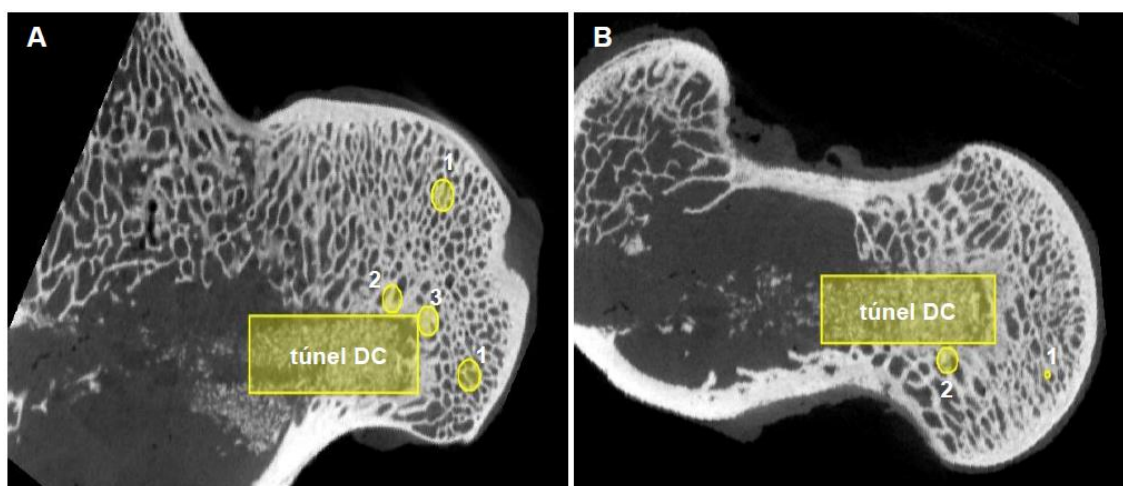
A continuación, las cabezas femorales se escanearon con el aparato Quantum FX microCT Imaging System (Perkin Elmer, 940 Winter St. Waltham, Massachusetts).

### 3. Material y métodos

EEUU). Los parámetros utilizados para la adquisición de los estudios de microCT fueron de 90 kV y 160 uA de corriente eléctrica, FOV 40 mm y 4,5 minutos de adquisición. La reconstrucción de los estudios se realizó con el software propio del equipo, mediante el método de Feldkamp, y el análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa de análisis de imágenes médicas AMIDE (AMIDE's a Medical Image Data Examiner, Copyright. 2000-2012 Andreas Loening) [137], con el soporte del personal de la Plataforma de Imagen Preclínica del VHIR.

Para el análisis de las imágenes se seleccionaron VOIs (*Volumes Of Interest*) esféricos de 2 mm<sup>3</sup>. La elección de este volumen pretendía reducir el factor de variabilidad entre las muestras debido a las diferentes orientaciones de los túneles de DC dentro de cada cabeza femoral tratada. De esta forma se intentaba minimizar lo máximo posible aquellas zonas donde no había tejido óseo y que podrían alterar los valores obtenidos aumentando el error y la variabilidad. Por cada cabeza femoral los VOIs se seleccionaron en cortes aleatorios y se distribuyeron en los siguientes grupos (Figura 3.10.):

- Zona 1 control: tejido trabecular de la cabeza femoral alejada del túnel de DC y de los tratamientos experimentales implantados (n = 4).
- Zona 2 adyacente al túnel de DC: tejido periférico al túnel de DC de la cabeza femoral y de los tratamientos experimentales implantados (n = 4).
- Zona 3 craneal al túnel de DC: tejido inmediatamente craneal al túnel de DC de la cabeza femoral y de los tratamientos experimentales implantados (n = 2).



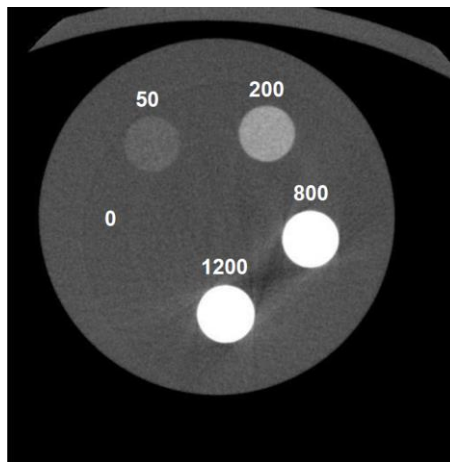
**Figura 3.10.** Imágenes de microCT representativas de la localización de los VOIs seleccionados en A) corte sagital y B) corte coronal

De cada VOI se obtuvo un valor de intensidad de gris (*grayscale*) a partir de los datos obtenidos por el software, correspondiente a la densidad radiológica detectada por el aparato de microCT. Debido a la falta de normalización automática del equipo, se



realizó una corrección de la intensidad de gris respecto el tejido blando propio de cada captación por cada muestra analizada.

Para poder relacionar la densidad radiológica con la mineralización del tejido estudiado, se escaneó en el mismo aparato de microCT un fantoma con cilindros de diferentes concentraciones de hidroxiapatita (0, 50, 200, 800 y 1200 mgHA/cm<sup>3</sup>) en su interior (Figura 3.11.). A partir de los promedios de intensidad de gris obtenidos de cada cilindro correspondiente a cada concentración conocida se estableció una recta patrón. El valor de densidad mineral de cada VOI expresado en miligramos de hidroxiapatita por cm<sup>3</sup> (mgHA/cm<sup>3</sup>) se determinó de forma indirecta a partir de la ecuación de la recta patrón establecida y valor de intensidad de gris obtenido [138].



**Figura 3.11.** Fantoma con cilindros de diferentes concentraciones de hidroxiapatita (0, 50, 200, 800 y 1200 mgHA/cm<sup>3</sup>) en su interior escaneado por microCT.

Los análisis se realizaron a partir un total de 18 cabezas femorales escaneadas (cuatro para los grupos A-D y dos para el grupo E). Los VOIs de cada región se estudiaron, en primer lugar, en función de la aplicación de terapia celular o no; en segundo lugar, en función del origen celular y la dosis aplicada y, en tercer lugar, en función de cada tratamiento experimental (grupos A-E).

#### 3.12. Estudios de biomecánica mediante ensayos de indentación

Inmediatamente después de la captación de imágenes por radiología simple y microCT, las cabezas femorales eran transportadas al laboratorio del grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la UPC.

En un primer momento, cada cabeza femoral se cortaba en dos mitades utilizando una sierra de cinta con banda de diamante (EXAKT 310, EXAKT Technologies, Inc.) especial para histologías, con irrigación constante para evitar el deterioro de los tejidos a estudiar. Una de las mitades se destinaba a la realización del ensayo biomecánico sobre el tejido óseo el mismo día de la obtención con el fin de evitar la inmersión de los tejidos en formaldehído y su consecuente rigidez.

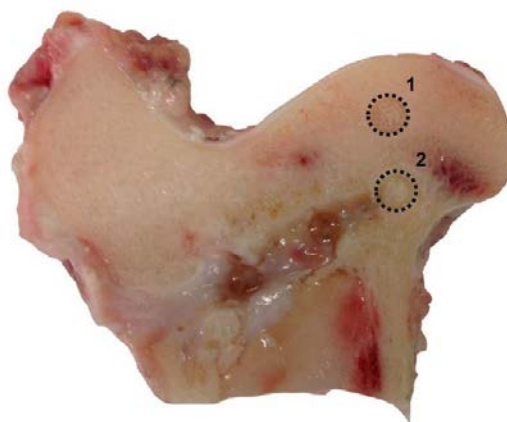
Todos los ensayos biomecánicos fueron realizados mediante una máquina servohidráulica universal de ensayos mecánicos Bionix (MTS Bionix 358, MTS Systems Corporation) con una célula de carga de 2,5 kN. El tipo de ensayo biomecánico realizado consistió en un test de indentación destructivo en el cual se aplicó sobre el tejido una carga de compresión a una velocidad constante de 2 mm/min. Esta carga se aplicó mediante un indentador cilíndrico de 4 mm de diámetro posicionado perpendicularmente al tejido hasta alcanzar una distancia de penetración de 1,5 mm desde la superficie de la muestra. Para evitar el movimiento de la pieza ósea durante la realización del ensayo debido a su anatomía esférica, se realizó un corte paralelo a la dirección del túnel de DC y perpendicular al indentador para dejar una superficie de apoyo plana (Figura 3.12.).



**Figura 3.12.** Imagen representativa del procedimiento de ensayo biomecánico de indentación con la máquina servohidráulica Bionix.

Se realizaron un total de 18 ensayos de indentación en 18 muestras (cuatro cabezas femorales para los grupos A-D y dos para el grupo E). Cada ensayo se realizó del siguiente modo: dos indentaciones en cada cabeza femoral distribuidas en dos zonas diferentes previamente establecidas, siendo una indentación por zona y manteniendo las mismas condiciones en todos los casos (Figura 3.13.):

- Zona 1 control: tejido trabecular de la cabeza femoral alejado del túnel de DC y de la aplicación de los tratamientos experimentales (n = 1).
- Zona 2 craneal al túnel de DC: tejido inmediatamente craneal al túnel de DC y de la aplicación de los tratamientos experimentales (n = 1).



**Figura 3.13.** Imagen representativa (oveja 211) de las zonas de indentación de los ensayos biomecánicos de compresión realizados en las cabezas femorales ovinas.

Además de las muestras de las cabezas femorales derechas intervenidas, se realizó el ensayo de indentación en dos cabezas femorales contralaterales no intervenidas (fémur izquierdo) a modo de control del tejido trabecular de la zona 1 control.

Los datos fueron adquiridos mediante el software TestWorks (MTS Systems Corporation) y fueron tratados con hojas de cálculo Excel (Microsoft, USA). Los valores obtenidos de las fuerzas aplicadas en cada indentación se graficaron para establecer la curva de deformidad del tejido en cada punto estudiado y obtener el módulo de compresión.

Los resultados se analizaron del mismo modo que en los apartados anteriores, en función de la aplicación de terapia celular o no, en función del origen celular y la dosis aplicada y, por último, en función de cada tratamiento experimental (grupos A-E).

### **3.13. Estudios de histología**

Las preparaciones de los estudios histológicos se realizaron con el grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos de la UPC y con la Unidad de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universitat de Barcelona (UB) (Dra. M<sup>a</sup> Cristina Manzanares). Las preparaciones de los estudios inmunohistoquímicos se realizaron con el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona (Dra. Rosa Rabanal).

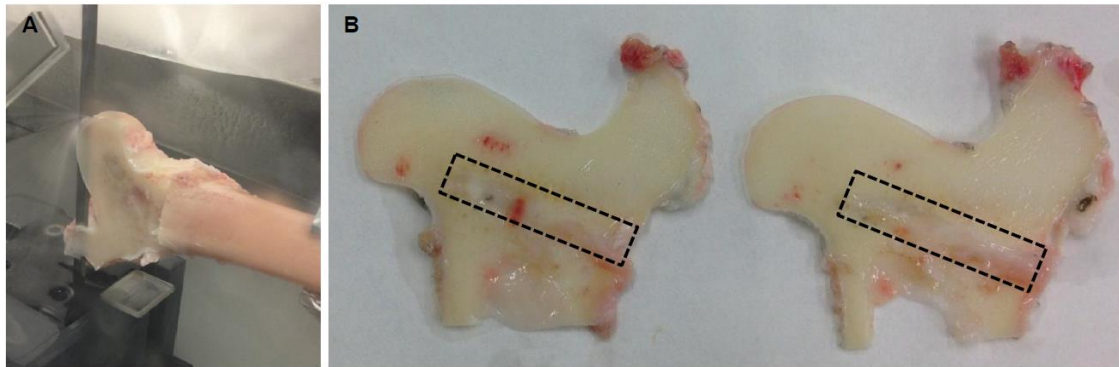
#### **3.13.1. Estudio macroscópico**

Una vez obtenidas las cabezas femorales y antes de cualquier manipulación, se evaluó la morfología macroscópica, es decir, la presencia de deformidad, aplastamiento o infección, así como otras alteraciones que pudieran ser observadas.

#### **3.13.2. Preparaciones histológicas no decalcificadas**

El procesado de las muestras se inició con la realización de varios cortes sagitales en una de las mitades de la cabeza femoral para poder obtener diferentes láminas de aproximadamente 2-3 mm de grosor. Los cortes se realizaron de manera paralela al eje longitudinal del túnel de DC mediante una sierra de cinta con banda de diamante. El objetivo de la realización de estos cortes sucesivos era obtener láminas en las que

se pudiera observar el túnel de DC a lo largo de su eje longitudinal, tal y como se observa en la Figura 3.14.



**Figura 3.14.** Imágenes representativas de la obtención de cortes sagitales. A) Proceso de corte mediante una sierra de cinta con banda de diamante EXAKT. B) Cortes sucesivos en forma de lámina de 2-3 mm de grosor.

Los cortes obtenidos fueron sumergidos en una solución al 10 % de formaldehído tamponado durante al menos una semana para asegurar su fijación. Posteriormente, el proceso de deshidratación se llevó a cabo mediante la inmersión de las muestras en una serie de baños sucesivos de etanol en solución acuosa a diferentes concentraciones crecientes (30 %, 50 %, 75 %, 96 % y 100 %) y con agitación constante (50 rpm). Tras la deshidratación completa se realizó el proceso de inclusión en resina de polimetilmetacrilato (PMMA) (Technovit 7200 VLC, Kulzer GmbH). Las muestras se sumergieron en soluciones de etanol decrecientes mezcladas con concentraciones crecientes de resina de PMMA (30 %, 50 %, 75 %, 100 %) bajo agitación constante (50 rpm). Las muestras sumergidas en 100 % de resina de PMMA se solidificaron en moldes mediante el uso de un equipo de fotopolimerización (EXAKT 520 Light Polymerization Unit, EXAKT Technologies, Inc.) con unidad de control de luz blanca y UV (Figura 3.15).



**Figura 3.15.** Imágenes representativas de los bloques sólidos de resina de PMMA con las muestras óseas embebidas en su interior una vez fotopolimerizadas.

### 3. Material y métodos

---

Las muestras ya embebidas en resina de PMMA fueron pulidas hasta dejar la superficie de interés completamente lisa y el tejido al descubierto. El pulido se realizó con papeles abrasivos de carburo de silicio (SiC) de diferentes granulometrías mediante el uso de una pulidora con control de paralelismo (EXAKT 400 CS, EXAKT Technologies, Inc.). Seguidamente, la superficie pulida fue adherida a una placa histológica de PMMA de EXAKT mediante la fotopolimerización del monómero adhesivo (Technovit 7210 VLC, Kulzer GmbH) con una lámpara de luz UV (EXAKT 520 Light Polymerization Unit, EXAKT Technologies, Inc.). Una vez fijada a esta placa, se realizó otro corte con el fin de eliminar la máxima cantidad de tejido y resina sobrantes para reducir el grosor de la muestra. Tras el corte, se volvió a pulir siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente hasta alcanzar un grosor final de muestra comprendido entre 50 y 100  $\mu\text{m}$  (contando muestra y monómero). El grosor de la muestra se controló realizando sucesivas mediciones con el micrómetro después de cada periodo de pulido para conocer en todo momento la altura de la muestra (Figura 3.16.).



**Figura 3.16.** Imagen representativa del procesamiento para histología. Aspecto final de la lámina una vez pulida hasta 50-100  $\mu\text{m}$  de grosor.

#### 3.13.3. Tinciones histológicas

Las muestras fueron teñidas con la tinción Azul de Toluidina adaptada para muestras embebidas en resina de PMMA. Este colorante básico tiñe todas las estructuras en diferentes tonalidades de azul. El hueso mineralizado se observa en tonalidad azul pálido y la matriz extracelular calcificada en azul violáceo permitiendo diferenciar el nivel de mineralización, que además, permite distinguir las líneas de cementación del tejido óseo [139]. El protocolo de tinción con Azul de Toluidina fue el siguiente: en un primer paso se frotó la superficie del tejido y de la resina de PMMA con solución de acetona/alcohol diluida al 50 % para abrir el poro de la resina y que pudiera penetrar la tinción. Seguidamente, las muestras se lavaron con  $\text{H}_2\text{O}$  y a continuación se incubaron en 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 5 min. Las muestras se volvieron a lavar con agua

corriente durante 10 min y se procedió a la incubación con la tinción Azul de Toluidina, previamente filtrada y precalentada a 60° C, durante 30 min a 60° C. Finalizado este tiempo, las muestras se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de tinción.

Las muestras histológicas de las cabezas femorales en resina teñidas fueron observadas por microscopía óptica. Se obtuvieron imágenes a gran (Leica DMD108, Leica Microsystems) y menor aumento (Leica DMIL LED, Leica Microsystems) de los cortes histológicos teñidos obtenidos.

#### **3.13.4. Preparaciones histológicas decalcificadas**

Se realizaron cortes con la sierra de cinta con banda de diamante EXAKT de zonas de tejido trabecular contiguos a los túneles de DC de las cabezas femorales de los grupos C y D. Los tejidos fueron fijados en solución de paraformaldehído al 4 % y posteriormente, fueron decalcificados con una solución decalcificante con ácido fórmico al 5 % (Decalcifier I, Surgipath Canada Inc.) durante 4-6 semanas. Una vez decalcificados, los tejidos se incluyeron en parafina para obtener cortes sagitales con micrótopo (Jung Biocut 2035, Leica Microsystems) de 4-5 µm de grosor. Las muestras fueron teñidas con la tinción de Hematoxilina y Eosina para muestras embebidas en parafina siguiendo el protocolo descrito a continuación. Las muestras se desparafinaron en soluciones de xilol I y xilol II y se hidrataron en soluciones decrecientes de etanol (etanol absoluto, etanol 96, etanol 80, etanol 70, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). A continuación las muestras se incubaron con Hematoxilina durante 3,5 min y seguidamente se lavaron con agua corriente hasta que la cubeta quedara sin restos de tinción. Se procedió con la incubación con alcohol ácido (HCl) durante 3,5 min, se volvieron a lavar las muestras con agua corriente y se incubaron en H<sub>2</sub>O amoniacal durante 3,5 min. Se volvieron a lavar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> durante 5 min y se realizaron dos incubaciones consecutivas de 3,5 min en etanol 70 y etanol 80. A continuación las muestras se incubaron con la tinción de Eosina durante 1,5 min. Seguidamente las muestras se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> durante 1,5 min, se deshidrataron nuevamente en concentraciones crecientes de etanol 96 y etanol absoluto y se aclararon en soluciones de xilol. Finalmente, se añadió una gota de DPX y se colocó un cubreobjetos sobre las muestras ya teñidas para su conservación y visualización.

En esta tinción el hueso se presenta como una estructura compacta en color rosa oscuro mientras que el tejido conectivo se muestra como una red estructurada de células y fibras de colágeno en un color rosa pálido. Los núcleos celulares se observan de color violeta y el citoplasma de color rosa.

### 3. Material y métodos

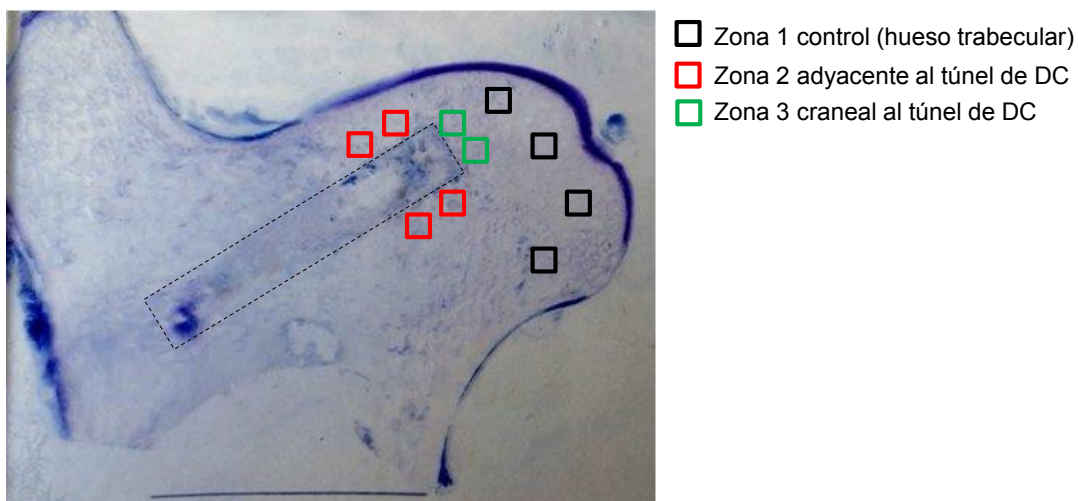
Las muestras histológicas decalcificadas obtenidas se observaron por microscopía óptica (Leica DMIL LED, Leica Microsystems).

#### 3.13.5. Análisis histológico

Para obtener la confirmación de la presencia de osteonecrosis en el tejido óseo, dos de los cilindros biopsia obtenidos antes de la implantación de los tratamientos experimentales se analizaron por microscopía óptica. El criterio diagnóstico para definir osteonecrosis fue la presencia de lagunas vacías en las trabéculas óseas u osteocitos que presentaran núcleos de aspecto condensados o picnóticos [106].

Para el análisis histológico semicuantitativo de los tratamientos experimentales, se seleccionaron 20 preparaciones histológicas no decalcificadas teñidas con Azul de Toluidina en corte sagital (cuatro cabezas femorales por cada grupo experimental A-E). De cada cabeza femoral se obtuvieron cuatro imágenes de microscopía óptica convencional a un aumento de 10x de cada zona previamente establecida (Figura 3.17.):

- Zona 1 control: tejido trabecular de la cabeza femoral alejada del túnel de DC y de los tratamientos experimentales implantados (n = 4).
- Zona 2 adyacente: tejido periférico al túnel de DC de la cabeza femoral y de los tratamientos experimentales implantados (n = 4).
- Zona 3 craneal: tejido inmediatamente craneal al túnel de DC de la cabeza femoral y de los tratamientos experimentales implantados (n = 4).



**Figura 3.17.** Imagen representativa de las zonas de la cabeza femoral evaluadas en el análisis histológico semicuantitativo.



Todas las imágenes fueron examinadas por tres observadores independientes y se evaluaron mediante una estrategia semicuantitativa adaptada a partir de los parámetros de puntuación histopatológica descritos por Udehiya *et al.* [112] y por Simank *et al.* [140] (Tabla 3.3.). Los promedios de los parámetros definidos se calcularon y se estudiaron de forma independiente. Se consideró una mayor estimulación y regeneración ósea en aquel o aquellos grupos con la mayor puntuación obtenida.

Tabla 3.3. Parámetros de puntuación histológica

Parámetro	Puntuación
<b>1 Osteogénesis</b>	
No osteogénesis	0
Osteogénesis débil	1
Osteogénesis media	2
Buena osteogénesis	3
>75 % del tejido es hueso neoformado	4
<b>2 Hueso trabecular</b>	
Sin actividad ósea celular	0
Aposición inicial de hueso neoformado	1
Aposición activa de hueso neoformado	2
Reorganización del hueso trabecular	3
Completa reorganización del hueso trabecular	4
<b>3 Reabsorción hueso trabecular</b>	
Reabsorción intensa	0
Reabsorción moderada	1
Ausencia de reabsorción	2
<b>4 Médula ósea</b>	
Ausente	0
Inicio aparición	1
Presente en la mitad del espacio trabecular	2
Colonización completa del espacio trabecular	3
Médula ósea madura	4

Los resultados se analizaron del mismo modo que en los apartados anteriores, en función de la aplicación de terapia celular o no, en función del origen celular y la dosis aplicada y, por último, en función de cada tratamiento experimental (grupos A-E).

Por cada una de las muestras estudiadas se evaluó además la presencia de signos de inflamación y/o reacción inmunológica. Se observó la presencia o ausencia de remodelación y hueso neoformado, líneas de cementación en el tejido óseo y la organización de este hueso neoformado y matriz extracelular depositada.

#### 3.13.6. Tinción inmunohistoquímica para detección de eGFP

Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas en las preparaciones histológicas decalcificadas e incluidas en parafina de los grupos C y D para detectar la presencia de oMSC marcadas con eGFP siguiendo el protocolo descrito a continuación. En un primer momento, las muestras se desparafinaron en xilol I y xilol II y se hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (etanol absoluto, etanol 96, etanol 80, etanol 70, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). A continuación, se bloqueó la enzima peroxidasa endógena con 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma Aldrich) en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> durante 35 minutos a temperatura ambiente en agitación y oscuridad. Pasado este tiempo, las muestras se colocaron en un sistema de montaje vertical, se realizaron tres lavados de 5 min con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y, seguidamente, otros dos lavados de 5 min con PBS-Tween20 0,1 % (PBS-T, Sigma Aldrich). Las uniones inespecíficas se bloquearon con solución de bloqueo (30 % de suero de conejo en PBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario *chicken anti-GFP* (ref. GFP-1010, Aves Labs Inc.) a una dilución 1:500 en solución de 10 % de suero de conejo en PBS-T *overnight* a 4° C y oscuridad. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS-T y seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario *biotinylated rabbit anti-chicken IgY* (ref. ab6752, Abcam) a una dilución 1:200 en solución de 10 % de suero de conejo en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo las muestras se lavaron dos veces durante 5 min con PBS-T y otros dos lavados de 5 min con PBS. Luego se procedió a la incubación con el complejo ABC (Peroxidase Standard Staining Kit, Thermo Fisher) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se volvieron a lavar tres veces durante 5 min con PBS para retirar el exceso de complejo ABC y se reveló la actividad peroxidasa con el Kit EnVision System HRP Rabbit DAB+ (Dako, Agilent) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y agua corriente durante 10 minutos y se contrastaron con Hematoxilina de Mayer prefiltrada durante 5 segundos. El exceso de tinción se eliminó en agua corriente durante 10 min y, finalmente, las muestras se deshidrataron y se montaron con DPX y un cubreobjetos para su conservación y visualización.

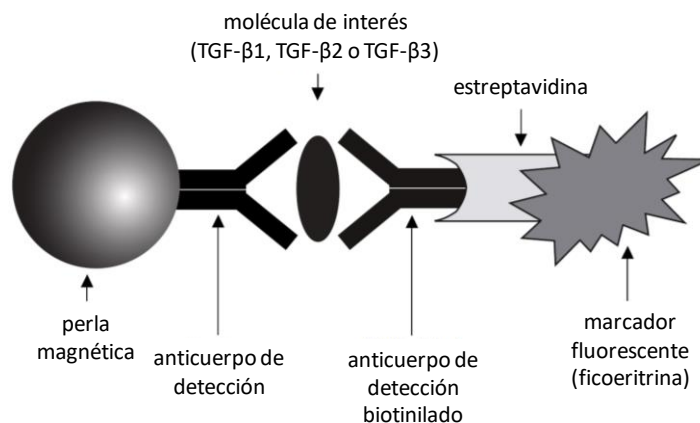
Las muestras se observaron con un microscopio óptico (Leica DMIL LED, Leica Microsystems) para detectar la presencia de oMSC-eGFP positivas en los tejidos.

### 3.14. Determinación de los niveles circulantes de TGF- $\beta$ en plasma ovino

En todos los grupos se obtuvieron muestras de sangre periférica a partir de la punción de la vena yugular para el estudio de los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ . Estas se obtuvieron antes de cualquier cirugía para saber el valor de referencia de cada animal (basal), a las 6 semanas de la creación de la lesión de ONCF (pretratamiento) y a las semanas 1, 2, 4 y 6 posteriores a la cirugía de aplicación de los tratamientos experimentales (correspondiendo a las semanas de estudio 7, 8, 10 y 12).

Las muestras sanguíneas extraídas se recolectaron en tubos de 3 mL con anticoagulante (BD Vacutainer 5,4 mg K3E, ref. 368857, BD Believer Industrial State). Y se mantuvieron en frío hasta su centrifugación inmediata a 2500 rcf (Megafuge 2.0R, Heraeus Sepatech GmbH) durante 10 minutos y a 4° C, con el objetivo de separar la fracción plasmática de la fracción celular. Finalizada la centrifugación, se recogió aproximadamente 1 mL de la parte más superficial de la fracción plasmática y fue añadida a un microtubo estéril. Seguidamente, las muestras de plasma ovino se guardaron a -80° C hasta el momento de su análisis.

Las muestras se analizaron mediante el inmunoensayo específico para TGF- $\beta$  basado en la tecnología xMAP (Bio-Plex Pro™ TGF- $\beta$  Assays, Bio-Rad) donde se cuantificaron de forma simultánea las isoformas de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Brevemente, esta tecnología emplea un método de inmunoensayo de tipo sándwich donde la molécula de interés es detectada por un anticuerpo específico unido covalentemente a una perla magnética fluorescente. Después de realizar lavados mediante una placa magnética para eliminar aquellas moléculas no unidas al anticuerpo específico, un segundo anticuerpo biotinilado específico de detección de la molécula de interés es añadido. El resultado es la formación de un sándwich de anticuerpos en la molécula a detectar. Este complejo puede revelarse gracias a la adición de estreptavidina conjugada a un fluorocromo que se une a la biotina y que proporciona una reacción fluorescente específica. Esta reacción puede cuantificarse en función de la intensidad de fluorescencia específica de la perla magnética y del fluorocromo (Figura 3.18.).



**Figura 3.18.** Esquema del inmunoensayo de tipo sándwich Bio-Plex para la detección de las tres isoformas de TGF- $\beta$  en plasma.

Todos los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. En un paso previo, las muestras de plasma se centrifugaron a 1000 g durante 15 min a 4° C y a 10.000 g durante 10 min a 4° C para eliminar los restos de plaquetas y precipitados que pudieran contener los sobrenadantes. Seguidamente, las muestras se trataron con ácido clorhídrico (HCl 1M) para activar la molécula de TGF- $\beta$ , puesto que se secreta en el organismo como parte de un complejo inactivo. Para ello, 4  $\mu$ L de HCl se añadieron a 20  $\mu$ L de muestra de plasma a analizar, y la mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 4  $\mu$ L de solución básica (1.2 N NaOH/0.5 M HEPES) para neutralizarla. Finalmente, la muestra neutralizada se diluyó hasta un volumen final de 320  $\mu$ L con la solución diluyente Bio-Plex en una proporción 1:16.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con fondo plano. En cada pocillo se añadieron 50  $\mu$ L de perlas magnéticas, a las cuales se les realizaron 3 lavados con 100  $\mu$ L de solución de lavado Bio-Plex/pocillo. A continuación, se añadió a cada pocillo 50  $\mu$ L de muestra de plasma activada previamente homogeneizada en un vórtex. Cada muestra de plasma ovino se analizó por duplicado. Las mezclas se incubaron durante 2 horas en movimiento (850 rpm) protegidas de la luz y a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, los pocillos se lavaron 3 veces con 100  $\mu$ L de solución de lavado Bio-Plex/pocillo y se añadieron 25  $\mu$ L de anticuerpo de detección biotinilado a cada pocillo. Las mezclas se incubaron nuevamente durante 1h en movimiento (850 rpm) protegidas de la luz y a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con 100  $\mu$ L de solución de lavado Bio-Plex/pocillo y se añadieron 50  $\mu$ L de solución estreptavidina-ficoeritrina para la detección del complejo de tipo sándwich formado. La mezcla final de cada pocillo se incubó durante 30 min en

movimiento (850 rpm) protegida de la luz y a temperatura ambiente. Finalmente, los pocillos se volvieron a lavar 3 veces con 100 µL de solución de lavado Bio-Plex/pocillo y se añadieron 125 µL de solución de ensayo Bio-Plex/pocillo. Las placas se colocaron en el lector de placas (Luminex 200™, Luminex Corporation) siguiendo el protocolo recomendado para la adquisición de datos del software Luminex xPONENT (Luminex Corporation). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Bio-Plex Manager™ versión 6.0 (Bio-Rad) y las cuantificaciones se presentaron en concentraciones del orden de pg/mL.

Los resultados obtenidos se estudiaron, en primer lugar, en función de la aplicación de terapia celular o no; en segundo lugar, en función del origen celular y la dosis aplicada y, en tercer lugar, en función de cada tratamiento experimental (grupos A-E). Los análisis se realizaron a partir de las muestras obtenidas de un total de 16 ovejas (cuatro para los grupos A, B y D y dos para los grupos C y E).

#### 3.15. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó con los programas Microsoft Office Excel 2007 y el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics (versión 20, IBM Corp.). Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar (*standard deviation*, SD). Se estableció un intervalo de confianza del 95 % y se aceptó una diferencia significativa de  $p < 0,05$ .

