



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Trasplante de Células Mesenquimales Fucosiladas
en el Tratamiento de la Osteoporosis.
Estudio Preclínico y Prueba de Concepto**

**D. Valentín Cabañas Perianes
2014**



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

***TRASPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES FUCOSILADAS
EN EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS.
ESTUDIO PRECLÍNICO Y PRUEBA DE CONCEPTO.***

Doctorando: Valentín Cabañas Perianes

Director: Dr. José María Moraleda Jiménez.

Codirectores: Dra. Ana María García Hernández.

Dr. Joaquín Gómez Espuch.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que componen el Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca por todo lo que me han ayudado tanto en mi desarrollo profesional como humanístico.

También quisiera mencionar aquí al Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca y a todas las personas del Centro de Investigación del Cáncer en Salamanca, ya que sin la base que aprendí durante mi corta estancia allí hubiera sido impensable abarcar este proyecto.

Gracias a todos los que han contribuido de forma imprescindible a realizar este proyecto: David, Cira, Mar, Carmen, María del Mar, Carlos y especialmente a María Dolores López Lucas por enseñarme paso a paso un mundo diferente al que había realizado antes, destacando su gran paciencia, esfuerzo y solidaridad en todos los momentos.

Agradecer al Dr. Joaquín Gómez Espuch su ayuda y visión en todas las reuniones de nuestro equipo para poder mejorar y optimizar todos y cada uno de los pasos que hemos dado.

A mi directora D^a. Ana María García Hernández solamente quiero decirle es que desde siempre ha sido un espejo brillante en el que me miro, para mejorar día a día, intentando aprender de su gran profesionalidad encarnada en una gran cantidad de valores que no caben en estas líneas (responsabilidad, inteligencia, competencia...) sin dejar nunca de apoyarme en ningún momento.

A la Dra. María Juliana Majado por hacerme ver todo lo que una persona puede dar con esfuerzo, haciendo las cosas con rigor científico y constancia.

Antes de hablar de mi dedicatoria personal, quisiera agradecer al Dr. José María Moraleda Jiménez todo lo que me ha enseñado desde estudiante en la Universidad de Murcia y que sigue enseñándome en el día a día. Gracias a él doy todo lo que tengo en todas las actividades que realizó día tras día con la ilusión de que una persona durante su corta estancia en este mundo puede intentar dejar algo bueno para la Humanidad. Con ese objetivo me ilusionó cada mañana.

Gracias a ti Carmen Muñoz, porque me haces mejor persona cada día que estoy a tu lado y sabes que me haces inmensamente feliz día tras día.