El estudio estadístico se realizó mediante test paramétricos para variables con distribución normal, T-test para variables continuas de dos grupos y test ANOVA para poder comparar valores de más de dos grupos. Se aplicó el test de Dunnett para poder comparar todos los grupos respecto el grupo control y el test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se aplicaron test no paramétricos para las variables con distribución no normal, test Mann-Whitney para variables continuas de dos grupos y Kruskal-Wallis para valores de más de dos grupos.



## 4. Resultados

---





## 4.1. Análisis del aislamiento, expansión y caracterización de las MSC ovinas

A partir de la aspiración de MO del esternón de las ovejas incluidas en los grupos A y B y del procedimiento de aislamiento y expansión por adherencia al plástico se pudieron establecer líneas celulares de oMSC.

Se realizó la punción y aspiración de MO en 8 ovejas y las CMN se aislaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4.3. *Obtención de MSC ovinas autólogas*. Se observó variabilidad en el rendimiento de CMN obtenidas de MO de los diferentes animales (Tabla 4.1.). Ninguna de las muestras se contaminó durante el procedimiento de aspirado a partir de los resultados obtenidos de los test de esterilidad evaluados a los 5 días.

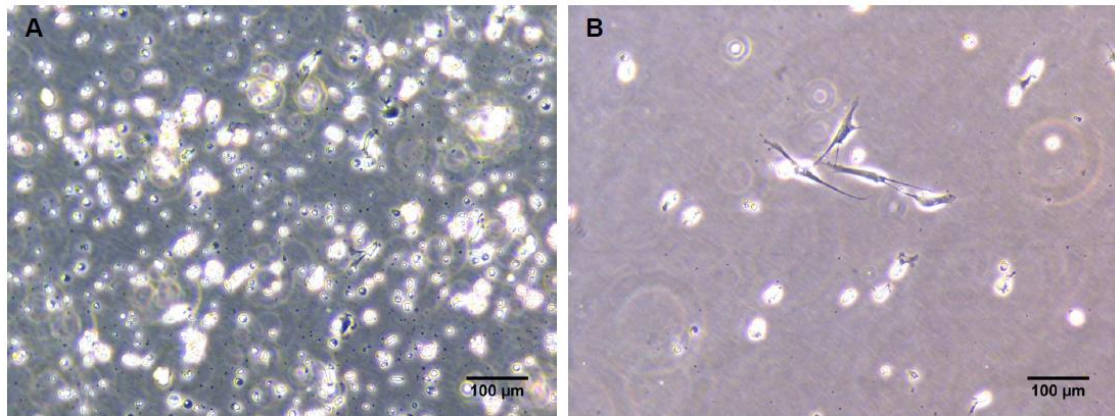
Tabla 4.1. Aislamiento CMN de MO ovina

ID	MO aspirada (mL)	MO procesada (mL)	CMN obtenidas (CMN/mL MO)	Viabilidad CMN (%)
199	32	30	$1,34 \cdot 10^7$	89,94
204	32	30	$3,08 \cdot 10^6$	97,87
206	33	30	$2,08 \cdot 10^6$	93,28
207	34	30	$6,90 \cdot 10^6$	92,41
208	19	19	$1,76 \cdot 10^6$	89,33
211	33	30	$5,68 \cdot 10^6$	86,77
215	20	20	$9,75 \cdot 10^4$	82,98
221	34	30	$5,92 \cdot 10^6$	86,59
<b>Promedio <math>\pm</math> SD</b>	<b>29,63 <math>\pm</math> 6,30</b>	<b>27,38 <math>\pm</math> 4,87</b>	<b><math>4,87 \cdot 10^6 \pm 4,18 \cdot 10^6</math></b>	<b>89,90 <math>\pm</math> 4,63</b>

### 4.1.1. Caracterización morfológica

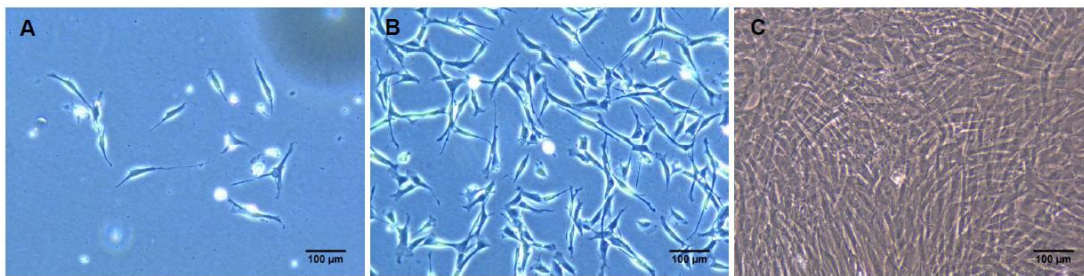
Las oMSC se seleccionaron por su capacidad de adherencia a la superficie del plástico de cultivo. La mayoría de las células nucleadas no adherentes fueron retiradas con los lavados y el primer cambio de medio. Con el sobrenadante libre de células no adherentes se pudo observar la presencia de células con morfología fusiforme característica de las MSC adheridas a la superficie de cultivo (Figura 4.1.).

#### 4. Resultados



**Figura 4.1.** Imagen representativa del cultivo de CMN. A) Aspecto del cultivo antes y B) después del lavado y cambio de medio (PhL, 10x, barra de escala 100 µm).

Las células adheridas al plástico con morfología fusiforme crecieron en colonias hasta que llegaron a ser confluentes. A partir de la primera expansión, las oMSC crecieron uniformemente en toda la superficie del frasco de cultivo (Figura 4.2.).



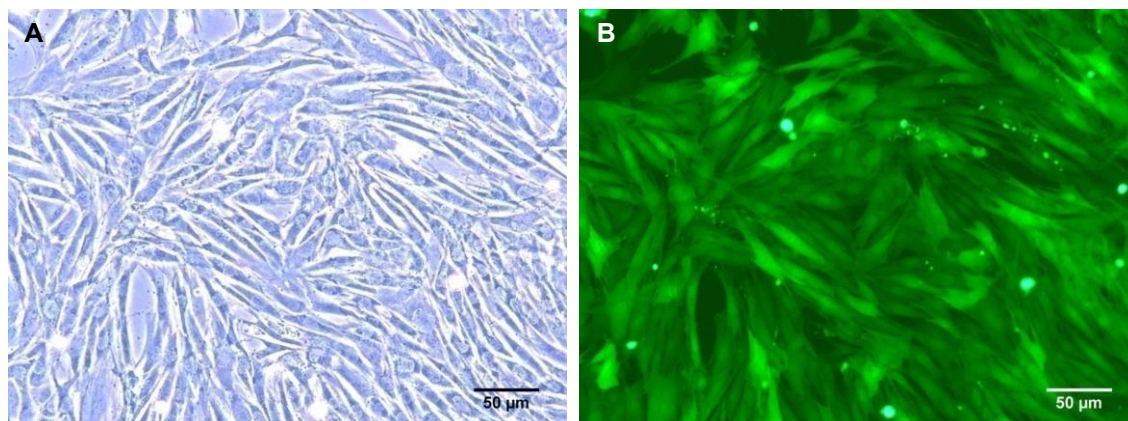
**Figura 4.2.** Imágenes representativas del cultivo de oMSC a los: A) 5 días, B) 9 días y C) 12 días (PhL, 10x, barra de escala 100 µm).

Las densidades de las oMSC obtenidas en la primera expansión a partir de la fracción de CMN de MO fueron las siguientes:

**Tabla 4.2. Densidades de los cultivos de CMN de MO ovina**

ID	Densidad siembra (CMN/cm <sup>2</sup> )	Días cultivo	Densidad final (oMSC/cm <sup>2</sup> )
199	2,00·10 <sup>5</sup>	12	1,05·10 <sup>4</sup>
204	2,00·10 <sup>5</sup>	13	1,35·10 <sup>4</sup>
206	2,00·10 <sup>5</sup>	9	8,70·10 <sup>3</sup>
207	2,00·10 <sup>5</sup>	10	1,21·10 <sup>4</sup>
208	2,00·10 <sup>5</sup>	9	2,50·10 <sup>3</sup>
211	2,00·10 <sup>5</sup>	11	1,30·10 <sup>4</sup>
215	7,80·10 <sup>4</sup>	14	7,32·10 <sup>4</sup>
221	2,00·10 <sup>5</sup>	12	2,95·10 <sup>4</sup>
<b>Promedio ± SD</b>		<b>11,25 ± 1,83</b>	<b>2,04·10<sup>4</sup> ± 2,27·10<sup>4</sup></b>

Las oMSC-eGFP descongeladas y expandidas para los grupos de tratamiento alogénico C y D también presentaron la característica morfología fusiforme con crecimiento homogéneo sobre la superficie del frasco de cultivo. Bajo fluorescencia se pudieron observar aquellas oMSC con expresión positiva de eGFP (Figura 4.3.).



**Figura 4.3.** Imágenes representativas del cultivo de oMSC-eGFP: A) en contraste de fases (PhL, 20x) y B) en fluorescencia (L5ET, 20x, barra de escala 50 µm).

Los parámetros cinéticos de crecimiento de las oMSC-eGFP descongeladas fueron los siguientes:

**Tabla 4.3. Parámetros de caracterización de los cultivos de oMSC-eGFP descongeladas**

ID	Densidad siembra (oMSC/cm <sup>2</sup> )	Días cultivo	Densidad final (oMSC/cm <sup>2</sup> )	µ máx. (días <sup>-1</sup> )	Tiempo duplicación (días)	Factor expansión
197	3,33·10 <sup>3</sup>	7	7,65·10 <sup>4</sup>	0,45	1,55	33,40
198	3,33·10 <sup>3</sup>	7	7,65·10 <sup>4</sup>	0,45	1,55	33,40
200	3,33·10 <sup>3</sup>	7	1,02·10 <sup>5</sup>	0,49	1,42	36,42
201	3,33·10 <sup>3</sup>	7	2,30·10 <sup>4</sup>	0,28	2,51	20,59
202	3,33·10 <sup>3</sup>	7	2,30·10 <sup>4</sup>	0,28	2,51	20,59
205	3,33·10 <sup>3</sup>	9	2,90·10 <sup>4</sup>	0,24	2,88	23,06
218	3,33·10 <sup>3</sup>	9	9,15·10 <sup>4</sup>	0,37	1,88	35,31
219	3,33·10 <sup>3</sup>	9	9,15·10 <sup>4</sup>	0,37	1,88	35,31
220	3,33·10 <sup>3</sup>	9	1,22·10 <sup>5</sup>	0,40	1,73	38,38
<b>Promedio ± SD</b>		<b>7,89 ± 1,05</b>	<b>7,05·10<sup>4</sup> ± 3,67·10<sup>4</sup></b>	<b>0,37 ± 0,09</b>	<b>1,99 ± 0,52</b>	<b>30,72 ± 7,17</b>

## 4. Resultados

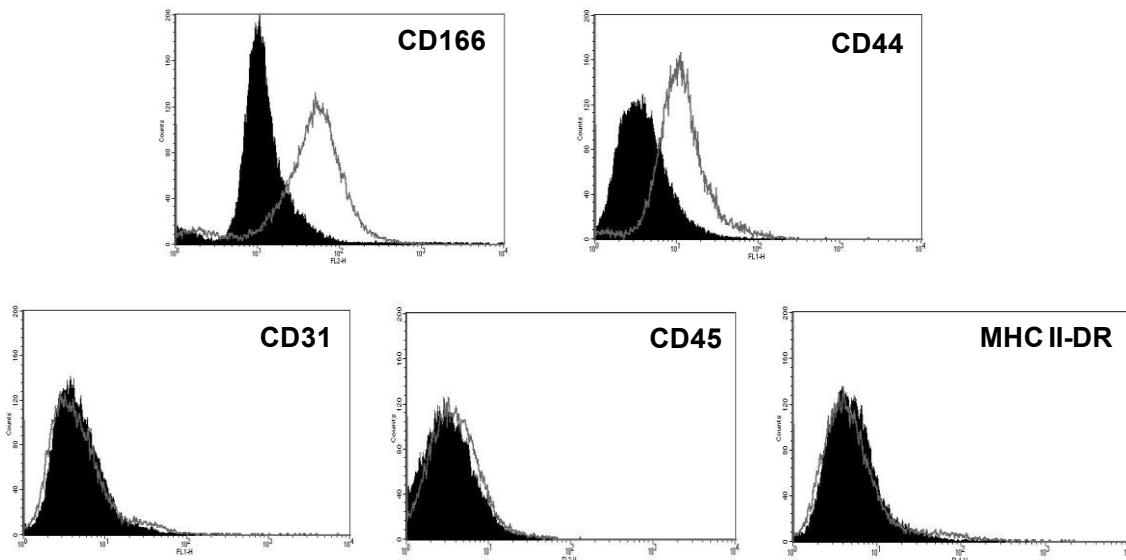
En la siguiente expansión, los parámetros cinéticos de crecimiento de las oMSC obtenidas a partir de la fracción de CMN de MO como de las oMSC-eGFP descongeladas obtuvieron valores más similares entre ellos, tal y como se observa en la Tabla 4.4.:

	n	$\mu$ máx. (días <sup>-1</sup> )	Tiempo duplicación (días)	Factor expansión
<b>oMSC obtenidas de MO</b>	9	0,28 ± 0,05	2,57 ± 0,59	27,39 ± 6,06
<b>oMSC-eGFP</b>	8	0,36 ± 0,07	1,99 ± 0,42	39,99 ± 7,52

El tiempo de expansión total hasta el día de tratamiento para las oMSC obtenidas de MO fue de 20,63 ± 2,67 días y para las oMSC-eGFP de 18,33 ± 1,58 días.

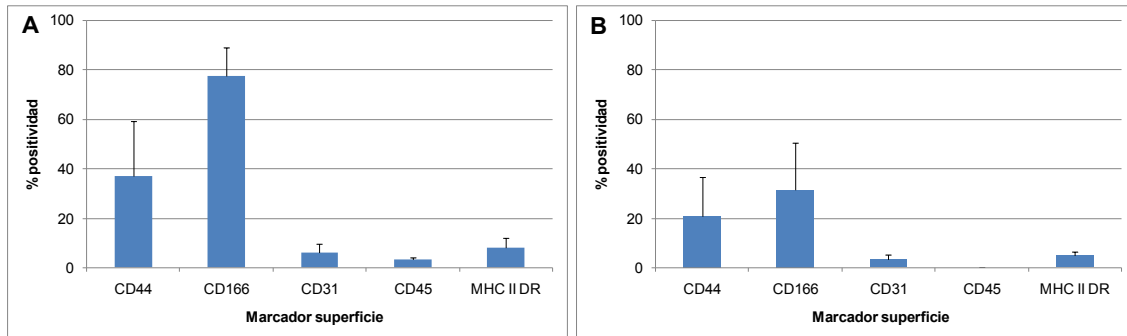
### 4.1.2. Caracterización fenotípica

El análisis se realizó en tres líneas de oMSC a pase 3 (ovejas 204, 206 y 208). Los anticuerpos evaluados CD166 y CD44 mostraron positividad en los marcadores específicos para oMSC. Los anticuerpos CD31, CD45 y MHC de clase II-DR presentaron negatividad para los marcadores del linaje hematopoyético, indicando la ausencia de contaminación o residual con células hematopoyéticas (Figura 4.4.).



**Figura 4.4.** Caracterización fenotípica por citometría de flujo de una población representativa de oMSC para los marcadores característicos de superficie mesenquimales (CD44 y CD166) y hematopoyéticos (CD31, CD45 y MHC de clase II-DR).

El porcentaje de positividad mostró variaciones en función de la comparación con la población no marcada (Figura 4.5.A.) o con los isotipos respectivos de cada anticuerpo utilizado (Figura 4.5.B.). La positividad de los anticuerpos CD44 y CD166 descendió de forma variable en las tres líneas celulares aplicando los isotipos, pero el resultado global se mantuvo positivo para los marcadores mesenquimales y negativo para los marcadores hematopoyéticos.

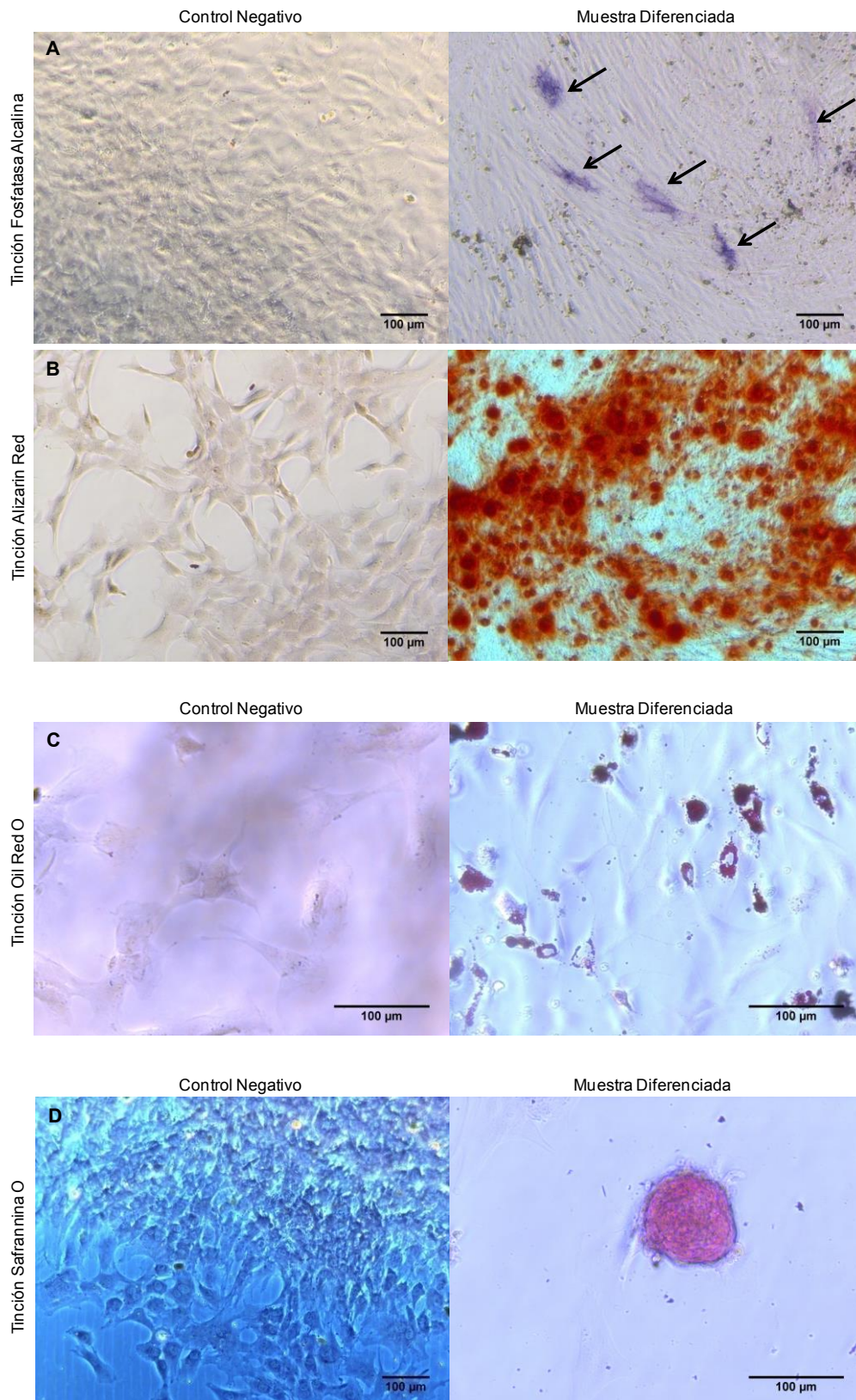


**Figura 4.5.** Gráfico de barras de los porcentajes de positividad para los marcadores característicos mesenquimales (CD44 y CD166) y hematopoyéticos (CD31, CD45 y MHC de clase II-DR) (promedio %  $\pm$  SD) A) sin isotipos y B) con isotipos.

#### 4.1.3. Caracterización funcional

El potencial funcional de las oMSC se realizó en tres líneas a pase 3 (ovejas 204, 206 y 208) y en todos los casos se confirmó la multipotencialidad de los cultivos inmaduros hacia los tres linajes mesenquimales. La diferenciación osteogénica se confirmó por la presencia de células positivas para la tinción de fosfatasa alcalina y por la presencia de acumulaciones de calcio teñidas con Alizarin Red (Figuras 4.6.A. y B.). La diferenciación adipogénica se confirmó por la presencia positiva de depósitos lipídicos intracelulares teñidos con la tinción Oil Red O (Figura 4.6.C). La diferenciación condrogénica se visualizó por la presencia positiva de proteoglicanos teñidos con la tinción con Safranina O en los *micromass* (Figura 4.6.D.).

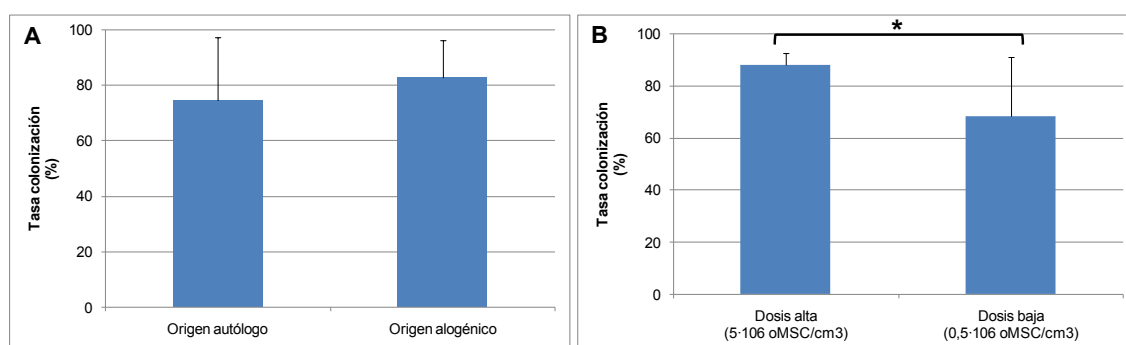
## 4. Resultados



**Figura 4.6.** Caracterización funcional de las oMSC. Diferenciación osteogénica: A) Tinción específica para actividad de la fosfatasa alcalina. B) Tinción con Alizarin Red de los depósitos de calcio. Diferenciación adipogénica: C) Tinción específica de la presencia de depósitos lipídicos intracelulares con Oil Red O. Diferenciación condrogénica: D) Tinción específica de la presencia de proteoglicanos con Safranina O (PhL, 10x, 20x, barra de escala 100 µm).

## 4.2. Análisis de la colonización de partículas óseas desvitalizadas con MSC ovinas

El inóculo inicial de oMSC añadido a  $1 \text{ cm}^3$  de partículas de hueso desvitalizadas fue de  $6 \cdot 10^6$  para la dosis alta de los grupos A y C y  $1 \cdot 10^6$  oMSC/ $\text{cm}^3$  para la dosis baja de los grupos B y D. El tiempo de colonización fue de 12 h 19 min a 16 h 35 min ( $14 \text{ h } 32 \text{ min} \pm 1 \text{ h } 10 \text{ min}$ ). Los porcentajes obtenidos de la tasa de colonización para las oMSC de origen autólogo (grupos A y B) y alogénico (grupos C y D) son muy similares y no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,673$ ) (Figura 4.7.A.). La tasa de colonización sí presenta diferencias significativas ( $p = 0,046$ ) en función de la dosis aplicada. En los grupos con un inóculo inicial alto (grupos A y C) el porcentaje es mayor y con una menor variabilidad mientras que en los grupos con un inóculo inicial bajo (grupos B y D) es menor y más variable (Figura 4.7.B.).



**Figura 4.7.** Tasa de colonización de partículas óseas por oMSC en función de: A) el origen celular y B) la dosis aplicada (promedio %  $\pm$  SD). \* $p < 0,05$ .

En la Tabla 4.5. se muestran los resultados obtenidos de la colonización en cada grupo experimental. Podemos observar que dosis real calculada que ha colonizado las partículas óseas desvitalizadas se aproxima a la dosis celular propuesta para cada grupo experimental.

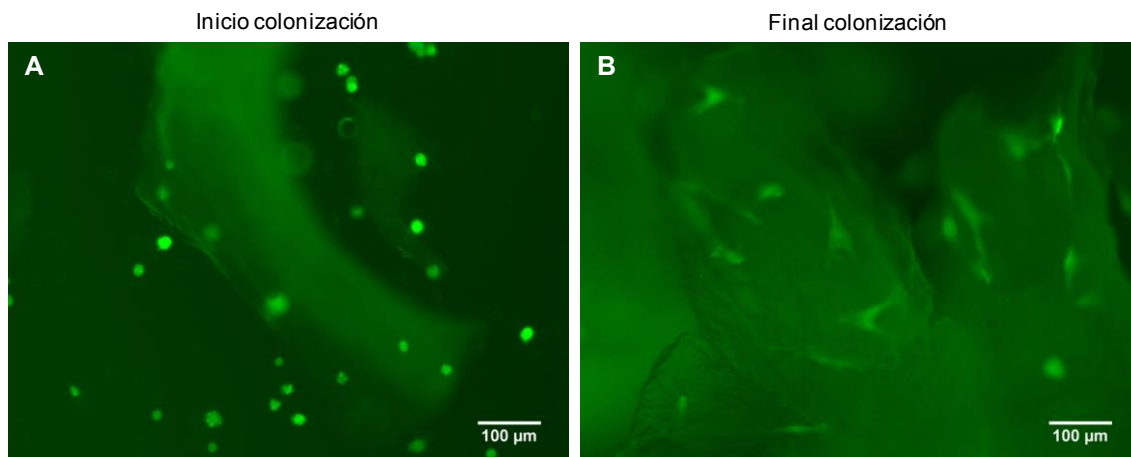
**Tabla 4.5.** Colonización de partículas óseas con oMSC por grupo experimental (promedio  $\pm$  SD)

Grupo	n	Dosis propuesta (oMSC/ $\text{cm}^3$ )	Inóculo inicial (oMSC/ $\text{cm}^3$ )	Dosis real (oMSC/ $\text{cm}^3$ )	Tasa colonización (%)
A	4	$5 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$	$5,36 \cdot 10^6 \pm 3,75 \cdot 10^5$	$89,38 \pm 6,25$
B	4	$0,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$0,56 \cdot 10^6 \pm 2,00 \cdot 10^5$	$59,20 \pm 23,79$
C	4	$5 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$	$5,20 \cdot 10^6 \pm 1,70 \cdot 10^5$	$86,67 \pm 2,83$
D	4	$0,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$0,77 \cdot 10^6 \pm 2,02 \cdot 10^5$	$77,50 \pm 20,21$

#### 4. Resultados

---

En el caso de los grupos C y D pudimos observar bajo fluorescencia la presencia de oMSC-eGFP positivas antes y después de la colonización de las partículas óseas desvitalizadas. En la Figura 4.8. se pueden observar las oMSC-eGFP en suspensión en el momento de añadir el inóculo a las partículas óseas desvitalizadas y, pasado el tiempo de colonización, cómo éstas se han adherido de forma homogénea a la superficie de las partículas óseas adquiriendo una morfología fibroblástica o fusiforme.



**Figura 4.8.** Imágenes de fluorescencia de las oMSC-eGFP en contacto con las partículas óseas desvitalizadas, A) en suspensión antes de la colonización y B) adheridas a las partículas óseas al final de la colonización (L5ET, 10x, barra de escala 100 µm).



### 4.3. Diseño experimental *in vivo*

Un total de 27 ovejas esqueléticamente maduras se incluyeron en el estudio con un peso entre 41 y 63 kg ( $52,35 \pm 6,26$  kg). La distribución de los animales se muestra en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Distribución de los animales incluidos en el estudio experimental *in vivo*

Número oveja	ID oveja	Grupo experimental	Peso inicial (kg)	Observaciones
1	183	E	63,00	
2	184	E	49,00	
3	197	C	54,50	
4	198	C	41,50	
5	199	B	54,00	
6	200	C	46,00	Fractura subtrocantérica a los 15 días de la cirugía de tratamiento.
7	201	C	55,50	
8	202	C	61,50	
9	203	-	60,00	Fractura diafisaria después de la cirugía de inducción de la lesión de ONCF.
10	204	A	58,50	
11	205	D	57,00	Aborto después de la cirugía de inducción de la lesión de ONCF.
12	206	A	55,50	
13	207	A	51,00	
14	208	B	50,00	
15	209	-	46,50	Fallece después de la cirugía de inducción de la lesión de ONCF.
16	210	-	60,00	Fallece después de la cirugía de inducción de la lesión de ONCF.
17	211	A	43,50	
18	212	-	41,00	Fallece por parada cardiorrespiratoria durante la cirugía de inducción de la lesión de ONCF.
19	213	-	54,00	Fallece por parada cardiorrespiratoria durante la cirugía de tratamiento.
20	214	-	49,50	Fallece después de la cirugía de inducción de la lesión de ONCF.
21	215	B	52,00	
22	216	E	54,50	
23	217	E	48,50	
24	218	D	45,50	
25	219	D	58,50	
26	220	D	58,00	
27	221	B	45,00	

La inducción de la lesión de ONCF experimental se realizó en 27 ovejas. De ellas, seis fallecen durante la intervención quirúrgica o en los días posteriores por diferentes causas. Las ovejas 209, 210 y 214 fallecieron en las horas siguientes de la

intervención posiblemente debido a complicaciones derivadas del procedimiento anestésico. La oveja 203 presentó una fractura a nivel de la diáfisis femoral a las tres semanas de la intervención y tuvo que ser eutanasiada. Las ovejas 212 y 213 tuvieron una parada cardiorrespiratoria sin éxito de recuperación en el momento de la intervención quirúrgica. La oveja 205 presentó un aborto a los días de la intervención, pero se incluye en el estudio ya que se previó la recuperación y estabilización del animal de cara a la cirugía de tratamiento de la ONCF.

La cirugía de aplicación del tratamiento experimental se realizó en 21 ovejas, de las que 20 completaron todo el periodo de estudio de 12 semanas. La oveja 200 presentó una fractura subtrocantérica a los 15 días después de la intervención, por lo que tuvo que ser eutanasiada.

### 4.4. Evaluación clínica postoperatoria

#### 4.4.1. Seguimiento clínico

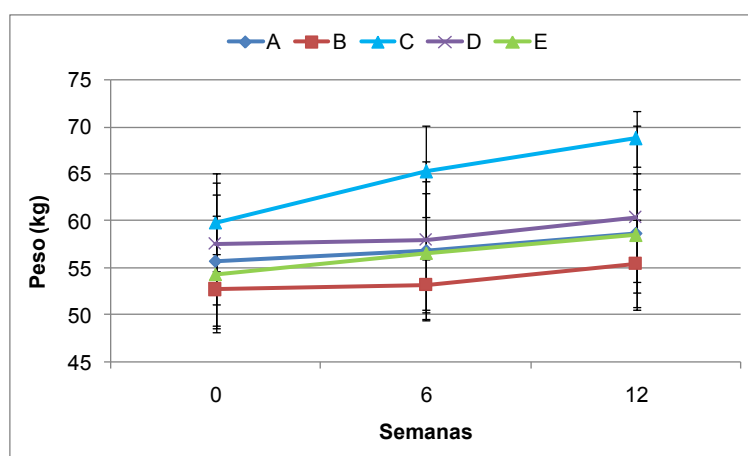
Todas las ovejas fueron capaces de ambular y apoyar las cuatro extremidades inmediatamente después de las intervenciones. En las siguientes horas postoperatorias de las cirugías de inducción de la lesión y de tratamiento, los animales presentaron muestras de cojera en la extremidad intervenida acompañados de signos de dolor que fueron aminorando progresivamente al cabo del tiempo. La herida quirúrgica presentó en algunos casos hinchazón y algún sangrado ocasional en los primeros días postquirúrgicos pero fue disminuyendo con el tiempo. No se observaron complicaciones quirúrgicas importantes durante o posteriores a las intervenciones en aquellas ovejas que completaron todas las fases experimentales.

El aspecto general, la temperatura corporal así como los hábitos urinarios y de defecación fueron normales en todos los casos. Ningún animal presentó una condición mental o conducta alterada durante el seguimiento clínico.

Todos los grupos presentaron un aumento moderado o un mantenimiento del peso entre la cirugía de inducción de la lesión de ONCF hasta la cirugía de tratamiento. Del mismo modo, todos los grupos presentaron un aumento de peso después de la cirugía de tratamiento hasta el final del estudio a las 12 semanas (Tabla 4.7. y Figura 4.9.). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos dentro del mismo periodo de tiempo (semana 0,  $p = 0,489$ ; semana 6,  $p = 0,144$ ; semana 12,  $p = 0,076$ ).

**Tabla 4.7. Distribución del peso por grupos experimentales y periodo de tiempo (promedio kg  $\pm$  SD)**

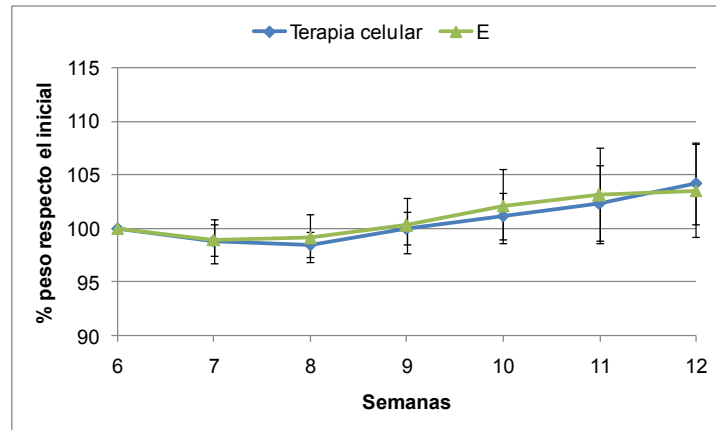
Grupo	n	Basal (Semana 0)	Pretratamiento (Semana 6)	Fin estudio (Semana 12)
A	4	55,75 $\pm$ 7,09	56,88 $\pm$ 7,35	58,75 $\pm$ 6,38
B	4	52,75 $\pm$ 3,77	53,25 $\pm$ 2,66	58,75 $\pm$ 6,38
C	4	59,88 $\pm$ 5,22	65,25 $\pm$ 4,86	68,75 $\pm$ 2,90
D	4	57,63 $\pm$ 6,46	58,00 $\pm$ 8,38	60,38 $\pm$ 9,78
E	4	54,38 $\pm$ 6,18	56,63 $\pm$ 6,29	58,50 $\pm$ 4,95



**Figura 4.9.** Evolución del peso por grupos experimentales en los diferentes periodos temporales. Basal, antes de la cirugía de inducción de la lesión de ONCF por crioterapia (semana 0), pretratamiento, antes de la cirugía de aplicación del tratamiento experimental (semana 6) y fin de estudio (semana 12) (promedio kg  $\pm$  SD).

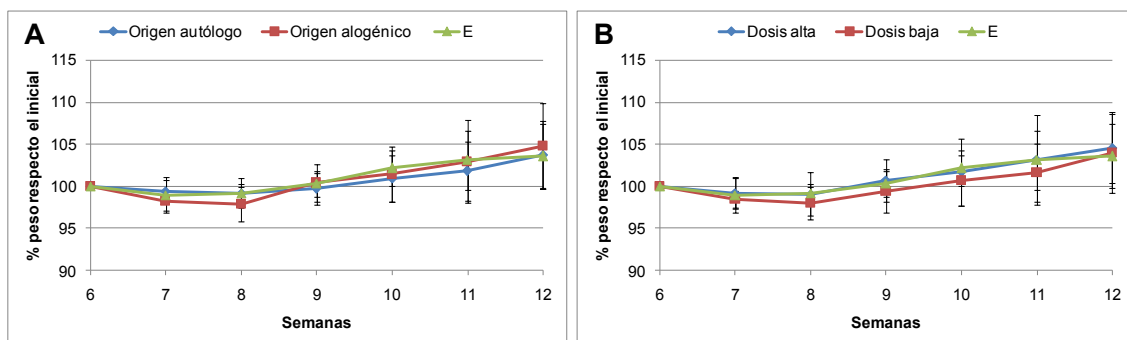
La evolución del peso semanal durante el periodo de tratamiento respecto el peso en el momento de la cirugía de aplicación de los tratamientos experimentales se comparó en función de los grupos que recibieron los productos de ingeniería tisular y terapia celular (grupos A-D) (independientemente de su origen y dosis) con el grupo E, al que se le realizó el procedimiento de DC. En ambos casos se observa un descenso inicial en las dos primeras semanas postratamiento pero que es recuperado e incrementado en las siguientes semanas posteriores (Figura 4.10.). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a lo largo del seguimiento postratamiento (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).

## 4. Resultados



**Figura 4.10.** Evolución del % de peso durante las semanas de seguimiento postratamiento respecto al peso en el momento de la cirugía de tratamiento en función de la aplicación de terapia celular (grupos A-D) o descompresión central (grupo E) (promedio %  $\pm$  SD).

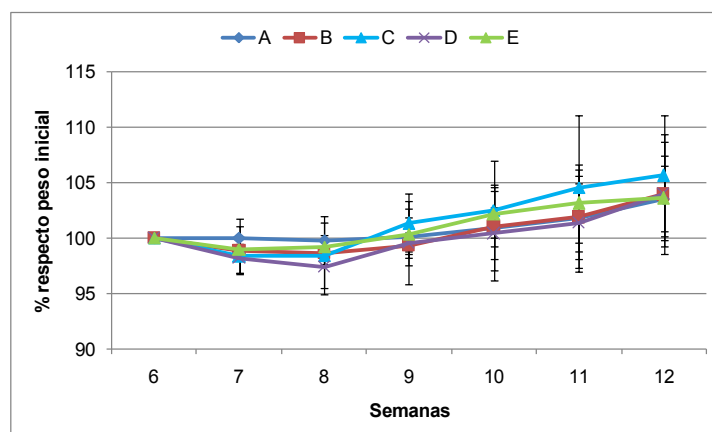
En la comparación de la evolución del peso en función del origen celular, autólogo (grupos A y B) o alogénico (grupos C y D), o de la dosis recibida, alta (grupos A y C) o baja (grupos B y D), se observó que en las dos primeras semanas los grupos con oMSC autólogas presentarían un menor descenso del peso, pero que a partir de la semana 9 sería muy similar al grupo con oMSC alogénicas. En relación a la dosis, los grupos con dosis alta presentarían un descenso menor que los grupos de dosis baja en las dos primeras semanas recuperándose de forma similar a partir de la semana 9. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (en todos los casos,  $p > 0,1$ ) (Figura 4.11.).



**Figura 4.11.** Evolución del % de peso durante las semanas de seguimiento postratamiento respecto al peso en el momento de la cirugía de tratamiento en función de A) el origen celular (autólogo –grupos A y B–, alogénico –grupos C y D–) o B) de la dosis celular (dosis alta –grupos A y C–, dosis baja –grupos B y D–) (promedio %  $\pm$  SD).

La evolución del peso semanal de los diferentes grupos experimentales A-E en el periodo de tratamiento muestra el mismo comportamiento que en los resultados anteriores, con un descenso inicial en las dos primeras semanas pero que es

recuperado e incrementado en las siguientes semanas posteriores. El grupo C muestra una tendencia a un ligero crecimiento superior respecto al resto de grupos experimentales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (en todos los casos,  $p > 0,1$ ) (Figura 4.12.).



**Figura 4.12.** Evolución del % de peso durante las semanas de seguimiento postratamiento respecto el peso en el momento de la cirugía de tratamiento de cada grupo experimental (grupos A-E) (promedio %  $\pm$  SD).

En la Tabla 4.8. se detalla la evolución de los pesos por grupo de tratamiento (A-E).

**Tabla 4.8. Evolución del peso respecto el inicial durante el periodo de tratamiento (promedio %  $\pm$  SD)**

Grupo	n	Semanas						
		6	7	8	9	10	11	12
A	4	100	100,01±1,77	99,79±2,21	100,07±2,56	100,88±3,86	101,76±4,41	103,54±3,00
B	4	100	98,82±0,51	98,62±1,18	99,33±1,18	101,17±1,66	101,87±3,05	103,93±5,40
C	4	100	98,35±1,62	98,40±2,97	101,29±2,73	102,53±4,47	104,54±6,50	105,63±5,47
D	4	100	98,16±1,30	97,37±2,46	99,55±3,74	100,37±4,24	101,33±4,33	103,95±4,71
E	4	100	98,95±2,11	99,17±1,13	100,32±1,53	102,15±2,14	103,12±3,52	103,57±3,80

#### 4.4.2. Seguimiento analítico

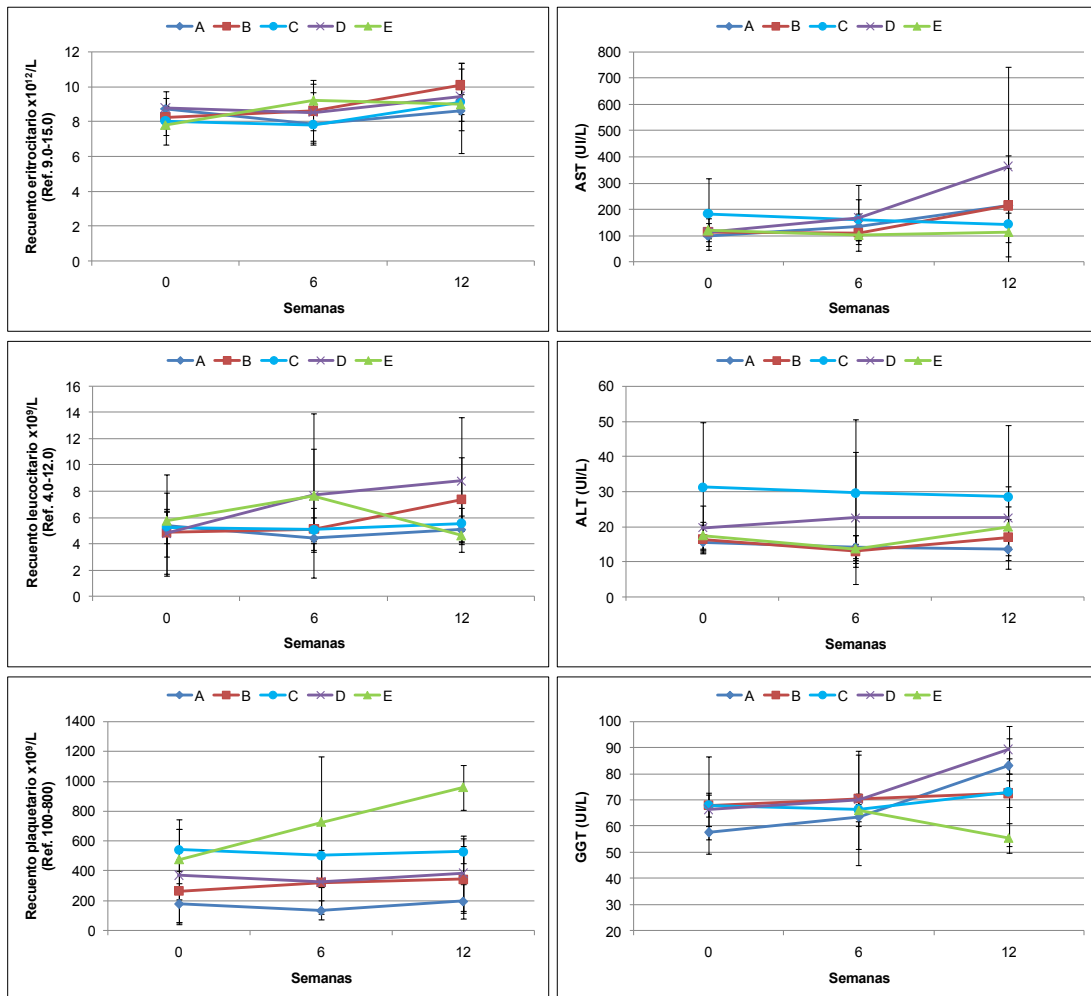
En las muestras de sangre periférica recogidas antes de cualquier intervención para tener el valor basal de cada animal, antes del tratamiento a las seis semanas de la inducción de la lesión de ONCF y al final del estudio pasadas las seis semanas de tratamiento se obtuvieron los siguientes resultados.

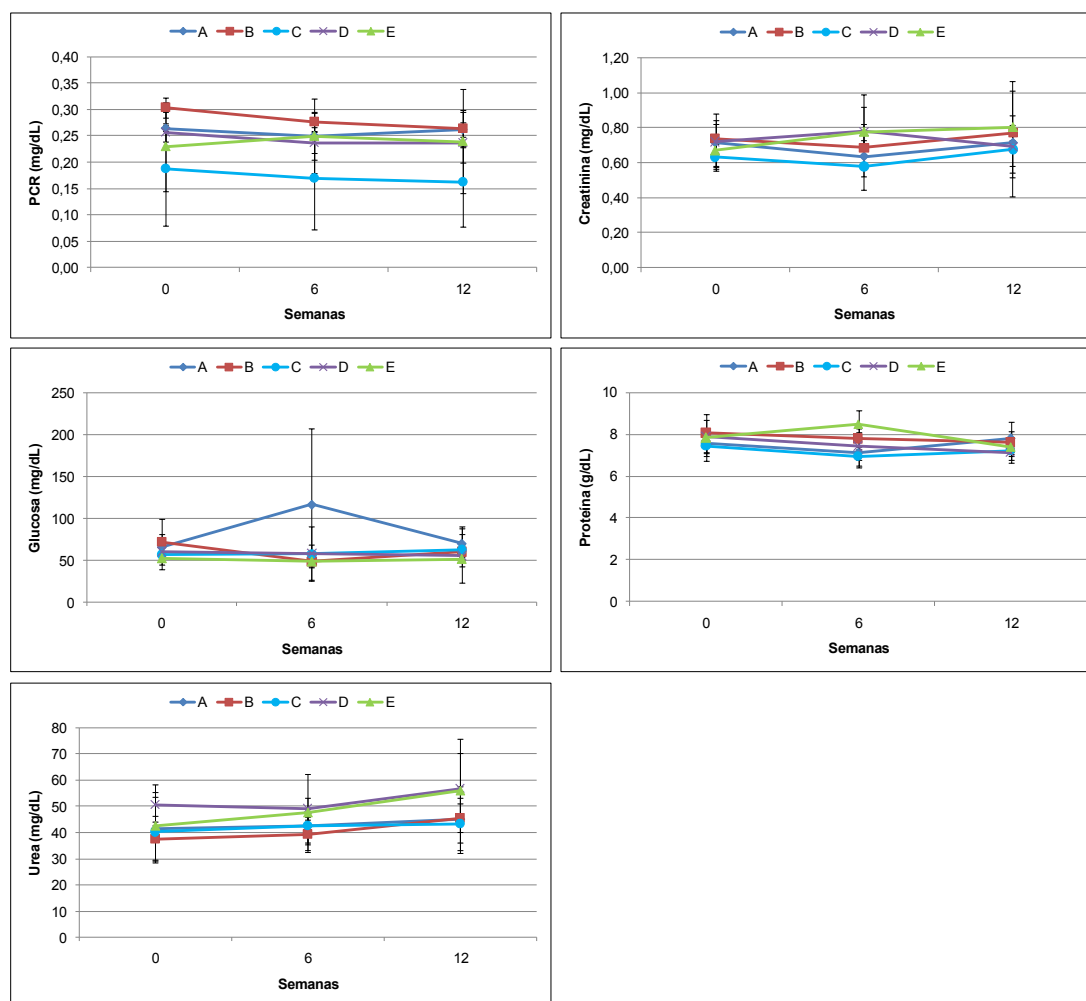
Los parámetros analizados del hemograma muestran valores similares en los tres puntos de tiempo estudiados en todos los grupos (Figura 4.13.). En el recuento leucocitario, los valores del grupo D en la semana 12 son ligeramente superiores que el resto de grupos pero entran dentro del rango de valores de referencia. Los valores

## 4. Resultados

del recuento plaquetario del grupo E son más elevados significativamente en la semana 6 ( $p = 0,047$ ), antes del tratamiento, y en la semana 12, al final del estudio ( $p = 0,004$ ) respecto el resto de los grupos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos para el resto de parámetros (en todos los casos,  $p > 0,05$ ). Los resultados de bioquímica y hemostasia también muestran valores constantes en todos los grupos. Los valores de AST y GGT del grupo D muestran una tendencia más elevada que el resto de grupos debido a valores especialmente elevados de una oveja. Sin embargo, no se relacionaron con otras alteraciones en este animal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos para los parámetros estudiados (en todos los casos,  $p > 0,05$ ).

El conjunto de los valores de los parámetros analíticos estudiados se encuentran dentro de los rangos fisiológicos de todas las ovejas y no indican signos de respuesta inmunitaria ni manifestaciones de enfermedad de injerto contra el huésped a los tratamientos implantados. Tampoco se observan alteraciones homeostáticas ni signos de toxicidad sistémica.





**Figura 4.13.** Parámetros analíticos de los diferentes grupos experimentales (grupos A-E). Basal, antes de la cirugía de inducción de la lesión de ONCF por crioterapia (semana 0), pretratamiento, antes de la cirugía de aplicación del tratamiento experimental (semana 6) y fin de estudio (semana 12) (promedio  $kg \pm SD$ ).

## 4.5. Evaluación por estudios de imagen

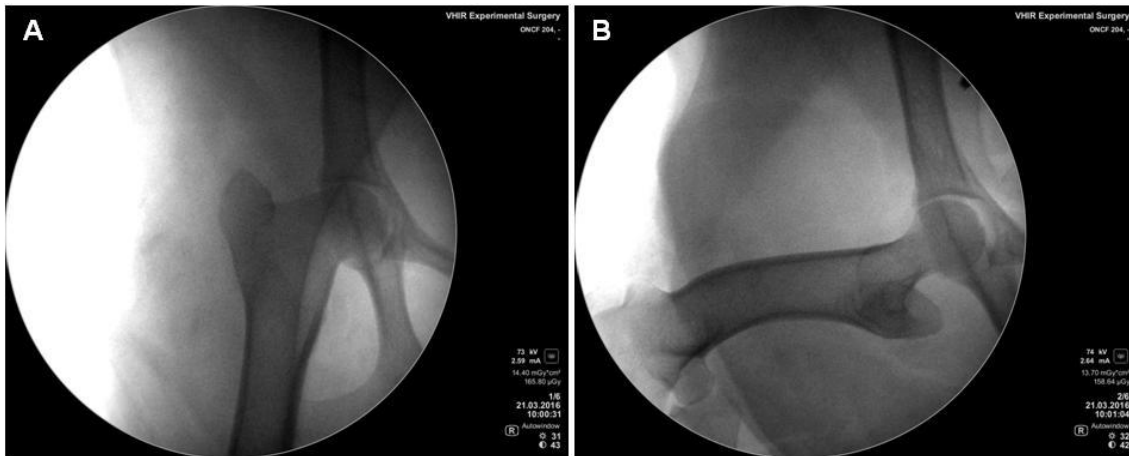
### 4.5.1. Radiografía simple

En las proyecciones radiológicas preoperatorias en la semana 0 de las 27 ovejas verificamos el cierre fisario en todos los animales y la ausencia de deformidades u otras alteraciones previas de la cabeza femoral. Después de la cirugía de inducción de la lesión de ONCF comprobamos una fractura a nivel de la diáfisis proximal femoral en la oveja 203, que comportó la eutanasia del animal.

En las proyecciones radiológicas preoperatorias en la semana 6 en las 21 ovejas que recibieron los tratamientos experimentales se comprobó la ausencia de colapso

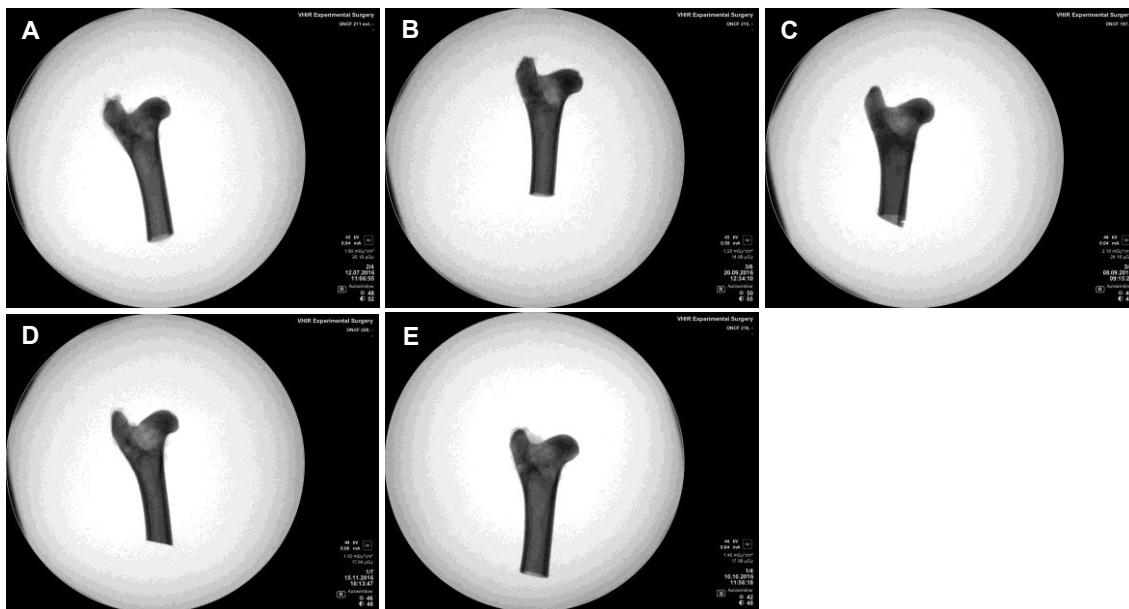
#### 4. Resultados

femoral en todos los animales (Figura 4.14.). En la semana 8 verificamos una fractura a nivel de la diáfisis proximal femoral en la oveja 200, que también supuso la eutanasia del animal.



**Figura 4.14.** Imágenes radioscópicas representativas (oveja 204) a las 6 semanas de la inducción de la lesión de ONCF por crioterapia. A) Proyección AP con rotación interna. B) Proyección axial.

Al final del periodo de estudio, en la semana 12, confirmamos la ausencia de colapso, deformidades o formación de hueso ectópico en los 20 animales que completaron las 6 semanas de tratamiento (Figura 4.15.).

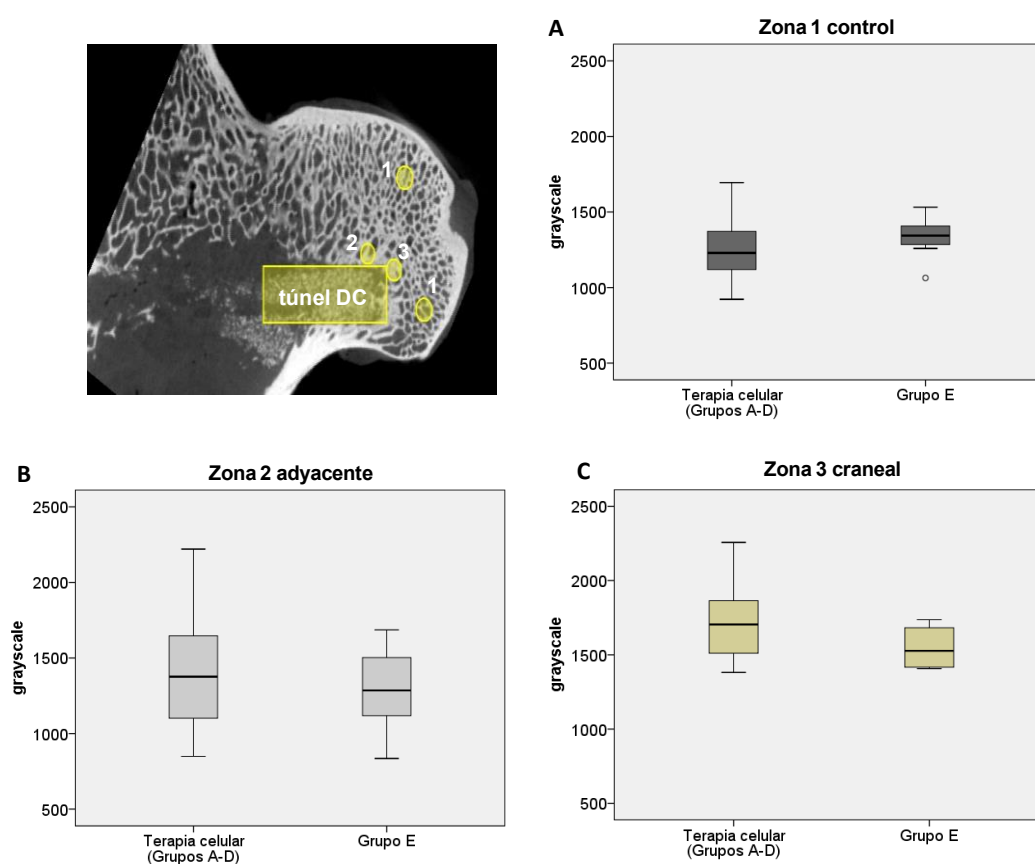


**Figura 4.15.** Imágenes radioscópicas representativas del fémur derecho extraído al final del estudio de los diferentes grupos experimentales: A) grupo A (oveja 211), B) grupo B (oveja 215), C) grupo C (oveja 197), D) grupo D (oveja 220) y E) grupo E (oveja 216).



#### 4.5.2. Microtomografía computarizada (microCT)

En el análisis de las imágenes de microCT observamos que en la zona 1 control los valores de *grayscale* del tejido trabecular presentaron valores similares entre los animales que recibieron terapia celular (grupos A-D) o el procedimiento de descompresión central (grupo E) ( $p = 0,207$ ). En la zona 2 adyacente al túnel de DC y en la zona 3 craneal al túnel de DC los valores de *grayscale* del grupo que recibió terapia celular presentaron una tendencia hacia valores incrementados respecto al grupo E pero no fueron estadísticamente significativos (en ambos casos,  $p > 0,1$ ) (Figura 4.16.).



**Figura 4.16.** Valores de *grayscale* obtenidos en el análisis de los VOIs del microCT en función de la aplicación de terapia celular (grupos A-D) o descompresión central (grupo E). A) Zona 1 control, B) zona 2 adyacente al túnel de DC y C) zona 3 craneal al túnel de DC.

En la Tabla 4.9. se muestran los promedios y los rangos del contenido mineral expresado en  $\text{mgHA}/\text{cm}^3$  de los VOIs analizados en función de la aplicación de terapia celular (grupos A-D) o de la realización de DC (grupo E). Se puede observar que en la zona 1 control los valores son similares en ambos grupos, mientras que el grupo de terapia celular presenta un contenido mineral promedio superior que el grupo E en las zonas 2 y 3.

#### 4. Resultados

Tabla 4.9. Contenido mineral de los VOIs analizados por terapia celular o DC (promedio mgHA/cm<sup>3</sup> ± SD, rango)

Grupo	n <sup>§</sup>	Zona 1 Control	Zona 2 Adyacente	Zona 3 Craneal
Terapia celular (Grupos A-D)	64 / 32	549,54 ± 73,82 (404,07 – 751,55)	613,91 ± 144,40 (371,17 – 988,25)	770,67 ± 114,28 (610,76 – 1004,43)
DC (Grupo E)	8 / 4	588,97 ± 50,41 (467,66 – 678,18)	570,27 ± 114,24 (364,83 – 747,57)	686,28 ± 61,11 (622,20 – 770,56)

<sup>§</sup>Zona 1 y 2 (terapia celular n = 64; grupo E n = 8), Zona 3 (terapia celular n = 32; grupo E n = 4)

Los valores de *grayscale* obtenidos en la zona 1 control en los grupos analizados según el origen celular, autólogo o alogénico, o la dosis aplicada, alta o baja, mostraron similitud entre ellos. De forma parecida que anteriormente, en la zona 2 adyacente al túnel de DC y en la zona 3 craneal al túnel de DC los valores de *grayscale* de los grupos que recibieron oMSC fueron ligeramente superiores al grupo E, presentando un incremento mayor en el caso de los grupos de origen alogénico y dosis alta. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 4.17.).

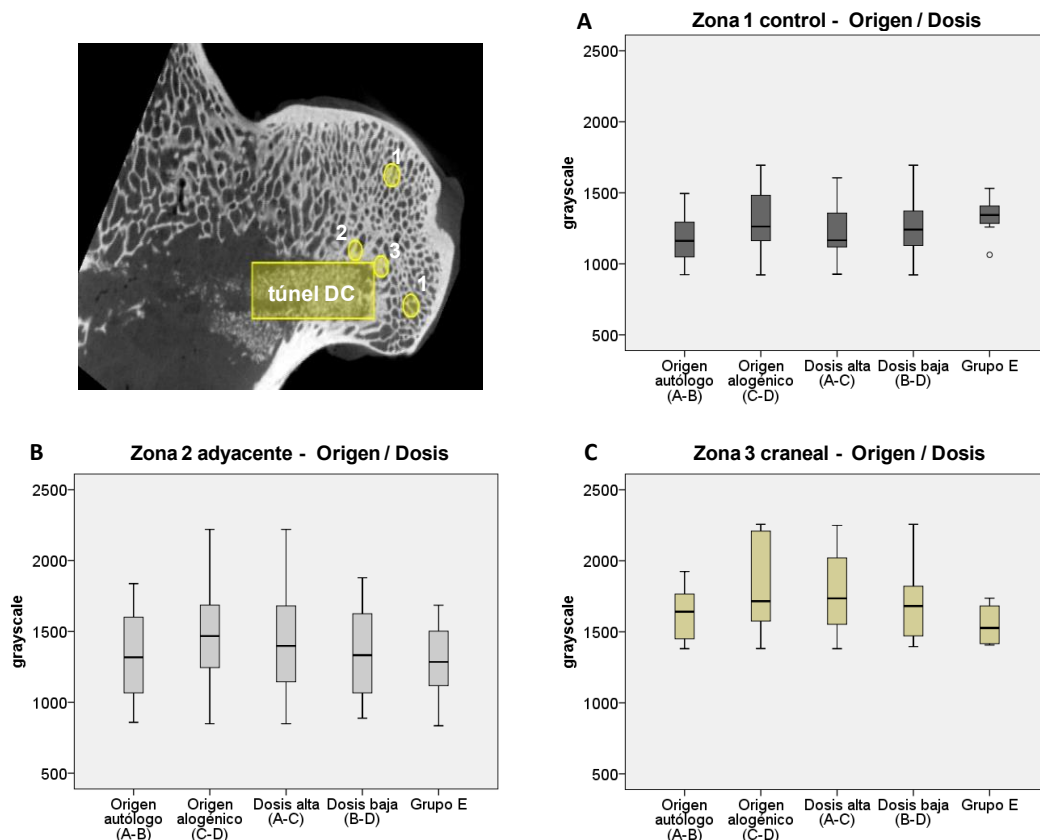


Figura 4.17. Valores de *grayscale* obtenidos en el análisis de los VOIs de las imágenes del microCT en función del origen y la dosis celular. A) zona 1 control, B) zona 2 adyacente al túnel de DC y C) zona 3 craneal al túnel de DC.

En la Tabla 4.10. se muestran los promedios y los rangos del contenido mineral expresado en mgHA/cm<sup>3</sup> de los VOIs analizados en función del origen celular y de la dosis celular aplicada. Los grupos experimentales que recibieron los tratamientos con oMSC de origen alogénico presentan un contenido mineral promedio más elevado en las zonas 2 y 3, seguido de los grupos de dosis alta, dosis baja, origen autólogo y, por último, el grupo E.

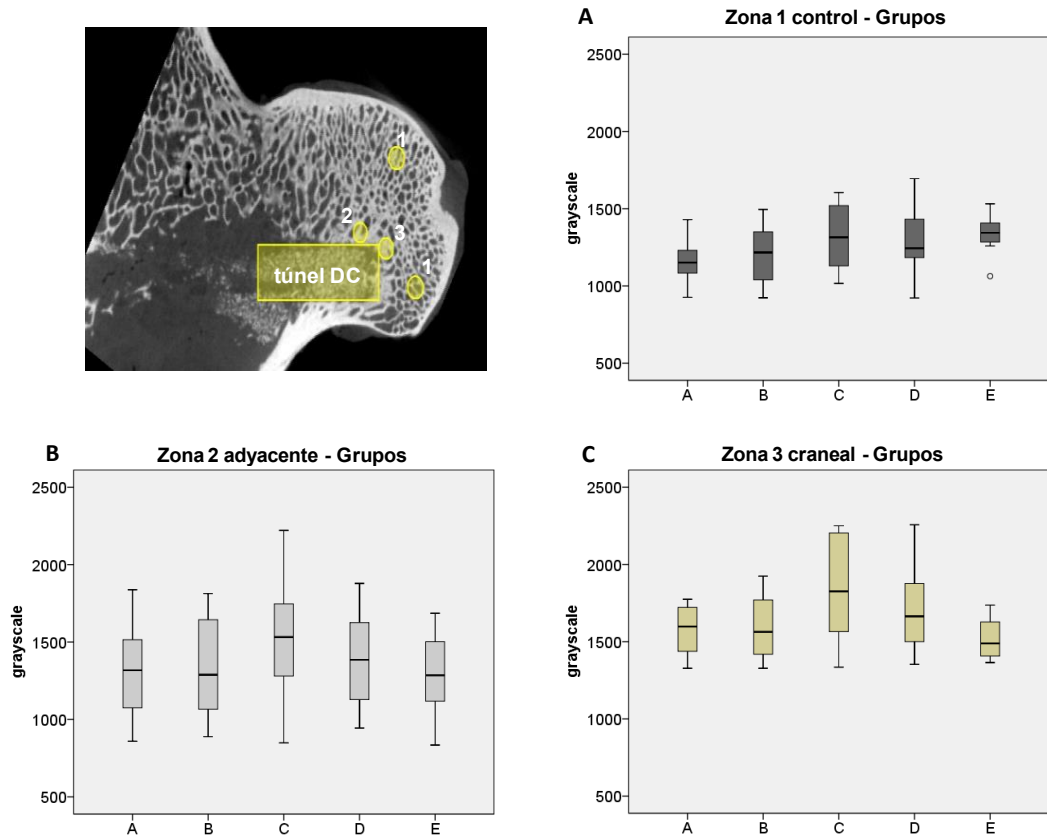
**Tabla 4.10. Contenido mineral de los VOIs analizados por origen y dosis celular (promedio mgHA/cm<sup>3</sup> ± SD, rango)**

Grupo	n <sup>§</sup>	Zona 1 Control	Zona 2 Adyacente	Zona 3 Craneal
<b>Origen autólogo (Grupos A y B)</b>	32 / 16	520,23 ± 59,68 (404,51 – 661,84)	587,39 ± 127,74 (375,86 – 816,00)	721,07 ± 68,08 (610,76 – 854,94)
<b>Origen alogénico (Grupos C y D)</b>	32 / 16	578,85 ± 77,57 (404,07 – 751,55)	640,44 ± 157,45 (371,17 – 988,25)	820,27 ± 133,62 (611,36 – 1004,43)
<b>Dosis alta (Grupos A y C)</b>	32 / 16	546,79 ± 75,31 (406,10 – 711,29)	627,64 ± 161,57 (371,17 – 988,25)	788,98 ± 122,82 (610,76 – 1001,37)
<b>Dosis baja (Grupos B y D)</b>	32 / 16	552,29 ± 73,59 (404,07 – 751,55)	600,19 ± 126,51 (389,02 – 834,55)	752,35 ± 106,52 (617,14 – 1004,43)
<b>DC (Grupo E)</b>	8 / 4	588,97 ± 50,41 (467,66 – 678,18)	570,27 ± 114,24 (364,83 – 747,57)	686,28 ± 61,11 (622,20 – 770,56)

<sup>§</sup>Zona 1 y 2 (grupos origen y dosis n = 32; grupo E n = 8), Zona 3 (grupos origen y dosis n = 16; grupo E n = 4)

Los valores de *grayscale* obtenidos en el análisis individual de los diferentes grupos experimentales (grupos A-E) muestran un comportamiento similar en las diferentes zonas estudiadas que en los análisis anteriores. En la zona 1 control se observa una cierta homogeneidad entre los diferentes grupos. En la zona 2 adyacente al túnel de DC los valores presentan una mayor variabilidad intragrupo y los promedios los cuatro tratamientos experimentales son ligeramente superiores que el grupo E. En la zona 3 craneal al túnel de DC los tratamientos experimentales muestran un promedio mayor que el grupo E. Estas diferencias, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas (en todos los casos, p>0,1) (Figura 4.18.).

#### 4. Resultados



**Figura 4.18.** Valores de *grayscale* obtenidos en el análisis de los VOIs de las imágenes del microCT de los diferentes grupos experimentales (grupos A-E). A) zona 1 control, B) zona 2 adyacente al túnel de DC y C) zona 3 craneal al túnel de DC.

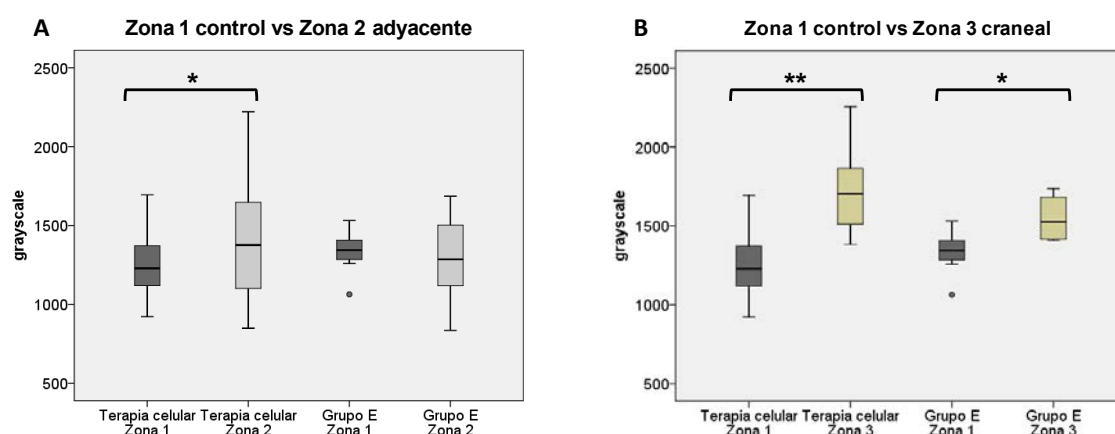
En la Tabla 4.11. se muestran los promedios y rangos del contenido mineral expresado en  $\text{mgHA}/\text{cm}^3$  de los VOIs de los diferentes grupos evaluados (grupos A-E). Podemos observar que el grupo C presenta un contenido mineral promedio más elevado en las zonas 2 y 3, seguido de los grupos D, A, B y, por último, el grupo E.

**Tabla 4.11. Contenido mineral de los VOIs analizados por grupos experimentales (promedio  $\text{mgHA}/\text{cm}^3 \pm \text{SD}$ , rango)**

Grupo	n <sup>§</sup>	Zona 1 Control	Zona 2 Adyacente	Zona 3 Craneal
A	16 / 8	508,10 ± 47,64 (406,10 – 632,02)	579,66 ± 124,77 (375,86 – 816,00)	724,47 ± 51,39 (610,76 – 787,30)
B	16 / 8	532,36 ± 70,05 (404,51 – 661,84)	595,11 ± 134,65 (389,02 – 804,94)	717,67 ± 86,35 (617,14 – 854,94)
C	16 / 8	585,48 ± 82,53 (446,21 – 711,29)	675,62 ± 184,41 (371,17 – 988,25)	853,50 ± 146,90 (611,36 – 1001,37)
D	16 / 8	572,23 ± 74,83 (407,10 – 751,55)	605,27 ± 122,44 (414,21 – 834,55)	787,04 ± 120,74 (655,09 – 1004,43)
E	8 / 4	588,97 ± 50,41 (467,66 – 678,18)	570,27 ± 114,24 (364,83 – 747,57)	686,28 ± 61,11 (622,20 – 770,56)

<sup>§</sup>Zona 1 y 2 (grupos A-D n = 16; grupo E n = 8), Zona 3 (grupos A-D n = 8; grupo E n = 4)

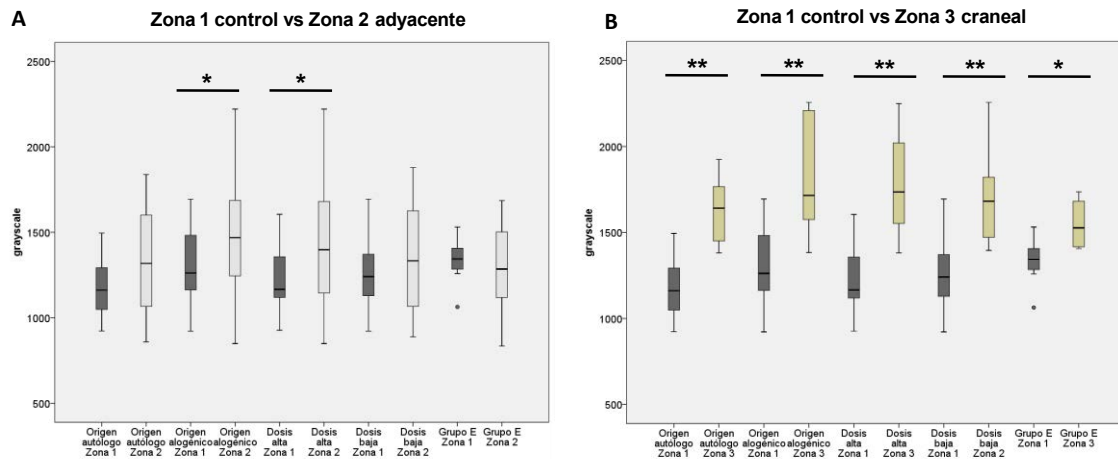
En la comparación entre la zona 1 control respecto la zona 2 adyacente al túnel de DC y la zona 3 craneal al túnel de DC se observó lo siguiente. El grupo de terapia celular en la zona 2 adyacente al túnel de DC (Figura 4.19.A.) y en la zona 3 craneal al túnel de DC (Figura 4.19.B.) presenta un incremento en los valores de *grayscale* obtenidos respecto la zona 1 control estadísticamente significativo ( $p = 0,004$  y  $p = 0,0001$ , respectivamente). El grupo E no presentó diferencias entre la zona 2 adyacente al túnel de DC y al zona 1 control ( $p = 0,710$ ). En la zona 3 craneal del grupo E, los valores se incrementan significativamente respecto la zona 1 control ( $p = 0,034$ ), pero esta diferencia no es tan pronunciada como en el grupo de terapia celular.



**Figura 4.19.** Valores de *grayscale* obtenidos en el análisis de los VOIs de las imágenes de microCT en función de la aplicación de terapia celular (grupos A-D) o descompresión central (grupo E). A) Comparación de la zona 1 control con zona 2 adyacente al túnel de DC. B) Comparación de la zona 1 control con zona 3 craneal al túnel de DC. \* ( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,001$ ).

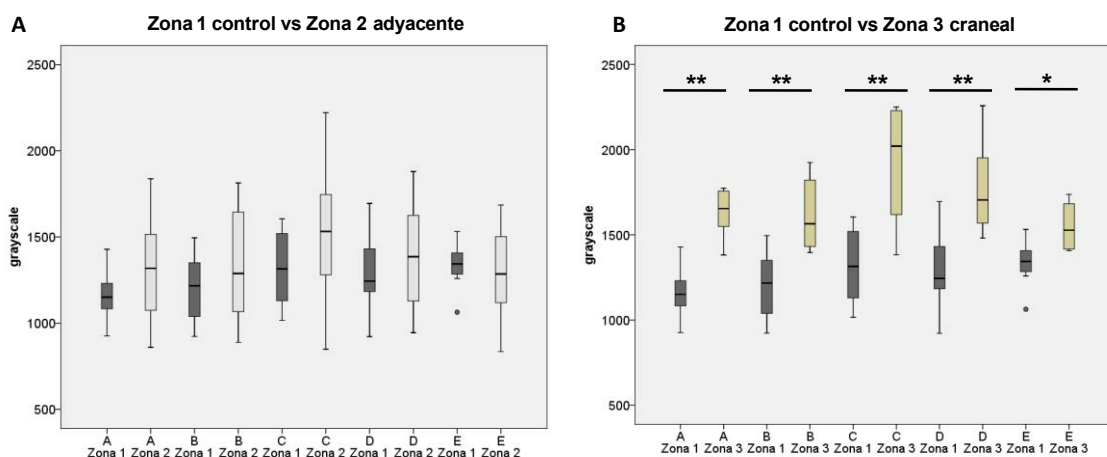
En la comparación de la zona 1 control con la zona 2 adyacente al túnel de DC (Figura 4.20.A.) se observó que esta última presentó valores de intensidad de gris más elevados en los grupos que recibieron oMSC tanto de origen autólogo (grupos A y B) como alogénico (grupos C y D) y a dosis alta (grupos A y C) y baja (grupos B y D), pero también con una dispersión mayor. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en los grupos de origen alogénico y dosis alta ( $p < 0,05$ ). En la comparación de la zona 1 control con la zona 3 craneal al túnel de DC (Figura 4.20.B.) se observó que los valores de intensidad de gris en la zona craneal fueron más altos en todos los grupos estudiados. Las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los grupos, siendo más pronunciadas en aquellos grupos que recibieron oMSC tanto de origen autólogo como alogénico y a dosis alta y baja ( $p < 0,0001$ ) respecto el grupo E ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultados



**Figura 4.20.** Valores de *grayscale* obtenidos en el análisis de los VOIs de las imágenes de microCT en función del origen celular y la dosis aplicada. A) Comparación de la zona 1 control con zona 2 adyacente al túnel de DC. B) Comparación de la zona 1 control con zona 3 craneal al túnel de DC. \* ( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,001$ ).

En la comparación de la zona 1 control con la zona 2 adyacente al túnel de DC por grupos experimentales (Figura 4.21.A.) se observaron valores más elevados de *grayscale* en esta última en todos los grupos experimentales con oMSC menos en el grupo E. Estos valores no presentaron diferencias estadísticamente significativas (en todos los grupos,  $p > 0,1$ ). En la comparación de la zona 1 control con la zona 3 craneal al túnel de DC (Figura 4.21.B.) se observó un comportamiento similar que en el caso anterior, los grupos experimentales A-D presentan valores promedio de intensidad de gris en la zona 3 craneal mucho más elevados que en la zona 1 control y de forma más pronunciada significativamente ( $p < 0,0001$ ) que en el grupo E ( $p = 0,034$ ).

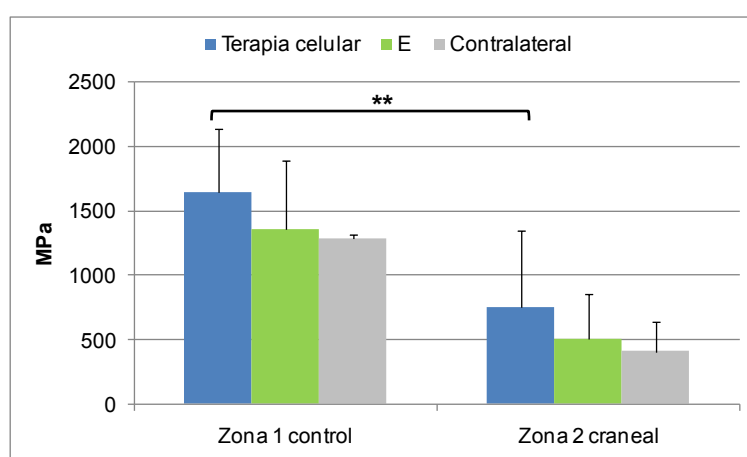


**Figura 4.21.** Valores de *grayscale* obtenidos en el análisis de los VOIs de las imágenes de microCT de los diferentes grupos de tratamiento. A) Comparación de la zona 1 control con zona 2 adyacente al túnel de DC. B) Comparación de la zona 1 control con zona 3 craneal al túnel de DC. \* ( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,001$ ).

#### 4.6. Evaluación biomecánica por test de indentación

Los valores del módulo de compresión obtenidos en la zona 1 control no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los animales que recibieron terapia celular (grupos A-D), el grupo E y las cabezas femorales contralaterales ( $p > 0,1$ ). Se observa la misma situación en la zona 2 craneal ( $p > 0,1$ ). Los grupos de animales que recibieron terapia celular presentan, a pesar de no ser estadísticamente significativos, valores del módulo de compresión más elevados en las zonas 1 control y 2 craneal en comparación con el grupo E y las cabezas femorales contralaterales no intervenidas (Figura 4.22.).

Los valores obtenidos entre la zona 1 control y la zona 2 craneal presentan diferencias significativas en el grupo de terapia celular ( $p = 0,0001$ ) y no en los otros dos grupos ( $p > 0,1$ ).



**Figura 4.22.** Módulo de compresión de las zonas 1 y 2 de la aplicación de terapia celular (grupos A-D) o descompresión central (grupo E) (promedio MPa  $\pm$  SD). \*\* ( $p < 0,001$ )

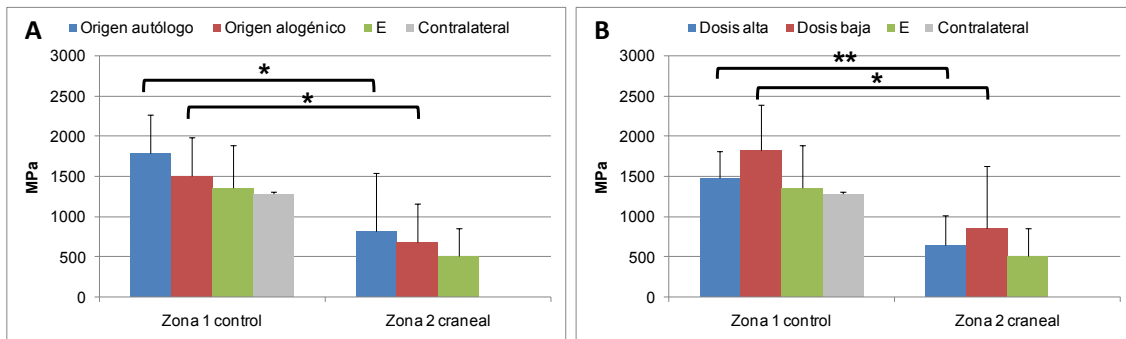
En la Tabla 4.12. se muestran los resultados obtenidos de los valores promedio y los rangos del módulo de compresión obtenido agrupados en función de la aplicación de terapia celular (grupos A-D) o de la realización del túnel de DC (grupo E).

**Tabla 4.12. Módulo de compresión analizado por tratamiento celular o DC (promedio MPa  $\pm$  SD, rango)**

Grupo	n	Zona 1 control	Zona 2 craneal
<b>Tratamiento celular (Grupos A-D)</b>	16	1649,16 $\pm$ 482,53 (928,60 – 2530,10)	749,61 $\pm$ 596,73 (3,70 – 2150,60)
<b>DC (Grupo E)</b>	2	1357,20 $\pm$ 532,31 (980,80 – 1733,60)	508,70 $\pm$ 345,63 (264,30 – 753,10)
<b>Contralateral</b>	2	1284,20 $\pm$ 29,84 (1263,10 – 1305,30)	—

#### 4. Resultados

Los valores del módulo de compresión obtenidos en la zona 1 control no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de distinto origen celular, autólogo (grupos A y B) o alogénico (grupos C y D) ( $p > 0,1$ ) (Figura 4.23.A.) o distinta dosis recibida, alta (grupos A y C) o baja (grupos B y D) ( $p > 0,1$ ) (Figura 4.23.B.). Se observa la misma situación en la zona 2 craneal (en todos los casos,  $p > 0,1$ ). Los grupos de origen celular autólogo y dosis baja, pese a no ser estadísticamente significativos, presentarían el valor promedio más alto en comparación con el resto de grupos. Los valores promedio obtenidos en la zona 1 control y la zona 2 craneal presentan diferencias significativas entre ellos en los grupos de origen autólogo ( $p = 0,006$ ), origen alogénico ( $p = 0,004$ ), dosis alta ( $p = 0,0001$ ) y dosis baja ( $p = 0,014$ ) pero no en el caso del grupo E ni contralateral ( $p > 0,1$ ).



**Figura 4.23.** Módulo de compresión de las zonas 1 y 2 en función de A) el origen celular y B) la dosis celular, grupo E y contralateral (promedio MPa  $\pm$  SD). \* ( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,001$ ).

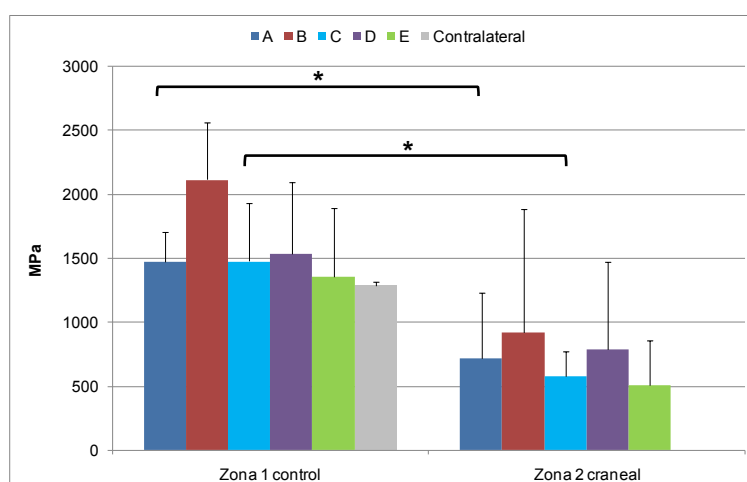
En la Tabla 4.13. se muestran los resultados obtenidos de los valores promedio y rango del módulo de compresión obtenido agrupados por origen y la dosis celular.

**Tabla 4.13. Módulo de compresión por origen y dosis celular (promedio MPa  $\pm$  SD, rango)**

Grupo	n	Zona 1 control	Zona 2 craneal
<b>Origen autólogo (Grupos A y B)</b>	8	1794,16 $\pm$ 473,60 (1247,90 – 2530,10)	818,09 $\pm$ 723,10 (141,90 – 2150,60)
<b>Origen alogénico (Grupos C y D)</b>	8	1504,16 $\pm$ 475,99 (928,60 – 2363,80)	681,13 $\pm$ 479,02 (3,70 – 1632,50)
<b>Dosis alta (Grupos A y C)</b>	8	1475,05 $\pm$ 335,17 (928,60 – 1880,50)	645,39 $\pm$ 367,36 (146,90 – 1360,50)
<b>Dosis baja (Grupos B y D)</b>	8	1823,28 $\pm$ 563,29 (1122,60 – 2530,10)	853,83 $\pm$ 776,70 (3,70 – 2150,60)
<b>Grupo E</b>	2	1357,20 $\pm$ 532,31 (980,80 – 1733,60)	508,70 $\pm$ 345,63 (264,30 – 753,10)
<b>Contralateral</b>	2	1284,20 $\pm$ 29,84 (1263,10 – 1305,30)	—



Los valores promedio del módulo de compresión obtenidos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de tratamiento dentro de una misma zona (zona 1 control y zona 2 craneal,  $p > 0,1$ ) (Figura 4.24.). El grupo experimental B presenta el promedio mayor en ambas zonas, seguido de los grupos D, C, A, E y contralateral en la zona 1 control y de los grupos D, A, C, E y contralateral en la zona 2 craneal. Los valores promedio obtenidos en la zona 1 control y la zona 2 craneal presentan diferencias significativas entre ellos en los grupos C ( $p = 0,011$ ) y A ( $p = 0,036$ ). El resto de grupos B, D, E y contralateral no presentan diferencias entre zonas (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).



**Figura 4.24.** Módulo de compresión de las zonas 1 y 2 de los grupos experimentales (A-E) y contralateral (promedio MPa  $\pm$  SD). \* ( $p < 0,05$ )

En la Tabla 4.14. se muestran los valores promedio y rangos del módulo de compresión obtenido para cada grupo experimental según la zona estudiada.

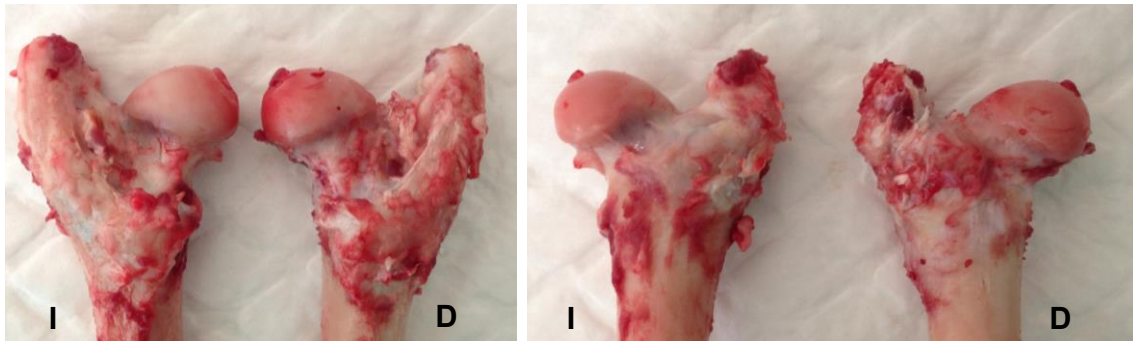
**Tabla 4.14. Módulo de compresión por grupos experimentales (promedio MPa  $\pm$  SD, rango)**

Grupo	n	Zona 1 control	Zona 2 craneal
A	4	1474,38 $\pm$ 232,93 (1247,90 – 1770,60)	715,05 $\pm$ 512,47 (146,90 – 1360,50)
B	4	2113,95 $\pm$ 443,17 (1499,10 – 2530,10)	921,13 $\pm$ 963,89 (141,90 – 2150,60)
C	4	1475,73 $\pm$ 455,92 (928,60 – 1880,50)	575,73 $\pm$ 198,32 (371,10 – 843,20)
D	4	1532,60 $\pm$ 564,49 (1122,60 – 2363,80)	786,53 $\pm$ 682,97 (3,70 – 1632,50)
E	2	1357,20 $\pm$ 532,31 (980,80 – 1733,60)	508,70 $\pm$ 345,63 (264,30 – 753,10)
Contralateral	2	1284,20 $\pm$ 29,84 (1263,10 – 1305,30)	—

### 4.7. Evaluación macroscópica e histológica

#### 4.7.1. Evaluación macroscópica

En el momento de obtención y disección de las cabezas femorales derechas a las 6 semanas de tratamiento no se observaron signos de infección de los tejidos circundantes ni otros efectos adversos locales, como la formación de hueso ectópico, en ninguna de las 18 ovejas evaluadas. Tampoco se objetivaron signos de colapso, deformidad o aplastamiento de la cabeza femoral derecha o incongruencia articular en ninguno de los animales de los grupos experimentales respecto a la cabeza femoral de la extremidad contralateral no intervenida (Figura 4.25.).

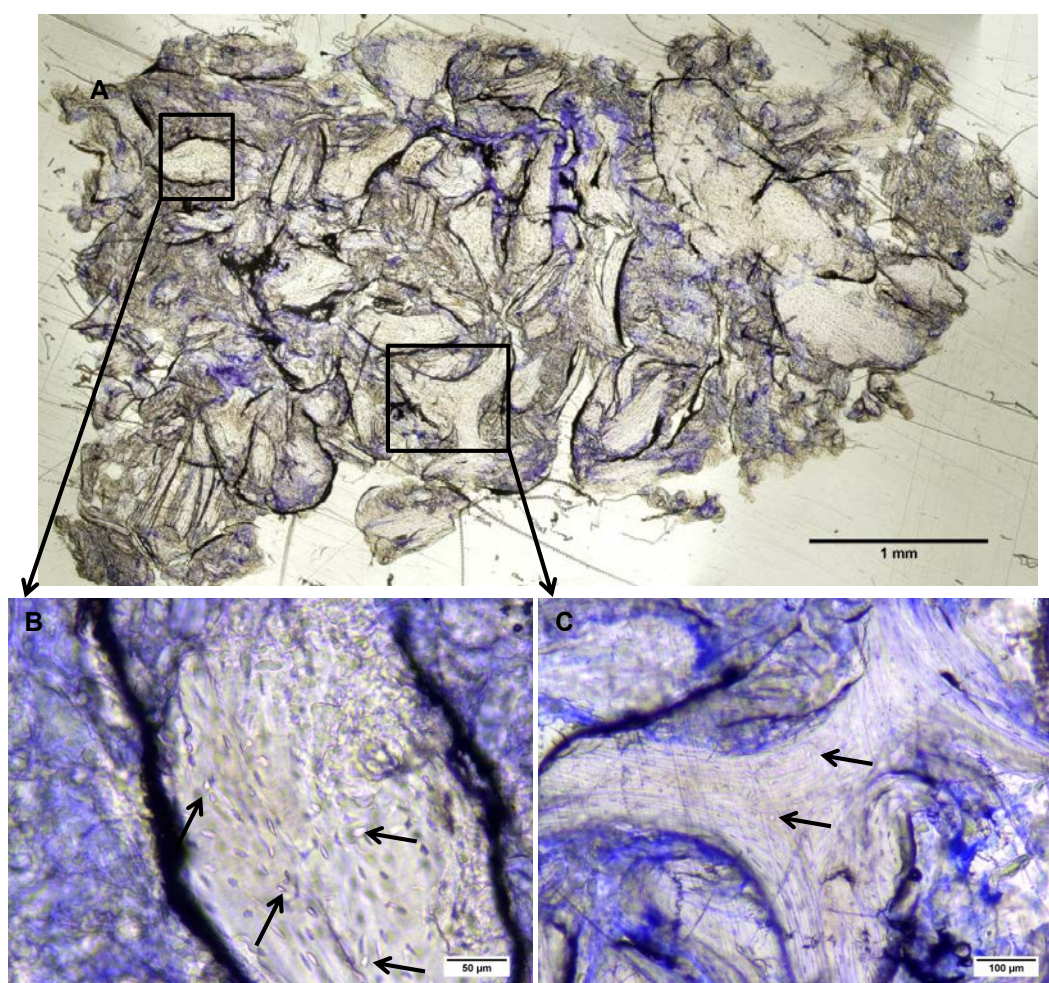


**Figura 4.25.** Imagen representativa de la evaluación macroscópica de las cabezas femorales. I (cabeza femoral izquierda no intervenida), D (cabeza femoral derecha receptora de los tratamientos experimentales).

#### 4.7.2. Evaluación histológica

##### Cilindros biopsia óseos

En los dos cilindros biopsia óseos, evaluados a modo confirmatorio de la osteonecrosis por crioterapia, se observaron fragmentos de trabéculas óseas con ausencia de osteocitos en las lagunas y tejido fibroso alrededor coloreado en tonalidades azules, compatible con hueso desvitalizado (Figura 4.26.).



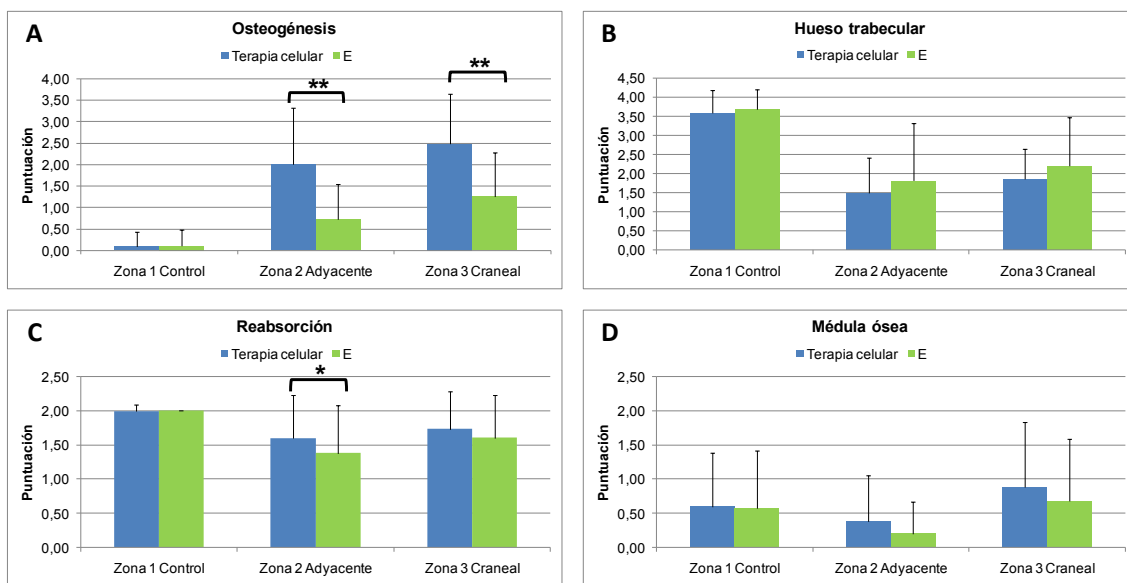
**Figura 4.26.** Muestra representativa de un fragmento de cilindro óseo obtenido en la creación del túnel de DC antes de la aplicación del tratamiento experimental. A) Composición de imágenes consecutivas y ensambladas a partir de imágenes individuales a 4x, barra de escala 1 mm. B) Detalle fragmento óseo (20x, barra de escala 50 µm). C) Detalle fragmento óseo (10x, barra de escala 100 µm). Las flechas indican la presencia de lagunas vacías.

#### Análisis histológico de los tratamientos experimentales

Las puntuaciones obtenidas en los parámetros histológicos semicuantitativos analizados en función de la aplicación de terapia celular (grupos A-D) o descompresión central (grupo E) se muestran en la Figura 4.27. En la zona 1 control se observó que tanto para el grupo de terapia celular como para el grupo E apenas hay indicios de osteogénesis, el hueso trabecular preservaba su estructura y sin signos aparentes de reabsorción. Sin embargo, la médula ósea se encontraba prácticamente ausente en los espacios trabeculares en los dos casos. No encontramos diferencias estadísticamente significativas para ambos grupos en los diferentes parámetros evaluados (en todos los casos,  $p > 0,1$ ). En la zona 2 adyacente encontramos un incremento muy significativo en la puntuación del parámetro de osteogénesis de los grupos de tratamiento celular respecto el grupo E ( $p = 0,0001$ ). El

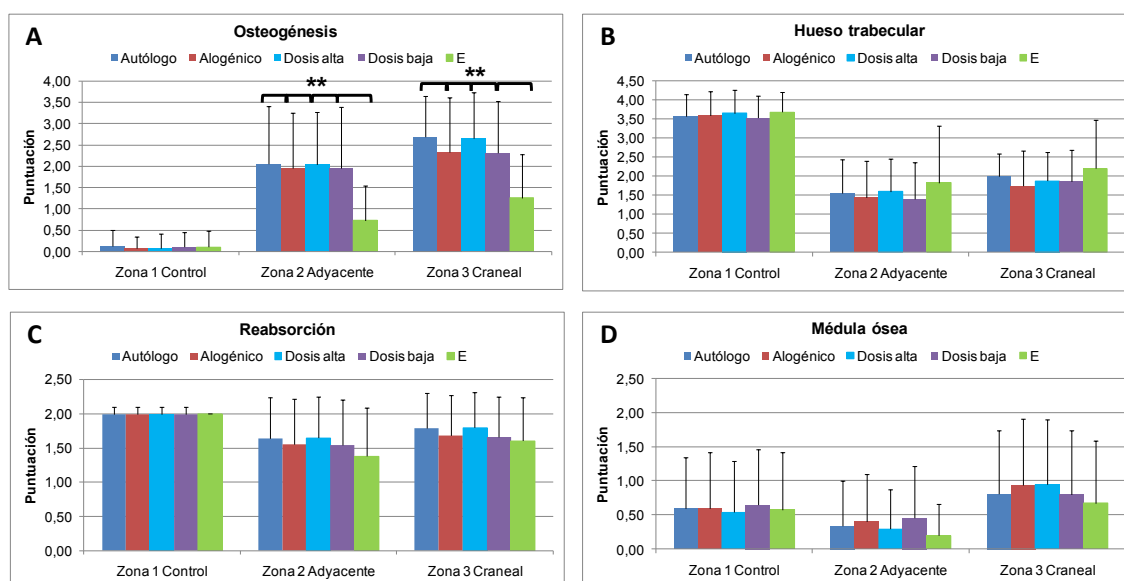
## 4. Resultados

hueso trabecular presentó puntuaciones relacionadas con diferentes grados de aposición y reorganización de su estructura pero de forma similar entre ambos grupos ( $p = 0,471$ ). La puntuación obtenida en el parámetro de reabsorción en el grupo de terapia celular fue significativamente menor que en el grupo E ( $p = 0,041$ ), mientras que la médula ósea era prácticamente inexistente en ambos grupos ( $p = 0,122$ ). En la zona 3 craneal al túnel de DC se puede observar una situación parecida a la anterior. La puntuación obtenida en el parámetro de osteogénesis fue significativamente superior en los grupos de tratamiento celular ( $p = 0,0001$ ), mientras que las puntuaciones en los parámetros de trabéculas óseas, reabsorción y presencia de médula ósea fueron similares en ambos grupos (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).



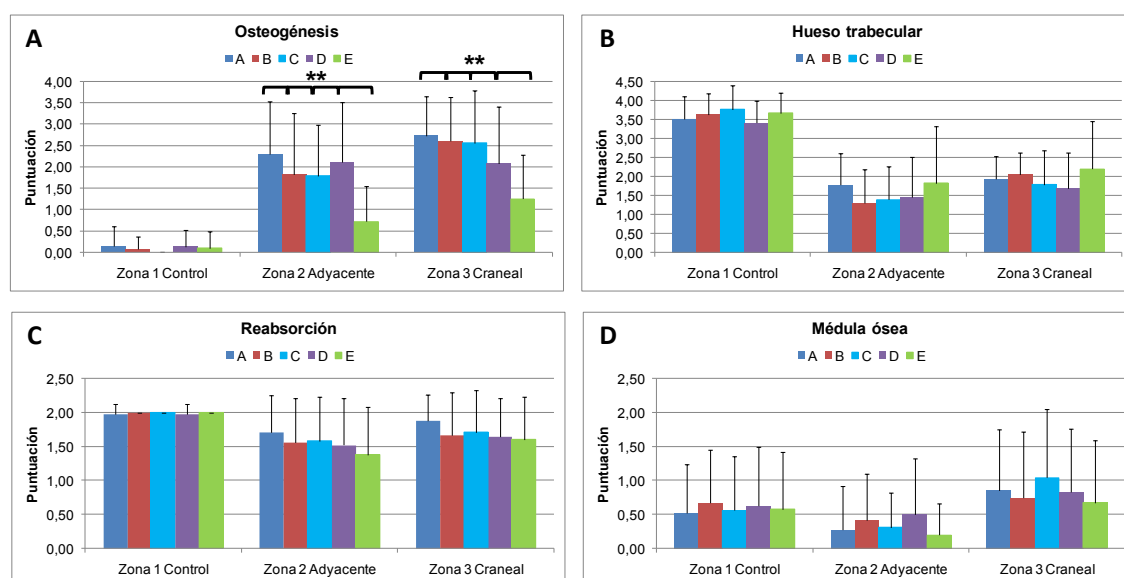
**Figura 4.27.** Parámetros histológicos semicuantitativos analizados en función de la aplicación de terapia celular (grupos A-D) o descompresión central (grupo E) (promedio puntuación  $\pm$  SD). \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ).

Las puntuaciones obtenidas en los parámetros histológicos semicuantitativos analizados en función de la aplicación del origen celular, autólogo (grupos A y B) o alogénico (grupos C y D), y de la dosis, alta (grupos A y C) o baja (grupos B y D), y la realización de descompresión central (grupo E) se muestran en la Figura 4.28. Los parámetros evaluados muestran un comportamiento similar al análisis anterior. Podemos observar que la puntuación en el parámetro de osteogénesis es muy similar en los grupos de origen alogénico y autólogo, así como en los de dosis alta y dosis baja, pero en todos los casos esta es significativamente superior que la obtenida en el grupo E ( $p = 0,0001$ ). En el resto de parámetros no se observan diferencias destacables en cuanto a las puntuaciones obtenidas en hueso trabecular, reabsorción y presencia de médula ósea (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).



**Figura 4.28.** Parámetros histológicos semicuantitativos analizados en función del origen y la dosis celular (promedio puntuación  $\pm$  SD). \*\*( $p < 0,001$ ).

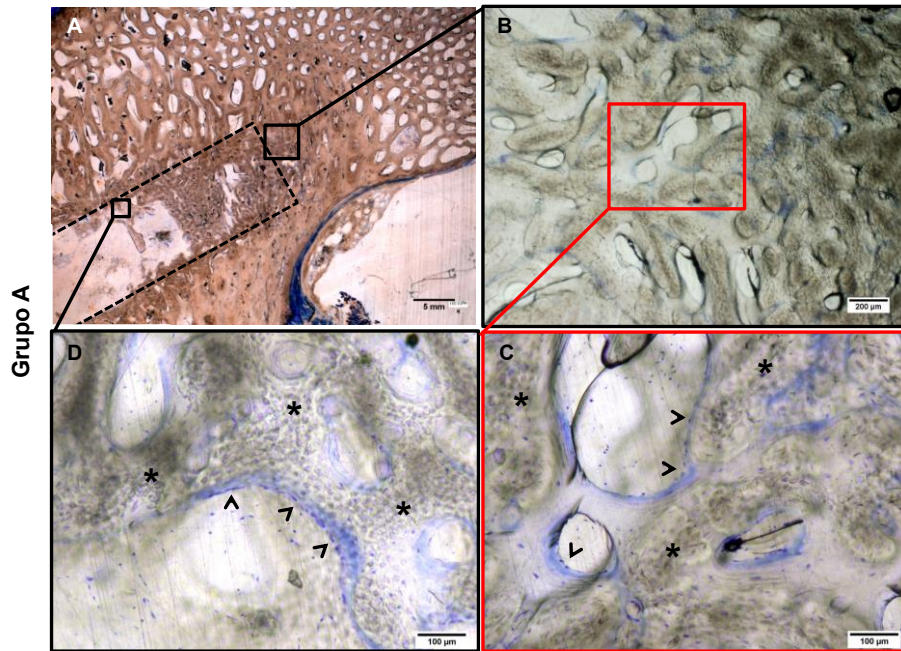
Las puntuaciones obtenidas en los parámetros histológicos semicuantitativos analizados en función de cada tratamiento experimental (grupos A-E) se muestran en la Figura 4.29. Del mismo modo que en los resultados anteriores, encontramos diferencias en cuanto a una mayor puntuación en el parámetro de osteogénesis en los grupos A, B, C y D respecto al grupo E de forma significativa ( $p = 0,0001$ ) pero similares entre ellos. Encontramos una ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros evaluados (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).



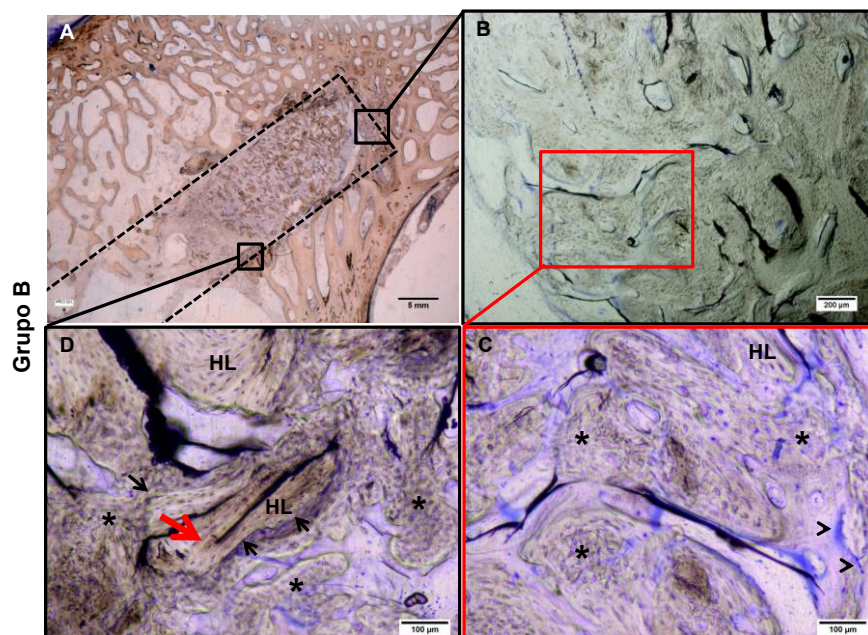
**Figura 4.29.** Parámetros histológicos semicuantitativos analizados en función de los diferentes grupos experimentales (grupos A-E) (promedio puntuación  $\pm$  SD). \*\*( $p < 0,001$ ).

En las muestras histológicas no decalcificadas se observó de forma general osteogénesis y remodelación ósea en todos los especímenes a las seis semanas postratamiento, siendo más intensa en los grupos que recibieron terapia celular (grupos A-D). El túnel de DC era visible en todos los casos, con la presencia de partículas óseas en su interior en los grupos de tratamiento experimental A, B, C y D (Figuras 4.30., 31., 32. y 33.) o debris en el túnel de DC del grupo E (Figura 4.34.). En todos los grupos experimentales se observó un proceso reparativo establecido con zonas de neoformación ósea, principalmente en el espacio de la médula ósea de las zonas contiguas al túnel de DC, siendo más intensa en la zona 3 craneal (Figura 4.30.) en concordancia con los parámetros de osteogénesis obtenidos en el análisis semicuantitativo. Este tejido óseo neoformado es aposicional a las trabéculas óseas preexistentes y a las partículas óseas implantadas y, en algunos casos, se pueden incluso observar de forma definida las líneas de cementación que marcan el pasaje de los osteoclastos precedente al depósito osteoblástico, indicando un proceso de remodelación. La estructura del tejido óseo neoformado es de tipo lamelar y/o de tipo plexiforme con presencia de osteocitos vitales en su interior y enmarcado por líneas de osteoblastos en su superficie (Figura 4.31.).

Las trabéculas óseas preexistentes, en cambio, se caracterizan por una estructura ósea de tipo lamelar y por la presencia de lagunas carentes de osteocitos o bien, por osteocitos de aspecto picnótico (Figura 4.32.). Encontramos zonas de reabsorción sobre las trabéculas de apariencia no vital en forma de líneas de cementación y lagunas de Howship, y en algunos casos con la presencia de células polinucleadas en tonalidades azules de aspecto osteoclástico (Figuras 4.32. y 4.33.). El proceso de reabsorción de las trabéculas de apariencia no vital es simultáneo al proceso de neoformación ósea. No se observó la presencia de condrocitos hipertróficos como un signo de formación de tejido óseo endocondral en ninguna de las muestras evaluadas. La formación ósea *de novo* parece corresponder a un proceso de tipo intramembranoso. La médula ósea se observa prácticamente inexistente o de tipo fibrótico. No se ha observado una diferencia aparente en la evaluación entre los grupos de tratamiento, ni por origen ni por dosis aplicada. Tampoco se ha observado ninguna evidencia de respuesta inmunitaria de tipo inflamatorio en ninguna de las muestras evaluadas.

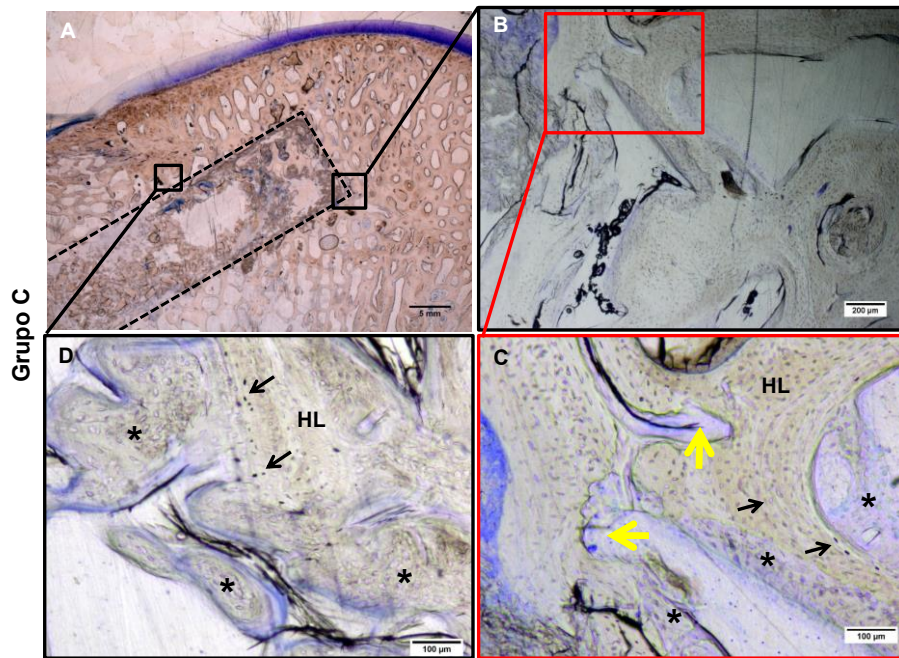


**Figura 4.30.** Muestra representativa del grupo A (oveja 211), tinción de Azul de Toluidina. A) Las líneas discontinuas indican los márgenes del túnel de DC donde en su interior se observan partículas óseas (1x, barra de escala 5 mm). B) Detalle de la zona 3 craneal al túnel de DC (4x, barra de escala 200 µm). Detalles de la zona 3 craneal, C) y de la zona 2 adyacente D) donde se observa la formación de hueso *de novo* (\*) de tipo plexiforme y lamelar y la presencia de osteoblastos en la superficie (puntas de flecha) (10x, barra de escala 100 µm).

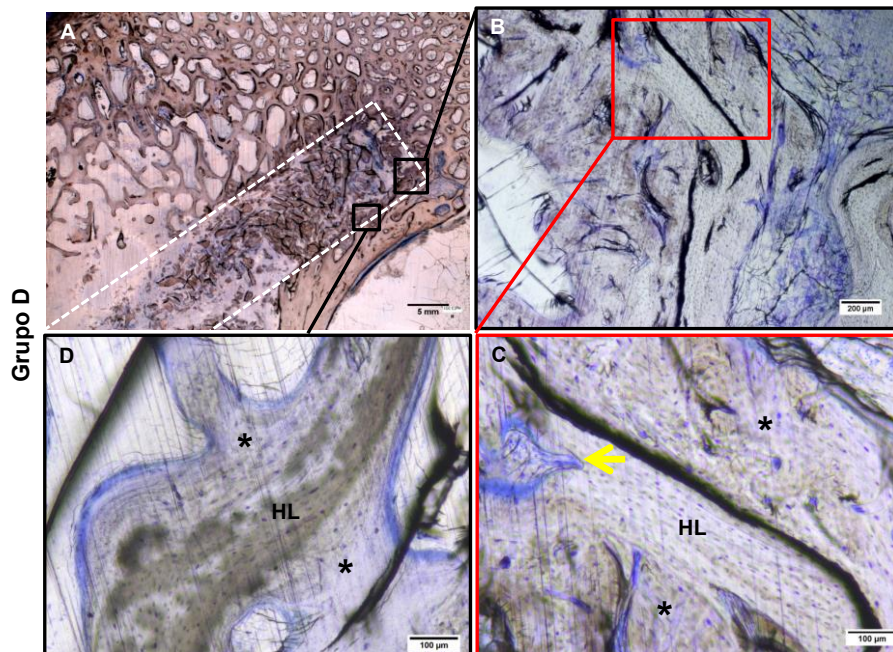


**Figura 4.31.** Muestra representativa del grupo B (oveja 215), tinción de Azul de Toluidina. A) Las líneas discontinuas indican los márgenes del túnel de DC donde en su interior se observan partículas óseas (1x, barra de escala 5 mm). B) Detalle de la zona 3 craneal al túnel de DC (4x, barra de escala 200 µm). C) Detalle de la zona 3 craneal donde se observa hueso de nueva formación de tipo plexiforme y D) de la zona 2 adyacente donde se observa formación ósea *de novo* aposicional alrededor de una partícula ósea (flecha roja). La línea de cementación (flecha negra) marca la frontera que separa el hueso lamelar (HL) preexistente del hueso *de novo* de tipo plexiforme (\*) (10x, barra de escala 100 µm).

## 4. Resultados



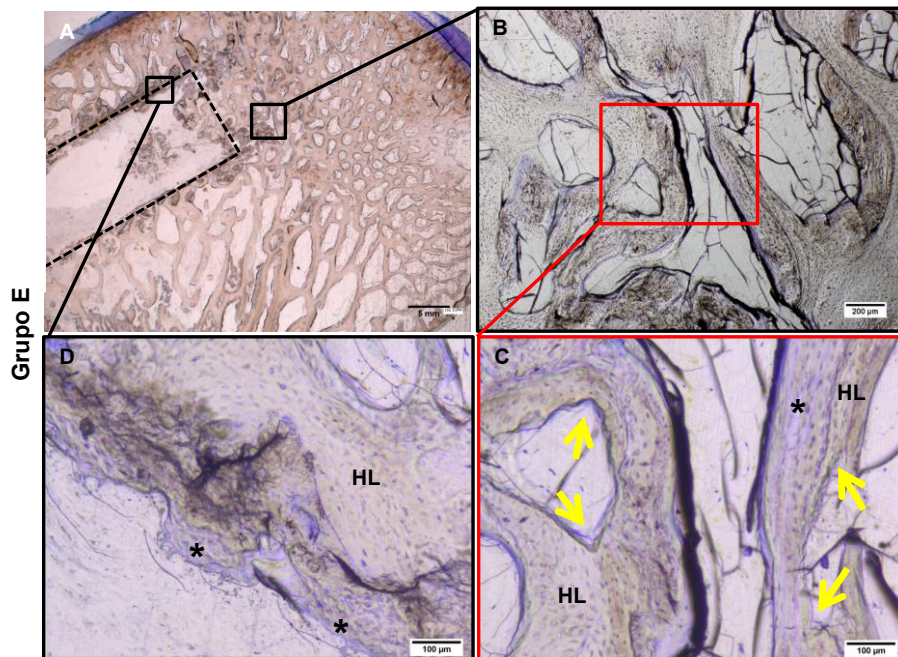
**Figura 4.32.** Muestra representativa del grupo C (oveja 201), tinción de Azul de Toluidina. A) Las líneas discontinuas indican los márgenes del túnel de DC donde en su interior se observan partículas óseas (1x, barra de escala 5 mm). B) Detalle de la zona 3 craneal al túnel de DC (4x, barra de escala 200 μm). C) Detalle de la zona 3 craneal y D) de la zona 2 adyacente donde se observa la formación de hueso *de novo* aposicional (\*) al hueso lamelar (HL) preexistente con lagunas desprovistas de osteocitos o de aspecto picnótico (flecha negra) alternadas con zonas de reabsorción (flecha amarilla) (10x, barra de escala 100 μm).



**Figura 4.33.** Muestra representativa del grupo D (oveja 205), tinción de Azul de Toluidina. A) Las líneas discontinuas indican los márgenes del túnel de DC donde en su interior se observan partículas óseas (1x, barra de escala 5 mm). B) Detalle de la zona 3 craneal al túnel de DC (4x, barra de escala 200 μm). C) Detalle de la zona 3 craneal y D) de la zona 2 adyacente donde se observa hueso de nueva formación (\*) aposicional al hueso lamelar (HL) preexistente de aspecto no vital con zonas de reabsorción (flecha amarilla) (10x, barra de escala 100 μm).



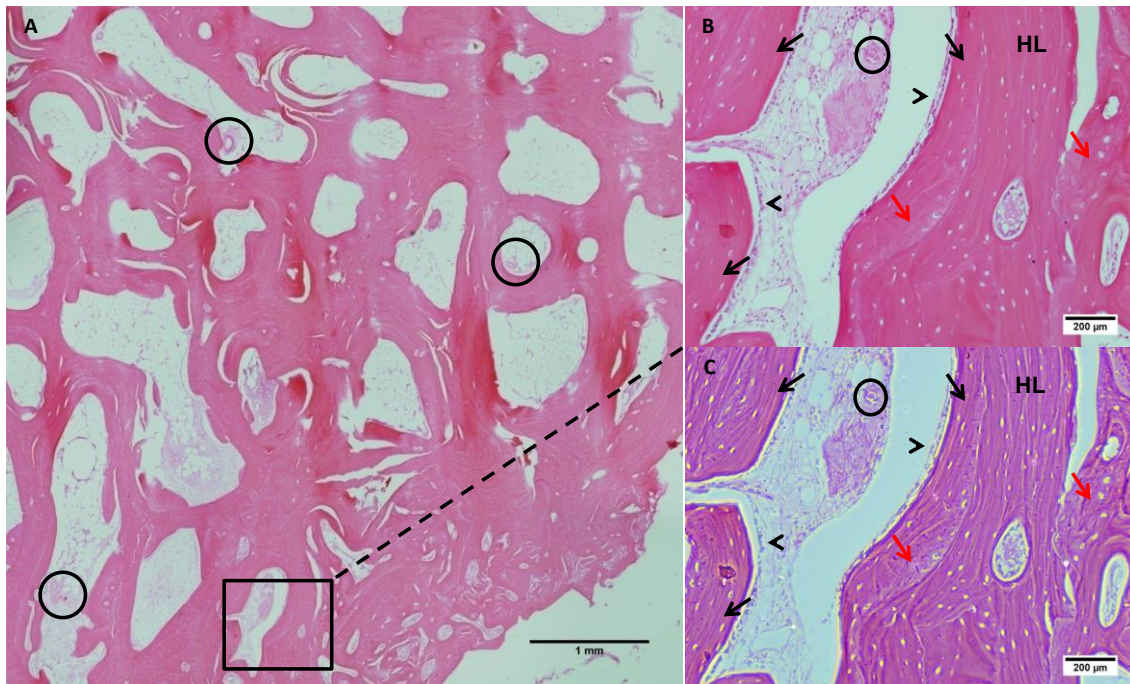
En el grupo E también se observó tejido óseo neoformado aposicional a las trabéculas óseas preexistentes desprovistas de osteocitos, pero de forma menor que en los grupos anteriores (Figura 4.34.).



**Figura 4.34.** Muestra representativa del grupo E (oveja 216), tinción de Azul de Toluidina. A) Las líneas discontinuas indican los márgenes del túnel de DC (1x, barra de escala 5 mm). B) Detalle de la zona 3 craneal al túnel de DC (4x, barra de escala 200 µm). C) Detalle de la zona 3 craneal y D) de la zona 2 adyacente al túnel de DC donde se observa hueso de nueva formación (\*) aposicional al hueso lamelar (HL) preexistente de aspecto no vital con zonas de reabsorción osteoclástica (flechas amarillas) (10x, barra de escala 100 µm).

#### 4. Resultados

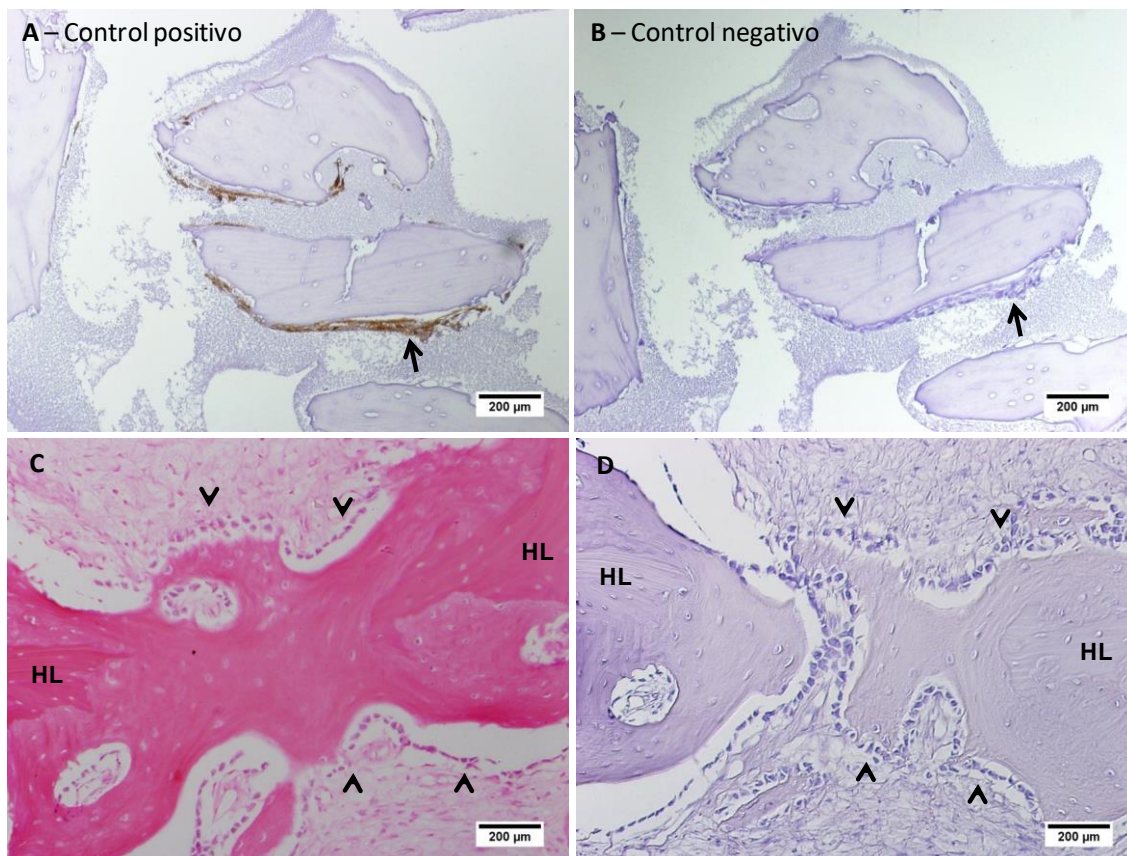
En las láminas de tejido óseo decalcificado teñidas con H&E se pudo observar con detalle las zonas regenerativas presentando hueso neoformado de tipo plexiforme y lamelar aposicional sobre el tejido óseo lamelar preexistente de apariencia no vital desprovista de osteocitos. Se puede visualizar la presencia de líneas de osteoblastos en la superficie del hueso de nueva formación. La MO está prácticamente ausente, o bien, esta presenta un aspecto fibrótico con signos de vascularización. Bajo luz polarizada puede observarse con detalle la estructura desorganizada del hueso plexiforme de nueva formación en contraste con la estructura ordenada en forma de láminas del hueso lamelar preexistente (Figura 4.35.).



**Figura 4.35.** Imágenes representativas (oveja 205) de una sección histológica decalcificada, tinción de hematoxilina-eosina. A) Composición de imágenes consecutivas y ensambladas a partir de imágenes individuales a 4x (barra de escala 1 mm). La línea discontinua separa el túnel de DC del resto de la cabeza femoral y los círculos indican zonas de vascularización. B) Imagen con luz blanca. Las puntas de flecha señalan las líneas de osteoblastos en la superficie del hueso de nueva formación alternando zonas de tipo plexiforme (flecha roja) y lamelar (flecha negra) y con la presencia de osteocitos. C) Imagen con luz polarizada. Se puede observar la estructura del tejido desorganizado del tejido óseo de tipo plexiforme (flecha roja) de nueva formación en comparación con el tejido óseo lamelar (HL) dispuesto en láminas paralelas de una trabécula ósea preexistente desprovista de osteocitos (10x, barra escala 200  $\mu$ m).

### 4.7.3. Evaluación inmunohistoquímica de eGFP

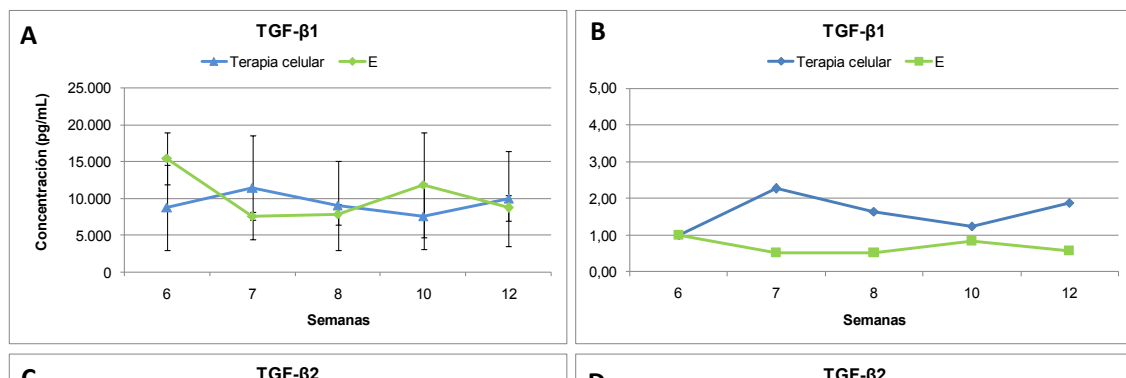
En las muestras de tejido óseo obtenido de las ovejas incluidas en los grupos de tratamiento alogénico con oMSC marcadas con eGFP (grupos C y D) no se detectaron células positivas para el marcaje con eGFP en ninguna de las muestras analizadas a las 6 semanas postratamiento. Se observó la presencia de líneas de osteoblastos no marcados alineados sobre el hueso de nueva formación aposicional en el hueso lamelar preexistente no vital y osteocitos no marcados presentes en las lagunas del tejido óseo de nueva formación (Figura 4.36.).

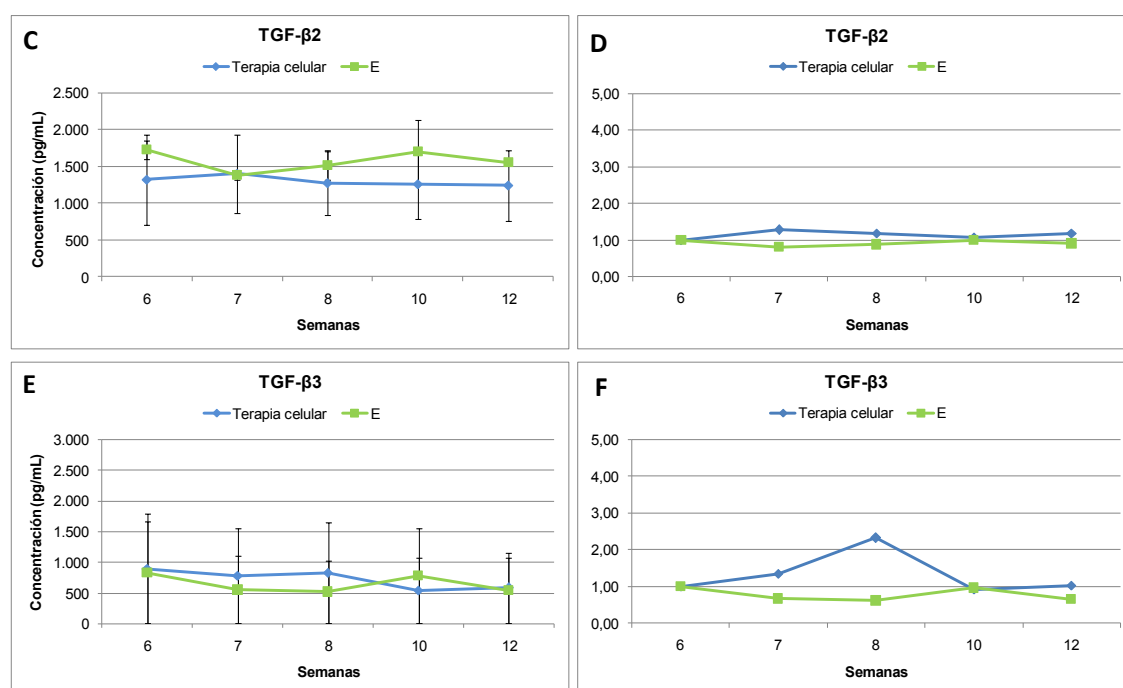


**Figura 4.36.** Imagen representativa (oveja 197) de la inmunohistoquímica de detección de oMSC marcadas con eGFP. A) Control marcaje positivo de una partícula ósea colonizada con oMSC-eGFP. B) Control marcaje negativo de una partícula ósea colonizada con oMSC-eGFP. C) Detalle tinción de hematoxilina-eosina de una zona regenerativa con hueso de nueva formación bordeado por líneas de osteoblastos (puntas de flecha). D) Detalle donde se observa la presencia de osteoblastos y osteocitos negativos para el marcaje con eGFP en el tejido óseo *de novo* (10x, barra escala 200  $\mu$ m).

### 4.8. Evaluación de los niveles circulantes de TGF-β en plasma ovino

En el análisis de los niveles plasmáticos de TGF-β, se obtuvieron los siguientes resultados. Los animales del grupo de terapia celular mostraron para TGF-β1 un incremento de la concentración plasmática en la primera semana postratamiento (semana 7), llegando a doblar la concentración inicial, seguido de un descenso en las siguientes semanas que vuelve a incrementarse en la última semana de tratamiento (semana 12). En el grupo E, contrariamente, se observa un descenso después del tratamiento y muestra una recuperación a las cuatro semanas posteriores (semana 10), para luego volver a descender en la semana 12 (Figuras 4.37.A. y B.). En el caso de TGF-β2, el grupo de terapia celular presentó un incremento más moderado en la primera semana postratamiento (semana 7) para posteriormente descender y presentar un ligero ascenso en la semana 12. En el grupo E se observó un descenso menor en la primera semana que luego es incrementado de forma moderada hasta la cuarta semana (semana 10), descendiendo moderadamente en las siguientes semanas hasta el final del periodo de estudio (Figuras 4.37.C.y D.). Para TGF-β3, el grupo de terapia celular presenta un incremento gradual llegado a un pico de concentración en la segunda semana postratamiento (semana 8), a diferencia de las dos isoformas anteriores, para después descender y estabilizarse en la semana 12. En el grupo E se observa un descenso de la concentración de TGF-β3 que es recuperado en la cuarta semana (semana 10), donde a continuación desciende moderadamente (Figuras 4.37.E. y F.). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados en las concentraciones absolutas o normalizadas respecto a la inicial (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).

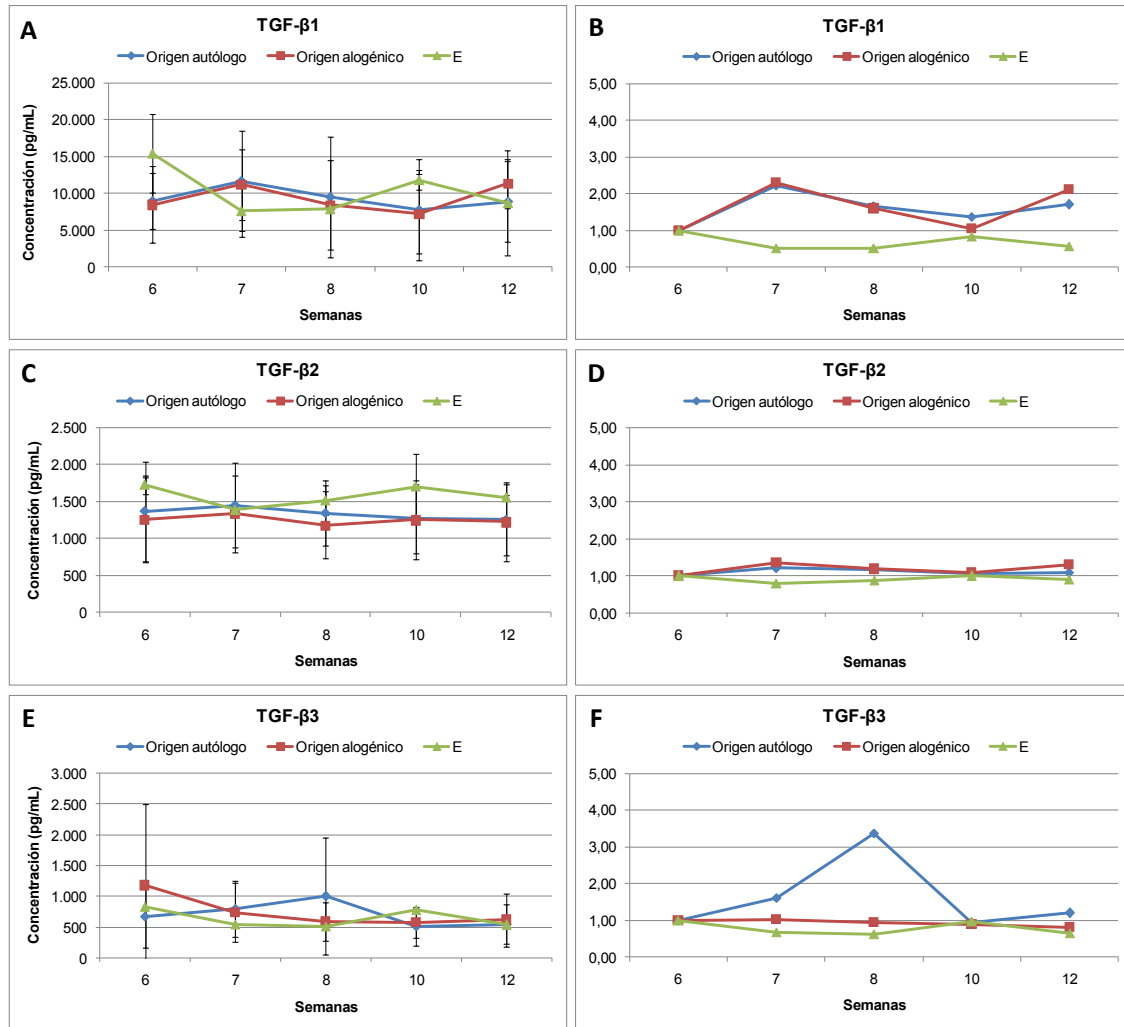




**Figura 4.37.** A, C, E) Niveles de TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3 en plasma durante el seguimiento postoperatorio en función de la aplicación de terapia celular respecto el grupo E (promedio pg/mL  $\pm$  SD). B, D, F) Normalización de las concentraciones respecto la concentración inicial.

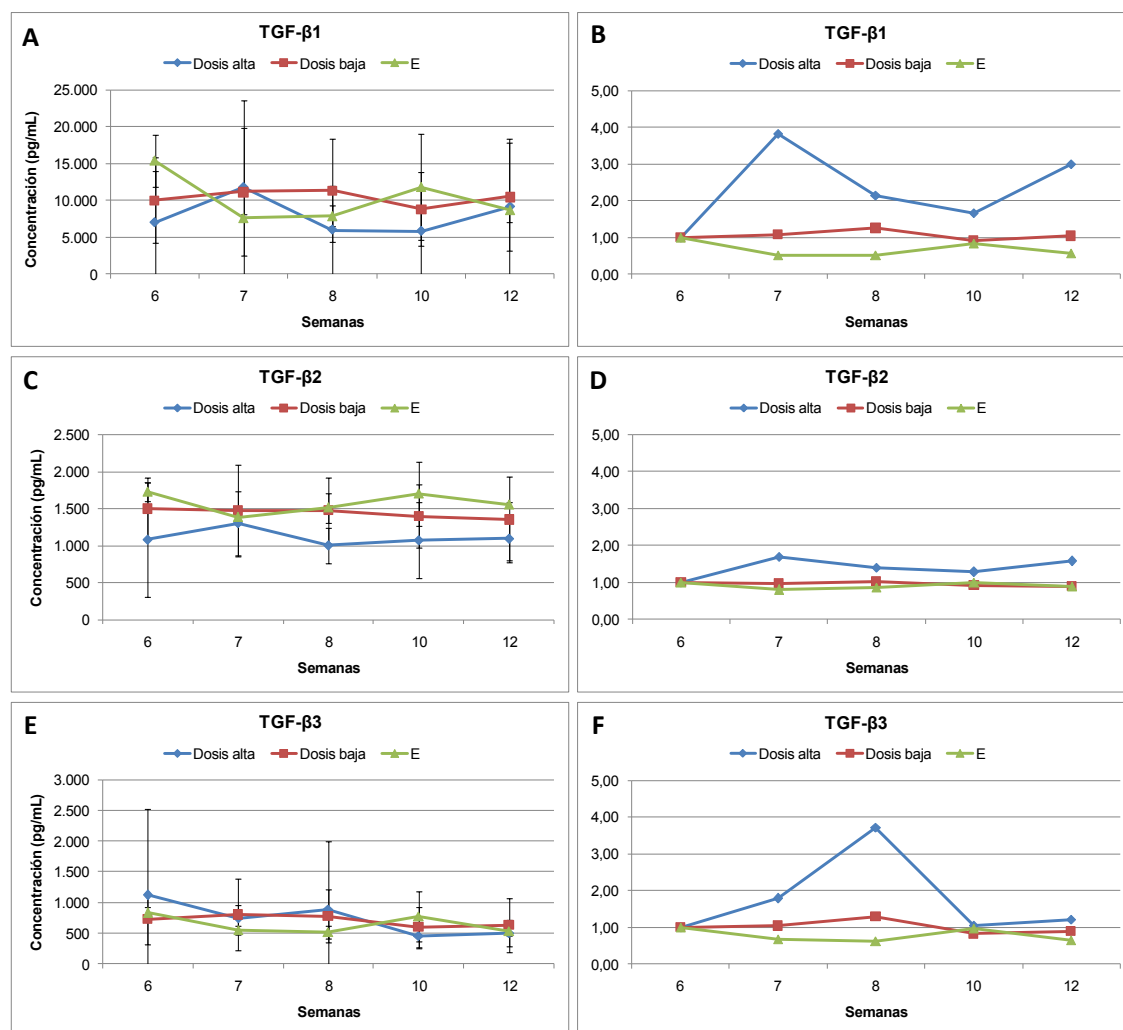
La comparación de los grupos experimentales en función del origen celular aplicado, autólogo o alogénico, respecto el grupo E mostró un comportamiento muy similar entre los grupos celulares de ambos orígenes en el caso de la isoforma TGF-β1. El incremento de TGF-β1 en la primera semana postratamiento para los grupos de origen autólogo y alogénico contrasta con el descenso observado en el grupo E, cuyo aumento del nivel de TGF-β1 se observa a las cuatro semanas postratamiento (semana 10) (Figura 4.38.A. y B.). Ese comportamiento se muestra parecido, aunque de forma más moderada, en el caso de la isoforma TGF-β2 (Figura 4.38.C. y D.) donde los grupos celulares de origen autólogo y alogénico muestran un leve incremento de la concentración en la semana 7 para posteriormente descender. En el grupo E, un sutil incremento de la concentración de TGF-β2 se observa en la semana 10 seguido de un descenso. En el caso de la isoforma TGF-β3 los niveles serológicos muestran comportamientos diferentes entre los tres grupos analizados, donde el grupo de origen autólogo muestra un pico en la semana 8, el grupo de origen alogénico se mantiene constante durante todo el periodo postratamiento y el grupo E presenta un descenso inicial que se recupera hacia la semana 10 (Figura 4.38.E. y F.). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados en las concentraciones absolutas o normalizadas respecto la inicial (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).

## 4. Resultados



**Figura 4.38.** A, C, E) Niveles de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en plasma durante el seguimiento postoperatorio en función del origen celular de los tratamientos celulares respecto el grupo E (promedio pg/mL  $\pm$  SD). (B, D, F) Normalización de las concentraciones respecto a la concentración inicial.

La comparación en función de la dosis celular aplicada sí mostró un comportamiento diferencial en el caso de la dosis alta en lastres isoformas de TGF- $\beta$  (Figura 4.39.A-F). Los grupos de dosis alta presentan un comportamiento muy parecido en los niveles serológicos de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, donde observamos un incremento en la primera semana postratamiento (semana 7), con un descenso posterior y un nuevo crecimiento en la semana 12, siendo más acusado en el caso de TGF- $\beta$ 1. Para TGF- $\beta$ 3, el incremento se reporta en la semana 8, con la recuperación posterior de los niveles circulantes. El grupo de dosis baja muestra un comportamiento más estable para las tres isoformas, mientras que el grupo E presenta en todos los casos un descenso inicial de los niveles para recuperarlo a partir de la semana 10. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados en las concentraciones absolutas o normalizadas respecto a la inicial (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).

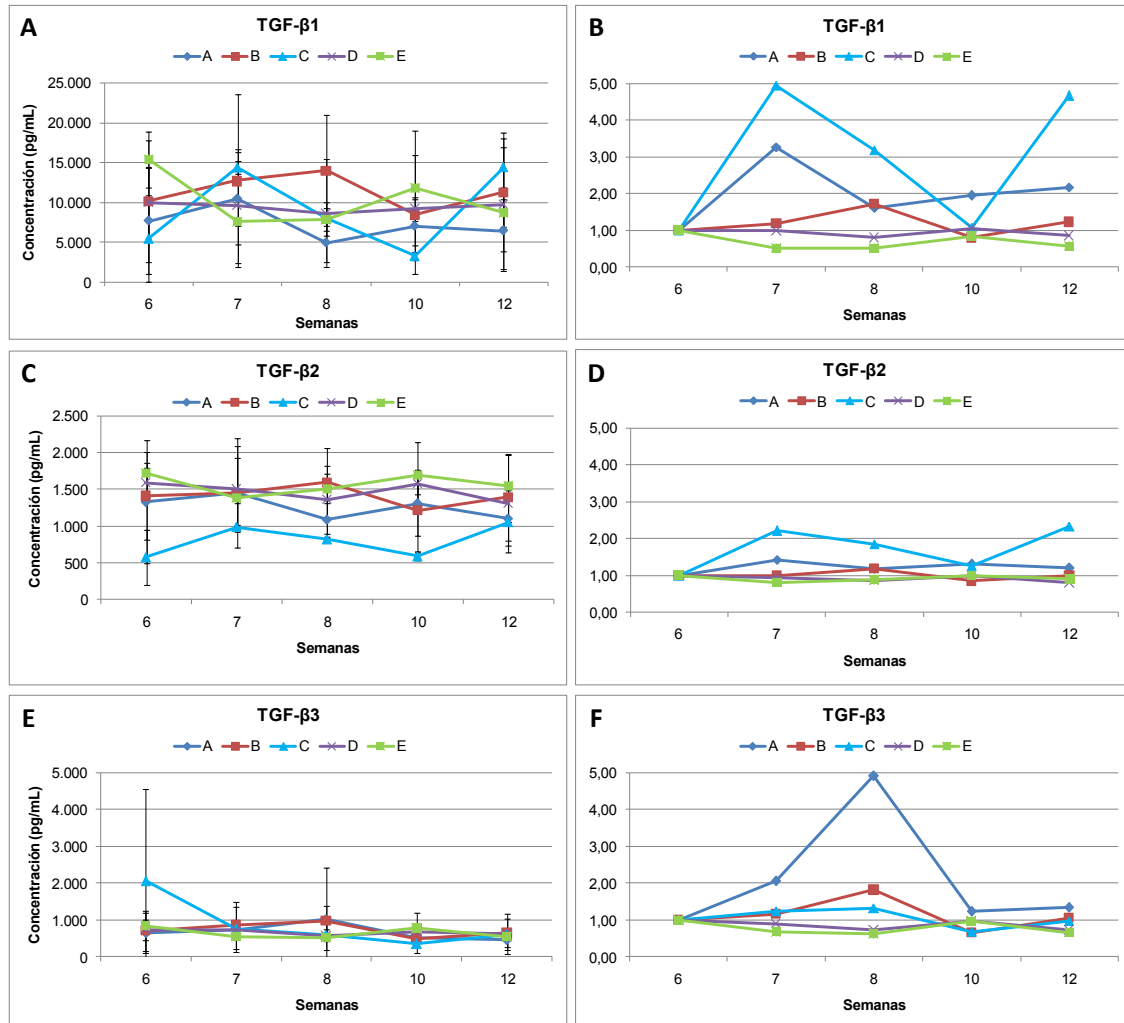


**Figura 4.39.** A, C, E) Niveles de TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3 en plasma durante el seguimiento postoperatorio en función de la dosis aplicada en los tratamientos celulares respecto el grupo E (promedio pg/mL  $\pm$  SD). (B, D, F) Normalización de las concentraciones respecto la concentración inicial.

En la comparación de los diferentes grupos experimentales analizados de forma individual se observa variabilidad en las concentraciones obtenidas de las tres isoformas de TGF-β. En el caso de TGF-β1, los grupos A y C presentan un incremento en los niveles en la primera y última semana postratamiento. El grupo B mantiene el incremento hasta la segunda semana de tratamiento seguido de un descenso que se incrementaría de nuevo en la última semana de tratamiento. El grupo D presenta un comportamiento aparentemente estable durante todo el periodo de tratamiento, sin embargo, se debe a la compensación de la variabilidad entre los diferentes individuos (Figura 4.40.A. y B.). Los diferentes grupos experimentales repiten el mismo comportamiento para TGF-β2 pero con incrementos más moderados que en el caso anterior (Figura 4.40.C. y D.). Finalmente, los niveles de TGF-β3 muestran un comportamiento menos variable, a diferencia de los grupos A y B que presentan un

## 4. Resultados

pico de incremento en la semana 8 (Figura 4.40.E y F.). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados en las concentraciones absolutas o normalizadas respecto la inicial (en todos los casos,  $p > 0,1$ ).



**Figura 4.40.** A, C, E) Niveles de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en plasma durante el seguimiento postoperatorio en función de los diferentes tratamientos experimentales (grupos A-E) (promedio pg/mL  $\pm$  SD). (B, D, F) Normalización de las concentraciones respecto la concentración inicial.



## 5. Discusi3n

---



## **5.1. Tratamiento de la osteonecrosis de cabeza femoral ovina experimental con MSC ovinas autólogas y alogénicas a diferentes dosis**

La osteonecrosis de cabeza femoral puede suponer un escenario clínico desfavorable con gran impacto en la calidad de vida relacionada con la salud al tener lugar en un hueso con una función principal de carga, movimiento y ambulación. El abanico actual de tratamientos disponibles quirúrgicos y no quirúrgicos propuestos para frenar la destrucción tisular y estimular la regeneración ósea, bifosfonatos, tratamientos biofísicos y procedimientos de descompresión presentan resultados de escasa fiabilidad y gran variabilidad. Ante estas expectativas, en una enfermedad cuya patogenia tiene un origen celular, la ingeniería tisular y la terapia celular se postulan como una potencial alternativa a estos tratamientos para estimular la regeneración ósea de lesiones osteonecróticas [17,46].

### **5.1.1. Modelo ovino de ONCF**

Todo desarrollo de una nueva terapia basada en el uso de células para tratamientos regenerativos en ortopedia precisa de estudios preclínicos en modelos animales. Los modelos animales pequeños –como la rata y el ratón– presentan ventajas en cuanto al manejo, coste-efectividad y la posibilidad de emplear cepas inmunodeprimidas o modificadas genéticamente, pero los resultados obtenidos en estas especies pueden resultar a veces de difícil traslación a la clínica humana. Los modelos en grandes animales, en cambio, ofrecen más similitudes con los humanos en cuanto a peso, tamaño, estructura anatómica y articular y procesos regenerativos en hueso y cartílago [66,141,142] y una mejor perspectiva traslacional. Se han descrito estudios preclínicos de ONCF en grandes animales empleando modelos bípedos, tales como el emú y el avestruz, que reproducirían una situación más aproximada a la humana por la distribución de la carga articular pudiendo progresar hacia un colapso de la cabeza femoral [85,93,95,100], pero la disponibilidad, logística y coste de estos animales

supone una limitación importante en estos modelos. La mayoría de los estudios experimentales han empleado modelos animales cuadrúpedos a los cuales se les ha inducido una situación de ONCF mediante diferentes metodologías de tipo farmacológico, quirúrgico, químico o físico [68,71]. El perro y el cerdo ofrecen grandes ventajas en cuanto a similitud y traslacionalidad de los resultados, pero las cuestiones éticas en el caso del perro y el difícil manejo de especímenes porcinos adultos cuestionan su elección. El modelo caprino y el modelo ovino, como animales grandes, presentan ventajas respecto a los anteriores en relación al tamaño, el coste, el comportamiento dócil y manejable y una menor percepción negativa en cuestiones éticas, y también mantienen similitudes con los humanos en la composición mineral y metabolismo óseo [62]. Dada la posibilidad de disponer de un número de ovejas que permitiera tener un grupo homogéneo y de la experiencia del grupo con este modelo animal en estudios previos en elongación ósea [143], en defectos segmentarios críticos [144] y, concretamente, en ONCF [98,104,107], se decidió emplear el modelo ovino. La falta de modelos en grandes animales que sean inmunodeprimidos impide el uso experimental con células humanas y, por esa razón, el empleo de células homólogas equivalentes, MSC ovinas en nuestro caso, permite estudiar de forma análoga la seguridad y efectividad de los nuevos tratamientos basados en la ingeniería tisular y terapia celular de la forma más similar posible a la situación clínica [145].

Nuestro trabajo se ha basado en el uso de un modelo experimental ovino con una condición de osteonecrosis de cabeza femoral en un estado de precolapso inducida por crioterapia establecido por Vélez *et al.* [98]. En este modelo previo, la crioterapia se realizó por aplicación directa de nitrógeno líquido sobre la cabeza femoral conjuntamente con la ligadura vascular de la arteria y vena circunfleja medial y lateral. A las seis semanas posteriores a la inducción de la lesión observaron que el tejido óseo presentaba cambios necróticos, como lagunas desprovistas de osteocitos, MO reemplazada por tejido fibrótico, zonas de reabsorción y trabéculas microfracturadas. Posteriormente, a las 12 semanas el tejido presentaba un aspecto compatible con una osteonecrosis avanzada con pérdida de la esfericidad de la cabeza femoral. Esta evaluación a medio/largo plazo sería similar a una situación clínica humana, mientras que la evaluación a las seis semanas sería una situación de osteonecrosis precolapso a corto plazo. Es en esta fase de precolapso donde situaríamos nuestro interés terapéutico, es decir, si con los productos de ingeniería tisular y terapia celular propuestos en este trabajo podemos estimular la regeneración ósea de modo que pueda pararse el progreso hacia un colapso o incluso revertir la osteonecrosis.

Las lesiones criogénicas se han ido adoptando como un sistema de generación de una situación de osteonecrosis en varios modelos animales experimentales, puesto que causan un daño celular y vascular directo sobre el tejido óseo [71]. A pesar de los buenos resultados conseguidos por Vélez *et al.* [98] en la generación del modelo, la reproducibilidad era limitada, ya que no se podía controlar la temperatura, y el procedimiento era invasivo, aumentando el riesgo de infección, embolia por la aplicación de nitrógeno líquido directo sobre los tejidos y otras complicaciones posteriores, como sangrados y hematomas. Para solventarlo se consideró el uso de sondas de crioterapia con un sistema cerrado basado un circuito interno de gases presurizados acopladas a un sistema de termopar que permite medir la temperatura del tejido durante el procedimiento de criogenia [146]. Wang *et al.* [101] desarrollaron un modelo experimental de ONCF en conejos empleando un sistema de crioterapia basado en criosondas con los gases argón y helio guiadas por RM. Observaron que la aplicación de dos ciclos combinando la administración de frío y calor mediado por estos gases ocasionaba el colapso de las cabezas femorales y la presencia de lagunas vacías o con osteocitos de aspecto necrótico y tejido fibroso en las cavidades de la MO. En nuestro caso, la criosonda pudo ser guiada y colocada en la localización deseada mediante radioscopia. La generación de la lesión osteonecrótica en el tejido óseo sin colapso e incongruencia articular a las seis semanas se confirmó mediante los cilindros biopsia obtenidos antes de la aplicación de los tratamientos experimentales. En estos observamos que el tejido óseo presentaba un aspecto desvitalizado, con lagunas desprovistas de osteocitos y tejido fibroso rodeando los fragmentos de las trabéculas óseas [147]. Con esta nueva metodología propuesta obtuvimos resultados concordantes con el modelo ovino propuesto por Vélez *et al.* [98], anteriormente mencionado, garantizando una mayor reproducibilidad y minimizando las complicaciones ocasionadas al ser un procedimiento menos invasivo. Por lo tanto, nuestro modelo corresponde a un modelo ovino de ONCF en un estadio de precolapso, similar al realizado por otros autores que han aplicado crioterapia mediante criosondas [100,101] o nitrógeno líquido [93–95,98,106,148].

La aplicación de los tratamientos experimentales se realizó mediante el procedimiento de descompresión central (DC), técnica ampliamente utilizada en la práctica clínica y que se asocia con una baja agresividad y morbilidad para las personas afectadas con ONCF [149]. El objetivo de la administración intraórgano de nuestro producto de ingeniería tisular y terapia celular siguiendo esta estrategia se basó considerando la experiencia previa del grupo en este modelo preclínico [104,107], trabajos similares

reportados por otros autores [84,90,96,105] y la traslacionalidad del procedimiento a un entorno clínico [114,120].

### 5.1.2. Metodología de obtención, expansión y caracterización de las oMSC

Los aspirados de MO para el posterior aislamiento y expansión de MSC en la clínica humana y en los estudios preclínicos se han obtenido principalmente de la cresta ilíaca [120,150–160]. Otros estudios también han referido su obtención del húmero [161,162] o fémur [163]. En nuestro estudio, obtuvimos los aspirados del esternón dada su mejor accesibilidad y tamaño y que permite recoger cantidades suficientes de MO. En todos los casos la obtención de MO fue efectiva y se obtuvo la cantidad suficiente para la expansión celular y la obtención de las dosis celulares establecidas para los tratamientos experimentales.

El aislamiento de las CMN de los aspirados de MO se realizó por medio de centrifugación por gradiente de densidad y la selección de las oMSC mediante adherencia a la superficie de cultivo. Aunque encontramos diferentes metodologías de aislamiento en la literatura, los procedimientos se realizaron siguiendo el protocolo establecido y optimizado de trabajos previos del grupo [104,107,144,145]. El rendimiento de CMN obtenidas de los aspirados de MO fue variable entre los diferentes animales, lo que concordó con otros estudios en ovinos [164,165] y en humanos [166], así como el tiempo de duplicación obtenido alrededor de dos días fue similar a otros trabajos publicados [153,157].

Siguiendo los parámetros establecidos por la ISCT [47] para definir las MSC humanas, las células que hemos aislado de MO ovina presentaron, en primer lugar, adherencia al plástico de cultivo y la morfología fibroblástica característica de estas células, tal y como las describen otros autores [104,150,153,157–159,163]. En segundo lugar, mostraron positividad para los marcadores de superficie CD44, CD166 y negatividad para CD45, CD31 y MHC de clase II-DR, también reportado previamente en otros estudios [104,150–152,155,156,167]. En estos trabajos, los marcadores CD44 y CD166 presentan un porcentaje de positividad del 81,08 al 99,42 % y del 44,40 al 93,40 %, respectivamente. En nuestro caso, el marcador CD44 presenta un porcentaje de positividad inferior al reportado y CD166 entraría dentro del rango referenciado. Estas diferencias podrían deberse a la variabilidad de las líneas de oMSC usadas, pero para ambos marcadores el resultado fue considerado positivo. En el caso de los isotipos empleados, estos presentaron cierta inespecificidad por las líneas celulares disminuyendo la positividad de los marcadores mesenquimales. Aunque la ISCT

establece otro patrón de marcadores de superficie positivos para las MSC, la disponibilidad de anticuerpos específicos para la especie ovina es limitada en la actualidad y la mayoría de los anticuerpos específicos para marcadores de MSC humanas no reacciona con las MSC ovinas [151,168]. Y, en tercer lugar, los cultivos inmaduros se diferenciaron en los tres linajes mesenquimales, osteogénico, adipogénico y condrogénico, de forma similar que otros estudios previos [104,150–154,157–159,161,163]. Por lo tanto, las oMSC aisladas de MO ovina han presentado las características que las definirían como MSC. Si bien la ISCT establece determinar estos parámetros que aplicarían a las MSC humanas, sugiere que también se consideren en el ámbito preclínico. Asimismo, los resultados globales obtenidos estarían en consonancia con otros trabajos previos en MSC de la especie ovina [104,150–152,154–159,161,163].

En relación a las oMSC marcadas con eGFP empleadas en los tratamientos alogénicos, estas presentaron un comportamiento similar a las oMSC aisladas de MO no marcadas de los tratamientos autólogos, sin mostrar alteraciones en cuanto al crecimiento en cultivo debido a dicho marcaje. Caminal *et al.* confirmaron en un estudio previo [104] la estabilidad fenotípica y funcional de estas células después del marcaje y de su cultivo posterior. Y del mismo modo, Li *et al.* [92] observaron que las MSC de MO de conejo marcadas con GFP presentaron cinéticas de crecimiento similares a las correspondientes MSC no marcadas. En cuanto a la criopreservación y el pase celular, las oMSC-eGFP no han presentado diferencias en el cultivo *in vitro* respecto las oMSC no marcadas, pese a tener estas últimas un pase inferior. Rhodes *et al.* [164] también observaron un crecimiento en cultivo similar entre oMSC de MO congeladas y sin congelar. La estabilidad cromosómica de las oMSC no ha sido evaluada en este estudio, pero nos hemos basado en los resultados de diferentes autores que confirman un cariotipo normal de las oMSC cultivadas a pase 8 [104], incluso más avanzados, llegando a pase 15 y 40 manteniéndose normal en todas las líneas celulares evaluadas [158]. Esto corroboraría la estabilidad fenotípica, funcional y cromosómica de las oMSC marcadas con eGFP y criopreservadas durante su cultivo *in vitro*.

La variabilidad que hemos observado en cuanto al rendimiento de CMN de los aspirados de MO, crecimiento y variaciones en la expresión de marcadores de superficie de las oMSC son dependientes del donante, tal y como se ha observado en el caso de las MSC ovinas [157] y humanas [169,170].

### 5.1.3. Metodología de preparación de los tratamientos experimentales y colonización de partículas

El marcaje de las oMSC con eGFP nos ha permitido observar de forma cualitativa mediante fluorescencia su adherencia a las partículas óseas desvitalizadas y corroborar que presentan una morfología fibroblástica una vez han colonizado la superficie. Este resultado concuerda con los obtenidos por Aarvold *et al.* [171] con MSC humanas adheridas a partículas óseas y por Peng *et al.* [172] con MSC caninas colonizando una matriz cerámica de fosfato de calcio, que presentaron una morfología similar a la observada en ambos casos. La asociación de partículas óseas desvitalizadas con las oMSC, ya sean de origen autólogo o alogénico, aportaría propiedades osteoconductoras y un soporte físico para las células, además de ser un material biodegradable [107,113]. El uso de GFP como marcador de las oMSC, además, se ha corroborado en otros estudios, tanto con MSC ovinas [104,158], como de otras especies [78,92].

En relación a las dosis celulares estudiadas en este trabajo, nos basamos en trabajos preclínicos anteriores del grupo [104,107,144] donde se había empleado la dosis celular de  $5 \cdot 10^6$  oMSC/cm<sup>3</sup> en productos de ingeniería tisular y terapia celular similares, estableciendo esta dosis como alta. En la literatura podemos encontrar otros estudios preclínicos de regeneración ósea en ONCF donde los rangos de dosis celulares aplicadas oscilan entre  $1 \cdot 10^6$  a  $5 \cdot 10^7$  de MSC [78,84,92,105,106]. Debido a que disponer de dosis elevadas puede suponer un promedio de unos 21 días, con la consiguiente inversión de tiempo y recursos materiales, por razones logísticas de cara a su traslación a un entorno clínico, se decidió establecer como dosis baja  $1 \cdot 10^6$  oMSC/cm<sup>3</sup>. En el presente estudio hemos observado que la dosis aplicada sí presenta diferencias en cuanto a la tasa de colonización de las partículas óseas desvitalizadas, puesto que los grupos correspondientes a dosis alta presentan un mayor porcentaje de células inmovilizadas respecto los grupos de dosis baja. El cálculo de la tasa de colonización celular de forma indirecta ha sido empleado previamente en otros estudios [104,144,173] y nos ha servido para evidenciar esta diferencia en cuanto a dosis. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Caminal *et al.* [104], donde las tasas de colonización mayores se correspondían con los inóculos más altos, estableciendo la dosis máxima efectiva en  $6 \cdot 10^6$  oMSC en 1 cm<sup>3</sup> de partículas óseas desvitalizadas. Prat *et al.* [144] observaron tasas de colonización del 60 % para inóculos celulares de  $6,60 - 6,80 \cdot 10^5$  MSC/cm<sup>3</sup>, similares a nuestros grupos de dosis bajas, mientras que Buizer *et al.* [173] reportaron tasas de colonización del 90 % para inóculos celulares de  $1 \cdot 10^6$  MSC/mL en matrices de TCP. La criopreservación, en



cambio, no ha influido en la tasa de colonización, puesto que los grupos con oMSC-eGFP presentan tasas de colonización muy similares a los grupos de oMSC sin criopreservar. Cabe remarcar, que las células criopreservadas fueron cultivadas y expandidas antes de colonizar las partículas óseas, permitiendo recuperar su viabilidad y funcionalidad después del proceso de descongelación [174].

### 5.1.4. Evaluación clínica y seguridad de los tratamientos aplicados

El análisis de los animales previo a su inclusión nos permitió establecer un control propio de cada individuo y la determinación de la ausencia de malformaciones o incongruencias en la anatomía de la cabeza femoral. También confirmamos por radiografía la madurez esquelética basándonos en el cierre del cartílago de crecimiento de la tibia proximal entre los 20 y 26 meses de edad [134,175], para asegurar una tasa de crecimiento óseo homogéneo y evitar una posible regeneración espontánea asociada a animales inmaduros esqueléticamente [176,177].

Clínicamente, los animales no presentaron diferencias entre los distintos tratamientos experimentales que indicaran algún tipo de reacción local o sistémica por la aplicación de oMSC de origen alogénico o autólogo. La recuperación de todos los animales fue muy parecida entre todos los grupos, sin presentar diferencias en la evolución del peso o el aspecto general durante el periodo de tratamiento experimental. Contrariamente a Prat *et al.* [144], que sí observaron que la aplicación de un tratamiento de ingeniería tisular con oMSC autólogas conllevaba un mejor resultado a nivel clínico respecto el producto acelular en un modelo ovino de defectos segmentarios críticos.

Los resultados analíticos de los diferentes grupos experimentales presentaron valores dentro de los intervalos de referencia establecidos para el hemograma en ovinos [178] y en concordancia con los valores basales antes de la intervención, tanto para los parámetros del hemograma como para el resto de variables de bioquímica y hemostasia. La aplicación de células de origen alogénico en los animales inmunocompetentes no incrementó los valores del recuento leucocitario o de otros parámetros celulares o bioquímicos que sugirieran algún tipo de respuesta inmunitaria, que fueron similares a los grupos de tratamiento autólogo. Estos resultados estarían en concordancia con otros estudios preclínicos que administraron MSC de origen alogénico adheridas a una matriz biodegradable en un modelo ovino de defectos críticos segmentarios [110] y por vía intravenosa en un modelo de ONCF en conejo [92,108]. En estos estudios todos los animales sobrevivieron y no reportaron alteraciones clínicas ni analíticas, las funciones hepáticas y renales fueron normales,

no observándose toxicidad crónica o signos de rechazo durante el periodo de estudio. En el presente estudio tampoco hemos observado alteraciones de los parámetros analizados en las muestras sanguíneas. Observamos en el recuento plaquetario valores más elevados en el grupo E (descompresión central aislada) en las semanas 6 y 12 respecto al resto de grupos de tratamiento. Esto no se relacionó con otros valores que también estuvieran alterados en este grupo, de modo que se podría pensar que el recuento plaquetario elevado haya podido deberse a un error de recuento de eritrocitos como plaquetas [178]. Por otro lado, tanto en el estudio de radiología simple como en el macroscópico, no se observaron deformidades en las cabezas femorales provocadas por sobrecrecimiento óseo ni formaciones de hueso ectópico en las inmediaciones del tejido blando. Prat *et al.* [144] reportan observaciones similares a las 12 semanas de la aplicación de su producto de ingeniería tisular y terapia celular con MSC autólogas en un modelo ovino de defectos segmentarios críticos, sin embargo, no hemos encontrado referencias respecto a los tratamientos alogénicos en la literatura revisada.

Durante el estudio experimental *in vivo* reportamos complicaciones durante o después de las cirugías experimentales, pero en ningún caso se relacionaron con los tratamientos experimentales administrados. Las pérdidas de los animales ocurridas se debieron a los procedimientos anestésicos o por fracturas que podrían estar relacionadas por el procedimiento de tunelización de DC o por debilidad mecánica ocasionada por la inducción de la lesión de ONCF. Otros autores también han reportado incidencias en sus modelos animales debido a fracturas [91,113] o a complicaciones intra o postoperatorias [89,93,113,140,179].

En cuanto a la seguridad de la aplicación de los productos de ingeniería tisular y terapia celular en base a matrices óseas combinadas con células madre mesenquimales adultas de origen alogénico, se ha demostrado equiparable a la opción autóloga mediante su administración por una ruta intraórgano en nuestro modelo ovino experimental de ONCF. Cabe remarcar que estos resultados coinciden con otros estudios preclínicos de ONCF similares donde se han administrado MSC expandidas *ex vivo* de origen autólogo [78,84,104,107] y de origen alogénico [92,108]. La seguridad en la administración de MSC de origen alogénico también ha sido reportada en otros estudios preclínicos de regeneración ósea [109–112,180,181] e incluso en estudios de infarto agudo de miocardio [182]. En la vertiente clínica, esta seguridad también ha sido corroborada por otros estudios clínicos donde se han empleado MSC de origen alogénico expandidas *ex vivo* para el tratamiento de la osteogénesis imperfecta [131], defectos condrales [132] u artrosis [183] sin indicios de

algún tipo de rechazo al producto celular de origen alogénico ni reacciones adversas de tipo sistémico o local.

Por lo tanto, la administración de MSC expandidas *ex vivo* de origen alogénico no ha dado lugar a reacciones adversas ni a rechazo aparente *in vivo* coincidiendo con otros trabajos similares publicados [92,108,110,111,113]. Arinzeh *et al.* [109], además, no detectaron la presencia de aloantígenos sistémicos en las muestras de suero sanguíneo de los animales receptores. Para poder confirmar la ausencia de una posible respuesta inmune a largo plazo, sin embargo, serían necesarios más estudios experimentales.

### 5.1.5. Evaluación de la eficacia en la regeneración ósea de los tratamientos

En el periodo postratamiento de seis semanas no hemos observado el colapso de la cabeza femoral de ninguna de las ovejas de los diferentes grupos experimentales. Los modelos animales cuadrúpedos progresarían menos hacia el colapso de la cabeza femoral en estudios de ONCF [88] y podemos encontrar estudios similares en diferentes especies donde refieren la ausencia de colapso o incongruencia articular en los grupos experimentales y control [78,79,106,107,140]. Sin embargo, otros estudios sí que han observado el colapso o deformidad de la cabeza femoral en los grupos control a las seis semanas en conejos [108] o superiores a las 10 semanas en grandes animales [96,97,172]. Es posible que el modelo animal, el tipo de inducción de la lesión y el periodo de tiempo evaluado postratamiento en cada caso pueda determinar la progresión o no al colapso.

En el estudio por microCT observamos que en la zona 1 control (hueso trabecular alejado del procedimiento de DC) los valores de *grayscale* obtenidos eran similares entre los diferentes grupos de tratamiento. Esta similitud nos permitió confirmar que los tejidos de esa zona presentan una densidad radiológica muy parecida entre todos los animales, sirviendo como control de técnica quirúrgica e imagen. En la zona 2 y zona 3, adyacente y craneal al túnel de DC respectivamente, hemos obtenido valores promedio de *grayscale* en los grupos celulares superiores al grupo E, al que se le realizó el procedimiento de descompresión central aislada. Esto podría indicar que, por un lado, la implantación de los tratamientos de ingeniería tisular y terapia celular a las seis semanas presentan un efecto, aunque moderado, en la estimulación de la regeneración ósea. Por otro lado, las zonas regenerativas se encuentran en la proximidad de éstos, siendo más intensa esta respuesta en la zona 3 craneal al túnel de DC. El origen y la dosis celular evaluada en este estudio muestran un

comportamiento parecido en cuanto a la estimulación de la regeneración ósea en el modelo experimental, aunque el origen alogénico y la dosis alta parecen mostrar cierta tendencia al alza según nuestros resultados. El empleo del microCT ha sido de gran utilidad para poder cuantificar la densidad radiológica y mineral del tejido óseo de los diferentes grupos experimentales de forma no destructiva [184] previamente a los estudios biomecánicos e histológicos.

Podemos encontrar en la literatura trabajos de investigación donde se ha evaluado la respuesta regenerativa ósea de la aplicación de diferentes productos de ingeniería tisular y terapia celular mediante estudios de imagen. En el estudio de defectos óseos segmentarios diafisarios en oveja realizado por Field *et al.* [180], observaron que la implantación de un *scaffold* de fosfato cálcico con oMSC de MO de origen alogénico mostraba por TC una densidad superior a los nueve meses postratamiento que el grupo acelular. En otro estudio similar al anterior, Berner *et al.* [110] evaluaron por microCT el volumen de tejido óseo nuevo en el defecto a las 12 semanas postimplantación y observaron que los grupos de oMSC de MO autólogas y alogénicas presentaron resultados ligeramente superiores que el *scaffold* acelular y de forma parecida entre ambos orígenes celulares. De forma similar, Kang *et al.* [113] también concluyeron un volumen y densidad ósea semejantes entre los grupos autólogo y alogénico a las 8 y 16 semanas posteriores a su implantación en un defecto crítico en el radio de conejos. En estos estudios, los grupos celulares presentaron mejores resultados que los grupos acelulares o control, pero sin ser estadísticamente significativos entre ambos orígenes celulares, como en nuestro caso. Además, hemos observado una gran variabilidad intragrupo, siendo más acusada en la zona 2 adyacente al túnel de DC, mientras que la zona 3 craneal de DC ha sido más moderada y ha presentado unos valores máximos superiores. La variabilidad radiológica encontrada en estas zonas ha podido condicionar la falta de significancia estadística, de forma comparable a otros estudios [110]. Asimismo, la densidad del hueso neoformado y de la matriz mineralizada *de novo* es menor y más variable que la del hueso lamelar maduro [184], por lo que la mezcla de ambos tipos de estructuras óseas en los VOIs de nuestro estudio y el periodo de tiempo postratamiento de seis semanas también han podido condicionar la ausencia de mayores diferencias en cuanto a la estimulación ósea en los grupos experimentales. En conjunto, la evaluación por microCT muestra que los tratamientos experimentales presentan un incremento, aunque moderado, de la densidad ósea en las zonas próximas al túnel de DC y que el origen celular y la dosis de los tratamientos evidencian un efecto parecido entre ellos.

En la evaluación biomecánica mediante los test de indentación, hemos observado que los valores del módulo de compresión en la zona 2 craneal presentan valores inferiores al tejido trabecular de la zona 1 control. Esto podría deberse a que a las seis semanas postratamiento el hueso formado *de novo* en la zona 2 craneal presenta una estructura de hueso plexiforme o fibroreticular, mecánicamente débil en comparación con el hueso lamelar maduro de la zona 1 control [185]. Tal y como observaron Qiang *et al.* [186] en su modelo preclínico de defectos osteocondrales, donde implantaron un *scaffold* basado en matriz ósea y cartilaginosa descelularizada colonizada por MSC de MO condicionadas con medio condrogénico, la rigidez de la zona ósea regenerada a las 24 semanas postimplantación era significativamente menor que la del hueso normal contralateral. Contrariamente a estos resultados, Tang *et al.* [96], en su modelo caprino de ONCF, observaron que el hueso neoformado en el grupo tratado con una matriz de  $\beta$ -TCP con MSC de MO transfectadas con BMP-2 obtuvo un módulo de compresión similar al del tejido óseo normal a las 16 semanas postratamiento. De forma parecida, Peng *et al.* [172] observaron un módulo de compresión mayor en el grupo que recibió un *scaffold* de fosfato cálcico colonizado por MSC de MO autóloga en la cabeza femoral de un modelo preclínico canino a las 30 semanas postimplantación, respecto a los grupos que recibieron el *scaffold* acelular, partículas óseas autólogas o el hueso normal de la cabeza femoral contralateral. Los investigadores asociaron este incremento a la resistencia a la capa de hueso *de novo* que recubría las trabéculas de los poros del *scaffold* sembrados con MSC.

De forma parecida a la evaluación por microCT, encontramos una variabilidad considerable dentro de cada grupo experimental en ambas zonas estudiadas. Esta variabilidad obtenida en los ensayos de biomecánica puede deberse a un factor interindividual, pero también a la localización de cada punto de indentación realizado que estaba condicionado a la disposición del túnel de DC en el interior de la cabeza femoral en cada animal y a la estabilidad de la pieza ósea en el momento de realizar el ensayo biomecánico. También podemos recalcar que un periodo postratamiento más extenso posiblemente habría permitido la remodelación del hueso neoformado de tipo plexiforme a hueso lamelar, confiriendo una menor variabilidad estructural del tejido y una mejor resistencia a la compresión.

En el análisis histológico semicuantitativo hemos observado que la aplicación de productos de ingeniería tisular y terapia celular estimula la osteogénesis en mayor medida respecto el procedimiento de DC aislado. Este resultado concuerda con otros estudios preclínicos similares realizados por varios autores donde aplicaron MSC autólogas expandidas *ex vivo* combinadas o no con diferentes matrices en una

situación de osteonecrosis inducida experimentalmente [78,79,84,102,104,106,107]. Asimismo, las MSC de origen alogénico también estimularían la regeneración ósea en conejos [108]. Los otros parámetros semicuantitativos evaluados no han mostrado diferencias a nivel de la estructura trabecular, la reabsorción ósea y la restauración de la MO que indiquen cambios regenerativos a las seis semanas de tratamiento. Estos parámetros podrían haber presentado diferencias entre los distintos grupos de tratamiento si el periodo de estudio postoperatorio hubiera sido más prolongado.

En cuanto al origen celular, hemos observado que la aplicación de MSC expandidas *ex vivo*, ya sean de origen autólogo o alogénico, colonizando matrices óseas desvitalizadas estimula la osteogénesis de forma equiparable a las seis semanas postratamiento. Otros estudios también muestran un potencial regenerativo óseo semejante entre ambos orígenes celulares [109–113]. Sin embargo, el estudio realizado por Coathup *et al.* [187] contradice estos resultados. Los autores evaluaron el crecimiento óseo en un modelo de tumores óseos en ovinos mediante la pulverización de oMSC autólogas o alogénicas. Reportaron un efecto positivo en relación a la estimulación con las células de origen autólogo mientras que el grupo que recibió las células de origen alogénico mostró un efecto negativo en la regeneración ósea, probablemente debido a que podría haber elicitado una respuesta inmunológica.

En relación a la aplicación de dos dosis diferentes en las partículas óseas, hemos observado que tanto la dosis alta como la dosis baja habían ejercido un estímulo similar en los grupos experimentales de nuestro estudio, tanto en el caso autólogo como alogénico. Este resultado está en consonancia con el mencionado previamente estudio de Coathup *et al.* [187] para los tratamientos de origen autólogo, donde evaluaron dos dosis diferentes. Observaron que, en los análisis radiológicos e histológicos, la formación ósea inducida fue similar con ambas dosis de MSC autólogas, no observándose una respuesta dosis-efecto.

En las observaciones de las muestras histológicas de las cabezas femorales hemos advertido zonas regenerativas localizadas en las inmediaciones del túnel de DC donde se aplicaron los tratamientos experimentales en todos los grupos, incluido el grupo E. En estas zonas regenerativas, el hueso de nueva formación se encuentra alrededor de las trabéculas preexistentes y fragmentos de las partículas óseas con osteoblastos alineados sobre éste. Este tejido óseo neoformado presenta una estructura de tipo plexiforme o fibroreticular o de tipo lamelar y se puede diferenciar del hueso trabecular preexistente gracias a las líneas de cementación que delimitan la reabsorción osteoclástica de la matriz mineralizada de nueva deposición con osteocitos de aspecto vital en su interior. Esta osteogénesis, sin embargo, se encontraría en las fases más

iniciales del proceso reparativo, combinada con zonas de reabsorción y un inicio de celularización y vascularización de la MO. La formación ósea *de novo* observada corresponde con a un proceso de osificación intramembranoso, siguiendo un patrón parecido al descrito por Gallardo-Calero *et al.* [23] en su modelo experimental de reconstrucción ósea. En las muestras estudiadas no hemos observado a nivel histológico hallazgos compatibles con una reacción inmunitaria diferencial en ninguna de las dosis alogénicas aplicadas, en concordancia con los resultados clínicos y analíticos. A pesar de esto, serían necesarios más estudios en modelos preclínicos de ONCF que corroborasen el papel de las MSC alogénicas y su dosis en una posible respuesta inmunitaria en organismos inmunocompetentes y, si esta respuesta fuera dosis-dependiente o, si por el contrario, dosis bajas podrían ser insuficientes para estimular una respuesta inmunogénica pero sí influir en un estímulo regenerativo beneficioso, tal y como se ha visto previamente [188].

En cuanto a la capacidad de las MSC para diferenciarse y formar tejido *per se in vivo*, encontramos estudios que lo evidencian. Yan *et al.* [78] y Caminal *et al.* [104] demostraron la presencia de MSC de origen autólogo marcadas con GFP 12 semanas después de la aplicación intraórgano y su diferenciación hacia células de apariencia osteoblástica e incluso osteocitos. En el estudio de Jin *et al.* [106] aplicaron MSC de origen autólogo marcadas con BrdU mediante infusión a través de la arteria femoral. Los autores observaron que las células fueron capaces de migrar hacia la cabeza femoral necrótica e incluso expresar osteocalceína, sugiriendo la diferenciación al linaje osteoblástico de estas células. Estos estudios confirmarían que las MSC autólogas ejercerían un papel como progenitoras que se diferenciarían e injertarían en los tejidos propios, pero además de este potencial progenitor directo, también estarían favoreciendo los procesos regenerativos endógenos mediante un efecto paracrino secretor de factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas [104]. A diferencia de estos estudios con MSC de origen autólogo, en nuestro trabajo no hemos detectado mediante inmunohistoquímica la presencia de oMSC marcadas con eGFP en las zonas de regeneración ósea a las seis semanas postratamiento. Berner *et al.* [110] también reportaron la ausencia de detección de MSC de origen alogénico después de su administración a las 12 semanas y, en un reciente estudio realizado por Bobi *et al.* [182], se reporta que la administración intracoronaria de MSC alogénicas es detectable a los dos días pero no a largo plazo. En ambos estudios, sin embargo, a pesar de no detectar la presencia de las células en los tejidos evaluados, sí que asocian un incremento en la formación ósea en el primero y una mejora funcional y de los procesos regenerativos a nivel del tejido miocárdico afectado en el segundo. A nivel

clínico, de Windt *et al.* [132] tampoco detectaron la presencia de MSC alogénicas en el tejido reparativo de las biopsias de los pacientes que recibieron su administración en defectos condrales. Del mismo modo que en los estudios preclínicos, pese a no encontrar evidencias de su presencia, sí refieren una mejora clínica en los pacientes. Por lo tanto, en el caso de las MSC de origen alogénico, el efecto terapéutico podría deberse más bien a su habilidad de modificar su microambiente y a un efecto paracrino mediante la secreción de diferentes moléculas antiinflamatorias, antiapoptóticas, antioxidantes y tróficas que promuevan y estimulen una respuesta reparativa en los tejidos, limitando a su vez la respuesta al estrés celular y apoptosis y reclutando células progenitoras y del sistema inmune del huésped antes de ser eliminadas por el organismo receptor [41,45,132,189,190].

### 5.1.6. Evaluación de los niveles de TGF- $\beta$ como biomarcador de la regeneración ósea

La identificación y validación de biomarcadores circulantes implicados en procesos regenerativos del tejido óseo pueden representar una gran utilidad de poder aplicarse con exactitud para predecir y monitorizar tratamientos de ingeniería tisular y terapia celular en pacientes con ONCF [142].

En este estudio hemos observado que de las tres isoformas de TGF- $\beta$  evaluadas, TGF- $\beta$ 1 mostraría un patrón de cambios más evidente en los grupos experimentales respecto las otras dos isoformas. Estos cambios vendrían representados por un pico en la detección plasmática durante las primeras semanas postratamiento. Clínicamente, los niveles circulantes de TGF- $\beta$ 1 se han evaluado como posible biomarcador de la consolidación ósea en pacientes con fracturas. Zimmermann *et al.* [191] referencian un incremento en los niveles serológicos de TGF- $\beta$ 1 en las dos primeras semanas después de una fractura coincidiendo con la formación del callo óseo y es significativamente menor en aquellos pacientes que muestran un retraso en la consolidación ósea. Hara *et al.* [192] también describen valores plasmáticos incrementados en ese mismo periodo de tiempo para TGF- $\beta$ 1 en pacientes con procesos regenerativos normales respecto a aquellos que presentan un retraso en la consolidación ósea. En ambos estudios, el incremento de los niveles circulantes de TGF- $\beta$ 1 estaría retrasado en las situaciones menos favorables en cuanto a regeneración, de forma similar a los resultados que hemos obtenido en el grupo control E. En el ámbito preclínico, TGF- $\beta$ 1 ha sido estudiado principalmente a nivel génico, donde Steinbrech *et al.* [30] reportaron un pico de expresión génica en la



primera semana postoperatoria en la zona de osteotomía y tejidos circundantes en un modelo de fractura mandibular en rata. Este incremento de TGF- $\beta$ 1 en las primeras semanas después de la lesión o, en nuestro caso posterior a la aplicación de los tratamientos celulares, podría estar relacionado con su secreción en forma de factor soluble por las MSC localizadas en las zonas de lesión [30,41].

Entre los trabajos publicados de la literatura actual no hemos encontrado otros estudios preclínicos en la especie ovina donde se hayan estudiado los niveles de TGF- $\beta$  circulantes. Sí se han evaluado, por contra, los niveles serológicos de otros candidatos a biomarcadores de procesos relacionados con el metabolismo óseo en ovinos, como las proteínas alcalino fosfatasa, osteocalcina y fosfatasa ácida tartrato resistente, y los minerales calcio y fosfato, entre otros [29,67]. Estos también podrían tener un interés en cuanto a predecir o complementar información acerca de una respuesta a los procesos regenerativos o de la evolución, en cuanto a regeneración ósea, de aquellos individuos que hayan recibido terapia celular e ingeniería tisular. No obstante, serán necesarios más estudios que evalúen la correlación de los niveles sistémicos de diferentes factores y proteínas y los procesos regenerativos óseos para poder estandarizar su papel como biomarcadores de la regeneración ósea.

### 5.2. Limitaciones del estudio

Este trabajo corresponde a un estudio experimental preclínico y podemos encontrar limitaciones propias de los trabajos realizados en modelos animales. El animal empleado, la oveja, presenta similitudes con los humanos en relación a la composición, metabolismo y remodelación ósea, pero también diferencias filogenéticas. Histológicamente, la estructura del hueso ovino se ha descrito como principalmente primaria o reticular, a diferencia de la humana que es secundaria o haversiana [66]. Y biomecánicamente, el peso soportado por la cadera y las extremidades posteriores de los ovinos es inferior al ser un animal cuadrúpedo y repartir el peso con las extremidades anteriores [193]. Por otro lado, partimos de un animal sano en el cual la lesión creada no es idéntica a una situación clínica real, donde la lesión puede encontrarse localizada en puntos diferentes de la anatomía de la cabeza femoral y la carga aplicada sobre ésta puede ser diferente en cada caso. También debemos tener en cuenta que los humanos pueden tener enfermedades concomitantes y tratamientos farmacológicos asociados que pueden influir en la respuesta de las terapias. De modo que, aunque la oveja representa un modelo muy valorado para estudiar la seguridad y eficacia de productos de ingeniería tisular y

terapia celular y su empleo está extendido y con tendencia al alza en el campo de la investigación en ortopedia [62,193], debemos tener presente que nuestro modelo es similar a la situación clínica pero no equivalente.

El número de animales incluidos en los grupos de estudio, así como el periodo de estudio postratamiento de seis semanas, han representado una limitación en relación a la potencia estadística. Un incremento del número y un periodo de tiempo más prolongado hubieran permitido la obtención de diferencias más concluyentes y significativas en los diferentes análisis realizados, pero el diseño experimental fue condicionado por los recursos de estabulación disponibles para el número de animales incluidos en el estudio. En cuanto al ensayo inmunohistoquímico para la detección de MSC marcadas con eGFP, es posible que en las muestras histológicas representativas estudiadas no se hayan podido localizar células marcadas.

Otra limitación de este estudio es la falta de ensayos en relación al análisis de la generación de aloantígenos por parte de los grupos que han recibido los productos con oMSC de origen alogénico. Estos estudios hubieran podido ofrecer información de una probable respuesta inmunológica más allá de la ausencia de respuesta leucocitaria y si esta hubiera sido dosis-dependiente en los grupos de terapia celular alogénica. Sin embargo, el objetivo principal del presente estudio era evaluar la eficacia de esta terapia para el tratamiento de la osteonecrosis en un modelo experimental de ONCF de forma equiparable a la opción autóloga.

Finalmente, el seguimiento de la inducción de la lesión y el periodo postratamiento no se han valorado con RM, método de diagnóstico de preferencia en la clínica. Los cortos periodos de tiempo y la dificultad logística y de acceso a aparatos de RM de potencia suficiente para detectar cambios tisulares [107] han supuesto un inconveniente. Se presentaría como alternativa la valoración de otras técnicas de diagnóstico que pudieran determinar la actividad metabólica en las zonas regenerativas respecto a la cabeza femoral contralateral, como la tomografía por emisión de positrones (PET), o el seguimiento de las MSC aplicadas mediante bioluminiscencia. No obstante, las dificultades en la accesibilidad y tamaño del animal suponen nuevamente un obstáculo para este modelo animal grande en la actualidad.

### 5.3. Trascendencia clínica del estudio

La trascendencia clínica de este estudio se centra en la evaluación de la eficacia de un producto de ingeniería tisular y terapia celular basado en MSC indiferenciadas de origen alogénico. Estas células combinadas con partículas óseas desvitalizadas se han aplicado mediante el procedimiento de descompresión central en un modelo preclínico de osteonecrosis de cabeza femoral. El empleo de productos alogénicos puede representar una ventaja en cuanto a la sostenibilidad de la producción de terapias celulares respecto los autólogos para la ONCF, pero también para el tratamiento de otras patologías del sistema musculoesquelético caracterizadas por la dificultad de regenerar el tejido óseo, como la osteogénesis imperfecta o la enfermedad de Legg-Calvé-Perthes. El establecimiento de un banco celular donde las MSC obtenidas de donantes puedan ser criopreservadas permite la posibilidad de disponer de mayores dosis celulares y de controles de calidad rutinarios sin la presión de obtener un producto fresco para uso inmediato. Además, permitiría disponer de las MSC requeridas para los tratamientos en un periodo de tiempo mucho más reducido que las opciones autólogas. Esto conlleva una reducción de los costes de producción y la minimización de la variabilidad del material de partida en relación a la obtención de las MSC de donantes jóvenes y sanos [194]. Otro aspecto a tener en cuenta es el empleo de células diferenciadas o no hacia el linaje osteogénico, puesto que también puede condicionar el encarecimiento económico como, por ejemplo, el tiempo de cultivo y disponibilidad [168]. Además, la prediferenciación de las MSC podría reducir su vida terapéutica *in vivo* puesto que la expresión de marcadores del MHC de clase I y II podría acelerar su reconocimiento por parte del huésped y su eliminación del organismo de forma prematura [52,195], por lo que un producto con MSC indiferenciadas aportaría ventajas en cuanto a coste-efectividad. Por otro lado, se ha postulado que las MSC tienen la capacidad de migrar hacia los lugares donde hay una lesión e inflamación y que secretan un gran número de factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas que mediarían la reparación endógena por la modificación del microambiente del tejido alterado, más que por la propia diferenciación e injerto de las MSC aplicadas [41,92,183].

Los modelos preclínicos no estudian las mismas premisas que la situación clínica, cuyos resultados se obtienen principalmente de estudios de imagen por RM y por cuestionarios que evalúan la calidad de vida y funcionalidad de los pacientes. Es en este tipo de investigación experimental donde podemos ir un paso más allá y obtener muestras óseas que permitan evaluar el propio tejido de forma invasiva por diferentes metodologías. En el presente estudio hemos demostrado que la aplicación de matrices

óseas combinadas con células madre mesenquimales adultas de origen alogénico es segura, factible y estimula la regeneración ósea de forma equiparable a su homólogo autólogo. Hemos observado la ausencia de respuesta inmunitaria y tumorigénesis local o sistémica, por lo que el perfil de seguridad sería viable para poder trasladar este producto a un posible entorno clínico. Los ensayos reportados en la literatura, donde se han aplicado productos de ingeniería tisular y terapia celular basada en MSC de origen alogénico en pacientes, no reportan efectos adversos graves y sí un beneficio clínico [121,130–132], lo que apoyaría los resultados obtenidos en este trabajo.

De especial interés encontramos que el conjunto de procedimientos empleados para la obtención de estos tratamientos experimentales de ingeniería tisular y terapia celular están protocolizados bajo normativa GMP y BPL en los laboratorios de la División de Terapias Avanzadas del Banc de Sang i Teixits, puesto que siguen la misma estrategia empleada para la producción de los tratamientos aplicados en el ensayo clínico descrito en la tesis doctoral de Hernández A. [129]. Esto reforzaría aún más la posible traslación de los resultados obtenidos en el presente estudio hacia una segunda fase clínica para el desarrollo de un producto de ingeniería tisular y terapia celular de origen alogénico listo para usar a corto plazo en pacientes afectados por ONCF.

## **6. Conclusiones**

---



1. Un producto de ingeniería tisular y terapia celular en base a matrices óseas combinadas con células madre mesenquimales de origen alogénico induce la regeneración ósea de forma equiparable a su combinación con células madre mesenquimales de origen autólogo.
2. Una dosis baja de células madre mesenquimales indiferenciadas de  $0,5 \cdot 10^6$  células/cm<sup>3</sup> de partículas óseas desvitalizadas estimula la regeneración ósea de forma equiparable a una dosis alta de  $5 \cdot 10^6$  células/cm<sup>3</sup>.
3. La aplicación de células madre mesenquimales indiferenciadas ovinas de origen alogénico es segura y no provoca efectos adversos locales o sistémicos en un modelo ovino experimental de osteonecrosis de cabeza femoral.
4. En un proceso regenerativo óseo mediante la aplicación de células madre mesenquimales indiferenciadas ovinas, TGF- $\beta$ 1 se postula como el biomarcador plasmático de elección para predecir y monitorizar tratamientos de ingeniería tisular y terapia celular.
5. La estimulación de la regeneración ósea mediada por células madre mesenquimales de origen alogénico se debería esencialmente a un mecanismo paracrino dado que no se han detectado células marcadas con eGFP en el proceso regenerativo estudiado.
6. Los resultados obtenidos en este estudio preclínico nos permiten afirmar que las células madre mesenquimales de origen alogénico a dosis bajas muestran capacidad de estimular la regeneración ósea en lesiones osteonecróticas de cabeza femoral, lo cual deberá ser considerado en el diseño de nuevos productos de ingeniería tisular y terapia celular avanzada para la clínica humana.





## **7. Bibliografía**

---



- [1] Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum* 2002;32:94–124.
- [2] Omolehinwa TT, Akintoye SO. Chemical and Radiation-Associated Jaw Lesions. *Dent Clin North Am* 2016;60:265–77.
- [3] Moya-Angeler J, Ariana L G, Jordan C V, Amelia N, Lane JM. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head. *World J Orthop* 2015;6:590.
- [4] Lavernia CJ, Sierra RJ, Grieco FR. Osteonecrosis of the femoral head. *J Am Acad Orthop Surg* 1999;7:250–61.
- [5] Kaushik AP, Das A, Cui Q. Osteonecrosis of the femoral head: An update in year 2012. *World J Orthop* 2012;3:49–57.
- [6] Villa JC, Husain S, van der List JP, Gianakos A, Lane JM. Treatment of Pre-Collapse Stages of Osteonecrosis of the Femoral Head: a Systematic Review of Randomized Control Trials. *HSS J* 2016;12:261–71.
- [7] Guerado E, Caso E. The physiopathology of avascular necrosis of the femoral head: an update. *Injury* 2016;47:S16–26.
- [8] Zalavras CG, Lieberman JR. Osteonecrosis of the femoral head: Evaluation and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 2014;22:455–64.
- [9] Gangji V, Hauzeur JP. Cellular-Based Therapy for Osteonecrosis. *Orthop Clin North Am* 2009;40:213–21.
- [10] Gao YS, Zhang CQ. Cytotherapy of osteonecrosis of the femoral head: A mini review. *Int Orthop* 2010;34:779–82.
- [11] Houdek MT, Wyles CC, Martin JR, Sierra RJ. Stem cell treatment for avascular necrosis of the femoral head: Current perspectives. *Stem Cells Cloning Adv Appl* 2014;7:65–70.
- [12] Arbab D, König DP. Atraumatic Femoral Head Necrosis in Adults. *Dtsch Aertzblatt Online* 2016;113:31–8.
- [13] Beaulé PE, Amstutz HC. Management of Ficat stage III and IV osteonecrosis of the hip. *J Am Acad Orthop Surg* 2004;12:96–105.
- [14] Kim HKW. Legg-Calve-Perthes disease: Etiology, pathogenesis, and biology. *J Pediatr Orthop* 2011;31:S141-6.
- [15] Kim HK. Pathophysiology and New Strategies for the Treatment of Legg-Calvé-Perthes Disease. *J Bone Jt Surgery-American Vol* 2012;94:659–69.
- [16] Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Ten Years Later. *J Bone Jt Surg* 2006;88:1117.
- [17] Mont MA, Cherian JJ, Sierra RJ, Jones LC, Lieberman JR. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: Where do we stand today? A ten-year update. *J Bone Jt Surg - Am Vol* 2014;97:1604–27.
- [18] Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica. Texto y atlas. 5a edición.* Barcelona: Masson; 2002.
- [19] Stevens A, Lowe J. *Histología Humana. 2a edición.* Madrid: Harcourt Brace; 1998.

## 7. Bibliografía

---

- [20] Heino T, Hentunen T. Differentiation of Osteoblasts and Osteocytes from Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3:131–45.
- [21] Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2017:e12740.
- [22] Hayrapetyan A, Jansen JA, van den Beucken JJJP. Signaling Pathways Involved in Osteogenesis and Their Application for Bone Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 2015;21:75–87.
- [23] Gallardo-Calero I, Barrera-Ochoa S, Manzanares MC, Sallent A, Vicente M, López-Fernández A, et al. Vascularized Periosteal Flaps Accelerate Osteointegration and Revascularization of Allografts in Rats. *Clin Orthop Relat Res* 2018:1–15.
- [24] Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392–404.
- [25] Fazzalari NL. Bone Fracture and bone fracture repair. *Osteoporos. Int.*, vol. 22, 2011, p. 2003–6.
- [26] Pountos I, Georgouli T, Pneumaticos S, Giannoudis P V. Fracture non-union: Can biomarkers predict outcome? *Injury* 2013;44:1725–32.
- [27] Chaverri D, Vives J. Toward the clinical use of circulating biomarkers predictive of bone union. *Biomark Med* 2017:bmm-2017-0180.
- [28] Seebeck P, Bail HJ, Exner C, Schell H, Michel R, Amthauer H, et al. Do serological tissue turnover markers represent callus formation during fracture healing? *Bone* 2005;37:669–77.
- [29] Sousa CP, Lopez-Peña M, Guzón FM, Abreu HVD, Luís MR, Viegas CA, et al. Evaluation of bone turnover markers and serum minerals variations for predicting fracture healing versus non-union processes in adult sheep as a model for orthopedic research. *Injury* 2017;48:1768–75.
- [30] Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, Dudziak ME, Luchs JS, Saadeh PB, et al. Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:2028–38.
- [31] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–6.
- [32] Lee K, Chan CK, Patil N, Goodman SB. Cell therapy for bone regeneration-bench to bedside. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2009;89:252–63.
- [33] Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012;40:363–408.
- [34] Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: Challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005;9:72–84.
- [35] Tevlin R, Walmsley GG, Marecic O, Hu MS, Wan DC, Longaker MT. Stem and progenitor cells: advancing bone tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res* 2016;6:159–73.
- [36] Lee EH. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Jt Surg - Br Vol* 2006;88-B:841–51.
- [37] Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 2007;28:4240–50.
- [38] Hernigou P, Homma Y. Tissue bioengineering in orthopedics. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2012;9:21–3.
- [39] Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys* 2014;561:64–73.
- [40] Fakhry M, Hamade E, Bassam B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells* 2013;5:136.

- [41] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726–36.
- [42] Asatrian G, Pham D, Hardy WR, James AW, Peault B. Stem cell technology for bone regeneration: Current status and potential applications. *Stem Cells Cloning Adv Appl* 2015;8:39–48.
- [43] Yousefi AM, James PF, Akbarzadeh R, Subramanian A, Flavin C, Oudadesse H. Prospect of stem cells in bone tissue engineering: A review. *Stem Cells Int* 2016;2016:6180487.
- [44] de Souza LEB, Malta TM, Kashima Haddad S, Covas DT. Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related? *Stem Cells Dev* 2016;25:1843–52.
- [45] Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:126–31.
- [46] Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimble JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:140–50.
- [47] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.
- [48] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393–5.
- [49] Dawson JI, Kanczler J, Tare R, Kassem M, Oreffo ROC. Concise review: Bridging the gap: Bone regeneration using skeletal stem cell-based strategies-where are we now? *Stem Cells* 2014;32:35–44.
- [50] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11–20.
- [51] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:890–6.
- [52] Faiella W, Atoui R. Immunotolerant properties of mesenchymal stem cells: Updated review. *Stem Cells Int* 2016;2016:1–7.
- [53] Stanovici J, Le Nail LR, Brennan MA, Vidal L, Trichet V, Rosset P, et al. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Curr Res Transl Med* 2016;64:83–90.
- [54] Akpancar S, Tatar O, Turgut H, Akyildiz F, Ekinci S. The Current Perspectives of Stem Cell Therapy in Orthopedic Surgery. *Arch Trauma Res* 2016;5:e37976.
- [55] Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 1999;17:171–7.
- [56] D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999;14:1115–22.
- [57] Liu H, Xia X, Li B. Mesenchymal stem cell aging: Mechanisms and influences on skeletal and non-skeletal tissues. *Exp Biol Med* 2015;240:1099–106.
- [58] Piuze NS, Chahla J, Schrock JB, LaPrade RF, Pascual-Garrido C, Mont MA, et al. Evidence for the Use of Cell-Based Therapy for the Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head: A Systematic Review of the Literature. *J Arthroplasty* 2017;32:1698–708.
- [59] Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *PLoS One* 2012;7:e47559.

## 7. Bibliografía

---

- [60] Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res* 2014;100:S107-12.
- [61] Ma J, Both SK, Yang F, Cui F-Z, Pan J, Meijer GJ, et al. Concise Review: Cell-Based Strategies in Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:98–107.
- [62] Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cells Mater* 2007;13:1–10.
- [63] Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:123–45.
- [64] Harvey EJ, Giannoudis P V, Martineau PA, Lansdowne JL, Dimitriou R, Moriarty TF, et al. Preclinical animal models in trauma research. *J Orthop Trauma* 2011;25:488–93.
- [65] van Griensven M. Preclinical testing of drug delivery systems to bone. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;94:151–64.
- [66] Mills LA, Simpson AHRW. In vivo models of bone repair. *J Bone Joint Surg Br* 2012;94:865–74.
- [67] Camassa JA, Diogo CC, Bordelo JPA, Bonelli MA, Viegas CA, Azevedo JT, et al. Tartrate-resistant acid phosphate as biomarker of bone turnover over the lifespan and different physiologic stages in sheep. *BMC Vet Res* 2017;13:239.
- [68] 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;40:345–54.
- [69] Kikkawa M, Imai S, Hukuda S. Altered postnatal expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type X collagen preceding the Perthes' disease-like lesion of a rat model. *J Bone Miner Res* 2000;15:111–9.
- [70] Brenig B, Leeb T, Jansen S, Kopp T. Analysis of blood clotting factor activities in canine Legg-Calvé-Perthes' disease. *J Vet Intern Med* 1999;13:570–3.
- [71] Fan M, Peng J, Qin L, Lu S. Experimental animal models of osteonecrosis. *Rheumatol Int* 2011;31:983–94.
- [72] Norman D, Reis D, Zinman C, Misselevich I, Boss JH. Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rat. An experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Legg-Perthes disease. *Int J Exp Pathol* 1998;79:173–81.
- [73] Hofstaetter JG, Wang J, Yan J, Glimcher MJ. Changes in bone microarchitecture and bone mineral density following experimental osteonecrosis of the hip in rabbits. *Cells Tissues Organs* 2007;184:138–47.
- [74] Nishino M, Matsumoto T, Nakamura T, Tomita K. Pathological and hemodynamic study in a new model of femoral head necrosis following traumatic dislocation. *Arch Orthop Trauma Surg* 1997;116:259–62.
- [75] Liu Y, Zhao D, Wang W, Zhang Y, Wang B, Li Z. Efficacy of core decompression for treatment of canine femoral head osteonecrosis induced by arterial ischaemia and venous congestion. *HIP Int* 2017;27:406–11.
- [76] Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, Menezes N, Olear E, Jimenez M, et al. Femoral head deformation and repair following induction of ischemic necrosis: A histologic and magnetic resonance imaging study in the piglet. *J Bone Jt Surg - Ser A* 2009;91:2903–14.
- [77] Cheon JE, Yoo WJ, Kim IO, Kim WS, Choi YH. Effect of arterial deprivation on growing femoral epiphysis: Quantitative magnetic resonance imaging using a piglet model. *Korean J Radiol* 2015;16:617–25.
- [78] Yan Z, Hang D, Guo C, Chen Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to Osteonecrosis of femoral head. *J Orthop Res* 2009;27:442–6.

- [79] Hang D, Wang Q, Guo C, Chen Z, Yan Z. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with VEGF165 transgenic bone marrow mesenchymal stem cells in mongrel dogs. *Cells Tissues Organs* 2012;195:495–506.
- [80] Kerachian MA, Harvey EJ, Cournoyer D, Chow TY, Nahal A, Séguin C. A rat model of early stage osteonecrosis induced by glucocorticoids. *J Orthop Surg Res* 2011;6:62.
- [81] Kang P, Xie X, Tan Z, Yang J, Shen B, Zhou Z, et al. Repairing defect and preventing collapse of femoral head in a steroid-induced osteonecrotic of femoral head animal model using strontium-doped calcium polyphosphate combined BM-MNCs. *J Mater Sci Mater Med* 2015;26:1–9.
- [82] Wang X, Liu Y, Wang X, Liu R, Li J, Zhang G, et al. The Role of 99mTc-Annexin v Apoptosis Scintigraphy in Visualizing Early Stage Glucocorticoid-Induced Femoral Head Osteonecrosis in the Rabbit. *Biomed Res Int* 2016;2016:1–6.
- [83] Irida T, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Iwamoto Y, Sugioka Y, et al. Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits. *Bone* 2001;28:641–9.
- [84] Song H, Tao L, Wang F, Wang W, Wei Y, Shen W, et al. Effect of bone mesenchymal stem cells transplantation on the micro-environment of early osteonecrosis of the femoral head. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:14528–34.
- [85] Zheng LZ, Liu Z, Lei M, Peng J, He YX, Xie XH, et al. Steroid-Associated Hip Joint Collapse in Bipedal Emus. *PLoS One* 2013;8:e76797.
- [86] Umans H, Haramati N, Flusser G. The diagnostic role of gadolinium enhanced MRI in distinguishing between acute medullary bone infarct and osteomyelitis. *Magn Reson Imaging* 2000;18:255–62.
- [87] Pan ZX, Zhang HX, Wang YX, Zhai L Di, Du W. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2/poly-lactide-co-glycolic acid (rhBMP-2/PLGA) with core decompression on repair of rabbit femoral head necrosis. *Asian Pac J Trop Med* 2014;7:895–9.
- [88] Zhu Z-H, Gao Y-S, Luo S-H, Zeng B-F, Zhang C-Q. An animal model of femoral head osteonecrosis induced by a single injection of absolute alcohol: an experimental study. *Med Sci Monit* 2011;17:BR97-102.
- [89] Manggold J, Sergi C, Becker K, Lukoschek M, Simank HG. A new animal model of femoral head necrosis induced by intraosseous injection of ethanol. *Lab Anim* 2002;36:173–80.
- [90] Feitosa MLT, Fadel L, Beltrão-Braga PCB, Wenceslau CV, Kerkis I, Kerkis A, et al. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results. *Acta Cir Bras* 2010;25:416–22.
- [91] Wang C, Wang J, Zhang Y, Yuan C, Liu D, Pei Y, et al. A canine model of femoral head osteonecrosis induced by an ethanol injection navigated by a novel template. *Int J Med Sci* 2013;10:1451–8.
- [92] Li Z hua, Liao W, Cui X long, Zhao Q, Liu M, Chen Y hao, et al. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci* 2011;8:74–83.
- [93] Jiang W, Wang P, Wan Y, Xin D, Fan M. A simple method for establishing an ostrich model of femoral head osteonecrosis and collapse. *J Orthop Surg Res* 2015;10:74.
- [94] Poignard A, Lebouvier A, Cavet M, Rahmouni A, Flouzat Lachaniette CH, Bierling P, et al. New preclinical porcine model of femoral head osteonecrosis to test mesenchymal stromal cell efficiency in regenerative medicine. *Int Orthop* 2014;38:1837–44.
- [95] Conzemius MG, Brown TD, Zhang Y, Robinson RA. A new animal model of femoral head osteonecrosis: One that progresses to human-like mechanical failure. *J Orthop Res* 2002;20:303–9.

## 7. Bibliografía

---

- [96] Tang TT, Lu B, Yue B, Xie XH, Xie YZ, Dai KR, et al. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with hBMP-2-gene-modified tissue-engineered bone in goats. *J Bone Jt Surg - Br Vol* 2007;89-B:127–9.
- [97] Yang S, Wu X, Mei R, Yang C, Li J, Xu W, et al. Biomaterial-loaded allograft threaded cage for the treatment of femoral head osteonecrosis in a goat model. *Biotechnol Bioeng* 2008;100:560–6.
- [98] Vélez R, Soldado F, Hernández A, Barber I, Aguirre M. A new preclinical femoral head osteonecrosis model in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011;131:5–9.
- [99] Reed KL, Brown TD, Conzemius MG. Focal cryogen insults for inducing segmental osteonecrosis: Computational and experimental assessments of thermal fields. *J Biomech* 2003;36:1317–26.
- [100] Fan M, Peng J, Wang A, Zhang L, Liu B, Ren Z, et al. Emu model of full-range femoral head osteonecrosis induced focally by an alternating freezing and heating insult. *J Int Med Res* 2011;39:187–98.
- [101] Wang D, Wang G, Liu M, Sun L, Zong W, Jiang H, et al. A novel animal model of osteonecrosis of the femoral head induced using a magnetic resonance imaging-guided argon-helium cryotherapy system. *Exp Ther Med* 2014;7:1525–8.
- [102] Li Y, Han R, Geng C, Wang Y, Wei L. A new osteonecrosis animal model of the femoral head induced by microwave heating and repaired with tissue engineered bone. *Int Orthop* 2009;33:573–80.
- [103] Long T, Xu J, McClure SR, Amin V, Haynes J. Potential Femoral Head Osteonecrosis Model Induced by High-Intensity Focused Ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2013;39:1056–65.
- [104] Caminal M, Vélez R, Rabanal RM, Vivas D, Batlle-Morera L, Aguirre M, et al. A reproducible method for the isolation and expansion of ovine mesenchymal stromal cells from bone marrow for use in regenerative medicine preclinical studies. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11:3408–16.
- [105] Lebouvier A, Poignard A, Cavet M, Amiaud J, Leotot J, Hernigou P, et al. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:68.
- [106] Jin H, Xu T, Chen Q, Wu C, Wang P, Mao Q, et al. The fate and distribution of autologous bone marrow mesenchymal stem cells with intra-arterial infusion in osteonecrosis of the femoral head in dogs. *Stem Cells Int* 2016;2016:8616143.
- [107] Vélez R, Hernández-Fernández A, Caminal M, Vives J, Soldado F, Fernández A, et al. Treatment of femoral head osteonecrosis with advanced cell therapy in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012;132:1611–8.
- [108] Li Z, Liao W, Zhao Q, Liu M, Xia W, Yang Y, et al. Angiogenesis and bone regeneration by allogeneic mesenchymal stem cell intravenous transplantation in rabbit model of avascular necrotic femoral head. *J Surg Res* 2013;183:193–203.
- [109] Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, Van Den Bos C, Gordon S, Kraus K, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Jt Surg - Ser A* 2003;85:1927–35.
- [110] Berner A, Reichert JC, Woodruff MA, Saifzadeh S, Morris AJ, Epari DR, et al. Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta Biomater* 2013;9:7874–84.
- [111] Guo S, Xu J, Zou Q, Jiang D. Immunological Study of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells during Bone Formation. *J Int Med Res* 2009;37:1750–9.
- [112] Udehiya RK, Amarpal, Aithal HP, Kinjavdekar P, Pawde AM, Singh R, et al. Comparison of autogenic and allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells for repair of segmental bone defects in rabbits. *Res Vet Sci* 2013;94:743–52.



- [113] Kang SH, Chung YG, Oh IH, Kim YS, Min KO, Chung JY. Bone regeneration potential of allogeneic or autogeneic mesenchymal stem cells loaded onto cancellous bone granules in a rabbit radial defect model. *Cell Tissue Res* 2014;355:81–8.
- [114] Im G Il. Clinical use of stem cells in orthopaedics. *Eur Cells Mater* 2017;33:183–96.
- [115] Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *J Bone Jt Surg* 1999;81:349–55.
- [116] 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;30:348–51.
- [117] Lee JS, 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;24:604–9.
- [118] Gangji V, Toungouz M, Hauzeur J-P. Stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:437–42.
- [119] Hernigou P, Flouzat-Lachaniette CH, Delambre J, Poignard A, Allain J, Chevallier N, et al. Osteonecrosis repair with bone marrow cell therapies: State of the clinical art. *Bone* 2015;70:102–9.
- [120] Piuze NS, Chahla J, Jiandong H, Chughtai M, LaPrade RF, Mont MA, et al. Analysis of Cell Therapies Used in Clinical Trials for the Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head: A Systematic Review of the Literature. *J Arthroplasty* 2017;32:2612–8.
- [121] Hernigou P, Bernaudin F, Reinert P, Kuentz M, Vernant JP. Bone-Marrow Transplantation in Sickle-Cell Disease. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1726–30.
- [122] Gangji V, Hauzeur J-P, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A:1153–60.
- [123] Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res* 2002:14–23.
- [124] Rackwitz L, Eden L, Reppenhagen S, Reichert JC, Jakob F, Walles H, et al. Stem cell- and growth factor-based regenerative therapies for avascular necrosis of the femoral head. *Stem Cell Res Ther* 2012;3:7.
- [125] Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, Kotobuki N, Sugimoto K, Ohmura T, et al. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: Transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 2006;30:960–2.
- [126] Aoyama T, Goto K, Kakinoki R, Ikeguchi R, Ueda M, Kasai Y, et al. An Exploratory Clinical Trial for Idiopathic Osteonecrosis of Femoral Head by Cultured Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Augmented with Vascularized Bone Grafts. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20:233–42.
- [127] Müller I, Vaegler M, Holzwarth C, Tzaribatchev N, Pfister SM, Schütt B, et al. Secretion of angiogenic proteins by human multipotent mesenchymal stromal cells and their clinical potential in the treatment of avascular osteonecrosis. *Leukemia* 2008;22:2054–61.
- [128] Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, et al. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone* 2012;50:325–30.
- [129] Hernández Martínez AJ. Estudio clínico de terapia celular autóloga con células madre adultas expandidas ex vivo, en el tratamiento de la osteonecrosis de la cabeza femoral. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 2015.
- [130] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309–13.

## 7. Bibliografia

---

- [131] Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:8932–7.
- [132] de Windt TS, Vonk LA, Slaper-Cortenbach ICM, van den Broek MPH, Nizak R, van Rijen MHP, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cartilage Regeneration and Are Safe for Single-Stage Cartilage Repair in Humans upon Mixture with Recycled Autologous Chondrons. *Stem Cells* 2017;35:256–64.
- [133] Kilborn SH, Trudel G, Uhthoff H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2002;41:21–6.
- [134] Alpdogan O, Gençcelep M. Determination of the closure time of growth plates of tibia-fibula in colored mohair goat's kids by radiography. *Asian J Anim Vet Adv* 2012;7:860–7.
- [135] Michelena P, Henric K, Angibault J-M, Gautrais J, Lapeyronie P, Porter RH, et al. An experimental study of social attraction and spacing between the sexes in sheep. *J Exp Biol* 2005;208:4419–26.
- [136] Codinach i Creus M. Reparació prenatal del mielomeningocele mitjançant cèl·lules mesenquimals estromals de líquid amniòtic en model oví. *Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona*, 2015.
- [137] Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: A Free Software Tool for Multimodality Medical Image Analysis. *Mol Imaging* 2003;2:131–7.
- [138] Nazarian A, Snyder BD, Zurakowski D, Müller R. Quantitative micro-computed tomography: A non-invasive method to assess equivalent bone mineral density. *Bone* 2008;43:302–11.
- [139] Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascão R, et al. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port* 2012;37:294–300.
- [140] Simank HG, Manggold J, Sebald W, Ries R, Richter W, Ewerbeck V, et al. Bone morphogenetic protein-2 and growth and differentiation factor-5 enhance the healing of necrotic bone in a sheep model. *Growth Factors* 2001;19:247–57.
- [141] O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A*, vol. 90, 2008, p. 79–84.
- [142] Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 2015;70:73–86.
- [143] Hernandez-Fernandez A, Vélez R, Soldado F, Saenz-Ríos JC, Barber I, Aguirre-Canyadell M. Effect of administration of platelet-rich plasma in early phases of distraction osteogenesis: An experimental study in an ovine femur model. *Injury* 2013;44:901–7.
- [144] Prat S, Gallardo-Villares S, Vives M, Carreño A, Caminal M, Oliver-Vila I, et al. Clinical translation of a mesenchymal stromal cell-based therapy developed in a large animal model and two case studies of the treatment of atrophic pseudoarthrosis. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12:e532–40.
- [145] Vivas D, Caminal M, Oliver-Vila I, Vives J. Derivation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Ovine Bone Marrow. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2018;44:2B.9.1-2B.9.22.
- [146] Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo. *Cryobiology* 2009;59:229–43.
- [147] Reed KL, Conzemius MG, Robinson RA, Brown TD. Osteocyte-based image analysis for quantitation of histologically apparent femoral head osteonecrosis: Application to an emu model. *Comput Methods Biomech Biomed Eng* 2004;7:25–32.

- [148] Jin H, Xia B, Yu N, He B, Shen Y, Xiao L, et al. The effects of autologous bone marrow mesenchymal stem cell arterial perfusion on vascular repair and angiogenesis in osteonecrosis of the femoral head in dogs. *Int Orthop* 2012;36:2589–96.
- [149] Daltro GC, Fortuna V, de Souza ES, Salles MM, Carreira AC, Meyer R, et al. Efficacy of autologous stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head in sickle cell disease: a five-year follow-up study. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:110.
- [150] Mccarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK, Xian CJ. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2009;219:324–33.
- [151] Sanjurjo-Rodríguez C, Castro-Viñuelas R, Hermida-Gómez T, Fernández-Vázquez T, Fuentes-Boquete IM, De Toro-Santos FJ, et al. Ovine mesenchymal stromal cells: Morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering. *PLoS One* 2017;12:e0171231.
- [152] Khan MR, Chandrashekrana A, Smith R KW, Dudhia J. Immunophenotypic characterization of ovine mesenchymal stem cells. *Cytom Part A* 2016;89:443–50.
- [153] Rentsch C, Hess R, Rentsch B, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D, et al. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010;46:624–34.
- [154] Zannettino ACW, Paton S, Itescu S, Gronthos S. Comparative Assessment of the Osteoconductive Properties of Different Biomaterials *In Vivo* Seeded with Human or Ovine Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Tissue Eng Part A* 2010;16:3579–87.
- [155] Reichert J, Woodruff M, Friis T, Quent V, Gronthos S, Duda G, et al. Ovine bone- and marrow-derived progenitor cells and their potential for scaffold-based bone tissue engineering applications in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med* 2010;4:565–76.
- [156] Locatelli P, Olea FD, Hnatiuk A, Sepúlveda D, Sáez JMP, Argüello R, et al. Efficient plasmid-mediated gene transfection of ovine bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2013;15:163–70.
- [157] Adamczyk C, Emonds T, Falkenstein J, Tolba R, Jahnen-Dechent W, Lethaus B, et al. Different culture media affect proliferation, surface epitope expression, and differentiation of ovine MSC. *Stem Cells Int* 2013;2013:387324.
- [158] Czernik M, Fidanza A, Sardi M, Galli C, Brunetti D, Malatesta D, et al. Differentiation potential and GFP labeling of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2013;114:134–43.
- [159] Godoy RF, Alves ALG, Gibson AJ, Lima EMM, Goodship AE. Do progenitor cells from different tissue have the same phenotype? *Res Vet Sci* 2014;96:454–9.
- [160] Desantis S, Accogli G, Zizza S, Mastrodonato M, Blasi A, Francioso E, et al. Ultrastructural study of cultured ovine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Ann Anat* 2015;201:43–9.
- [161] Mrugala D, Bony C, Neves N, Caillot L, Fabre S, Moukoko D, et al. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: Application to a cartilage defect model. *Ann Rheum Dis* 2008;67:288–95.
- [162] Kalaszczynska I, Ruminski S, Platek AE, Bissenik I, Zakrzewski P, Noszczyk M, et al. Substantial differences between human and ovine mesenchymal stem cells in response to osteogenic media: how to explain and how to manage? *Biores Open Access* 2013;2:356–63.
- [163] Liu Z, Wang W, Gao J, Zhou H, Zhang Y. Isolation, culture, and induced multiple differentiation of Mongolian sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 2014;50:464–74.
- [164] Rhodes NP, Srivastava JK, Smith RF, Longinotti C. Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 15, 2004, p. 397–402.

## 7. Bibliografía

---

- [165] Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, Sanz A, Remacha AR, Bolea R, et al. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res* 2012;8:169.
- [166] Hernigou P, Homma Y, Flouzat Lachaniette CH, Poignard A, Allain J, Chevallier N, et al. Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells. *Int Orthop* 2013;37:2279–87.
- [167] Caminal M, Fonseca C, Peris D, Moll X, Rabanal RM, Barrachina J, et al. Use of a chronic model of articular cartilage and meniscal injury for the assessment of long-term effects after autologous mesenchymal stromal cell treatment in sheep. *N Biotechnol* 2014;31:492–8.
- [168] Music E, Futrega K, Doran MR. Sheep as a model for evaluating mesenchymal stem/stromal cell (MSC)-based chondral defect repair. *Osteoarthr Cartil* 2018;26:730–40.
- [169] Fekete N, Rojewski MT, Fürst D, Kreja L, Ignatius A, Dausend J, et al. GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PLoS One* 2012;7:e43255.
- [170] Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: Implications for cell therapy. *J Cell Biochem* 2012;113:2806–12.
- [171] Aarvold A, Smith JO, Tayton ER, Jones AMH, Dawson JI, Lanham S, et al. From bench to clinic and back: Skeletal stem cells and impaction bone grafting for regeneration of bone defects. *J Tissue Eng Regen Med* 2014;8:779–86.
- [172] Peng J, Wen C, Wang A, Wang Y, Xu W, Zhao B, et al. Micro-CT-based bone ceramic scaffolding and its performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load-bearing bone defect in canine femoral head. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2011;96 B:316–25.
- [173] Buizer AT, Veldhuizen AG, Bulstra SK, Kuijer R. Static versus vacuum cell seeding on high and low porosity ceramic scaffolds. *J Biomater Appl* 2014;29:3–13.
- [174] Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* 2018;22:824–33.
- [175] Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 2001;51:292–9.
- [176] Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Christou C, Walsh WR. A Sheep Model for Cancellous Bone Healing. *Front Surg* 2014;1:37.
- [177] Lammens J, Maréchal M, Geris L, Van der Aa J, Van Hauwermeiren H, Luyten FP, et al. Warning About the Use of Critical-Size Defects for the Translational Study of Bone Repair: Analysis of a Sheep Tibial Model. *Tissue Eng Part C Methods* 2017;23:ten.tec.2017.0147.
- [178] Jones ML, Allison RW. Evaluation of the Ruminant Complete Blood Cell Count. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 2007;23:377–402.
- [179] Lohfeld S, Cahill S, Barron V, McHugh P, Dürselen L, Kreja L, et al. Fabrication, mechanical and in vivo performance of polycaprolactone/tricalcium phosphate composite scaffolds. *Acta Biomater* 2012;8:3446–56.
- [180] Field JR, McGee M, Stanley R, Ruthenbeck G, Papadimitrakis T, Zannettino A, et al. The efficacy of allogeneic mesenchymal precursor cells for the repair of an ovine tibial segmental defect. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2011;24:113–21.
- [181] Huang S, Xu L, Zhang Y, Sun Y, Li G. Systemic and local administration of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells promotes fracture healing in rats. *Cell Transplant* 2015;24:1–33.
- [182] Bobi J, Solanes N, Fernández-Jiménez R, Galán-Arriola C, Dantas AP, Fernández-Friera L, et al. Intracoronary administration of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improves myocardial perfusion but not left ventricle function, in a translational model of acute myocardial infarction. *J Am Heart Assoc* 2017;6:e005771.

- [183] Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther* 2012;3:25.
- [184] Guldberg RE, Duvall CL, Peister A, Oest ME, Lin ASP, Palmer AW, et al. 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials. *Biomaterials* 2008;29:3757–61.
- [185] Liebschner MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* 2004;25:1697–714.
- [186] Qiang Y, Yanhong Z, Jiang P, Shibi L, Quanyi G, Xinlong M, et al. Xenotransplantation of an extracellular-matrix-derived, biphasic, cell-scaffold construct for repairing a large femoral-head high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. *Sci World J* 2014;2014:127084.
- [187] Coathup MJ, Kalia P, Konan S, Mirza K, Blunn GW. A comparison of allogeneic and autologous mesenchymal stromal cells and osteoprogenitor cells in augmenting bone formation around massive bone tumor prostheses. *J Biomed Mater Res - Part A* 2013;101 A:2210–8.
- [188] Saether EE, Chamberlain CS, Leiferman EM, Kondratko-Mittnacht JR, Li WJ, Brickson SL, et al. Enhanced Medial Collateral Ligament Healing Using Mesenchymal Stem Cells: Dosage Effects on Cellular Response and Cytokine Profile. *Stem Cell Rev Reports* 2014;10:86–96.
- [189] Rigol M, Solanes N, Roura S, Roqué M, Novensà L, Dantas AP, et al. Allogeneic adipose stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2014;44:83–92.
- [190] Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: Hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2010;28:1446–55.
- [191] Zimmermann G, Henle P, Küsswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A, Richter W, et al. TGF- $\beta$ 1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 2005;36:779–85.
- [192] Hara Y, Ghazizadeh M, Shimizu H, Matsumoto H, Saito N, Yagi T, et al. Delayed Expression of Circulating TGF- $\beta$ 1 and BMP-2 Levels in Human Nonunion Long Bone Fracture Healing. *J Nippon Med Sch* 2017;84:12–8.
- [193] Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 2009;30:2149–63.
- [194] Vives J, Mirabel C. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells From Bone Marrow for Current and Potential Clinical Applications. *Ref. Modul. Biomed. Sci., Elsevier*; 2018.
- [195] Lohan P, Coleman CM, Murphy JM, Griffin MD, Ritter T, Ryan AE. Changes in immunological profile of allogeneic mesenchymal stem cells after differentiation: Should we be concerned? *Stem Cell Res Ther* 2014;5:99.