Por último agradecer a mi familia que me ha ayudado en todo desde que nací y muy especialmente a la persona que más he querido en este mundo, mi madre. Por tres meses no consiguió uno de sus sueños, ver a su hijo graduarse. Todo lo bueno que hice, hago y haré se lo debo a ella y yo sé que en algún lugar ella sonríe al ver a su “pequeño del alma” ir creciendo en la vida.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.	Pág. 9
INTRODUCCIÓN.	Pág. 12
1. DEFINICIÓN DE OSTEOPOROSIS.	Pág. 13
2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS.	Pág. 14
3. ETIOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS.	Pág. 18
3.1. Genética, sexo y osteoporosis.	Pág. 19
3.2. Edad y osteoporosis.	Pág. 20
3.3. Dieta: calcio y vitamina D. Otras vitaminas (K y C).	Pág. 21
3.4. Cafeína y osteoporosis.	Pág. 22
3.5. Hábitos tóxicos: tabaco y alcohol.	Pág. 23
3.6. Estilo de vida: sedentarismo.	Pág. 23
3.7. Índice de masa corporal y osteoporosis.	Pág. 23
4. FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS	Pág. 24
4.1. Fisiología del tejido óseo.	Pág. 24
4.2. Metabolismo óseo.	Pág. 25
4.3. Remodelado óseo.	Pág. 30
4.4. Patogenia de la osteoporosis.	Pág. 32
4.4.1. Osteoporosis senil.	Pág. 33
4.4.2. Osteoporosis postmenopáusica.	Pág. 33
4.4.3. Osteoporosis secundaria a fármacos.	Pág. 33
5. DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS.	Pág. 34
5.1. Historia clínica.	Pág. 34
5.2. Criterio diagnóstico de la Organización Mundial de la Salud (OMS).	Pág. 34
5.3. Evaluación de la densidad mineral ósea (DMO) mediante pruebas radiológicas.	Pág. 36
5.3.1. Evaluación de la DMO mediante Tomografía Computarizada cuantitativa (QTC).	Pág. 37
5.3.2. Evaluación de la DMO mediante ultrasonidos.	Pág. 37
5.3.3. Evaluación de la DMO mediante absorciometría radiográfica de doble energía o densitometría ósea (DXA).	Pág. 37
5.3.3.1. Cribado poblacional mediante DXA.	Pág. 41
5.3.3.2. Seguimiento mediante DXA.	Pág. 42
5.3.4. Radiología convencional.	Pág. 42
5.4. Parámetros de laboratorio y marcadores óseos.	Pág. 42
5.5. Fracture risk assessment tool (FRAX®).	Pág. 44
6. TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS.	Pág. 50
6.1. Estrategias preventivas y medidas no farmacológicas.	Pág. 50
6.1.1. Ejercicio físico y prevención de las caídas.	Pág. 50
6.1.2. Nutrición.	Pág. 50
6.1.3. Suplementos de calcio y vitamina D.	Pág. 51
6.2. Tratamiento farmacológico.	Pág. 51
6.2.1. Fármacos antirresortivos o anticatabólicos.	Pág. 52
6.2.1.1. Bifosfonatos.	Pág. 52

6.2.1.2. Moduladores Selectivos de los receptores de estrógenos (MSRE).	Pág. 55
6.2.2. Fármacos anabólicos.	Pág. 57
6.2.2.1. Análogos de la paratohormona (PTH).	Pág. 57
6.2.3. Fármacos de acción mixta.	Pág. 58
6.2.3.1. Ranelato de estroncio (rSr).	Pág. 58
6.2.4. Fármacos en fase de desarrollo.	Pág. 60
6.2.5. Selección del fármaco antiosteoporótico.	Pág. 60
6.2.6. Valoración de la respuesta y duración del tratamiento farmacológico.	Pág. 61
6.3. Tratamiento de las fracturas vertebrales. Técnicas de refuerzo vertebral (TRV): Vertebroplastia percutánea (VP) y Cifoplastia (CP).	Pág. 61
6.4. Tratamiento de la osteoporosis en poblaciones especiales.	Pág. 62
6.4.1. Osteoporosis en el varón.	Pág. 62
6.4.2. Osteoporosis premenopáusica.	Pág. 63
6.4.3. Osteoporosis inducida por glucocorticoides.	Pág. 63
7. Terapia celular en osteoporosis.	Pág. 64
7.1. Células Stem Mesenquimales	Pág. 64
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	Pág. 71
1. Hipótesis de trabajo.	Pág. 72
2. Objetivos.	Pág. 73
MATERIAL Y MÉTODOS	Pág. 74
1. OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.	Pág. 75
1.1. Selección de donantes. Consentimiento informado.	Pág. 75
1.2. Obtención de médula ósea humana.	Pág. 75
1.3. Aislamiento y cultivo primario de células mononucleadas de médula ósea humana.	Pág. 75
1.4. Protocolo de expansión de Células Stem Mesenquimales de médula ósea humana.	Pág. 76
2. TIPIFICACIÓN DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA. ETAPA PRE-FUCOSILACIÓN.	Pág. 77
2.1. Análisis morfológico.	Pág. 77
2.2. Análisis inmunofenotípico.	Pág. 77
2.3. Ensayos de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.	Pág. 78
2.3.1. Diferenciación osteogénica.	Pág. 78
2.3.2. Diferenciación adipogénica.	Pág. 78
2.3.3. Diferenciación condrogénica.	Pág. 79
2.4. Estudio de estabilidad cromosómica. Cariotipo.	Pág. 79
3. FUCOSILACIÓN DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.	Pág. 80
4. TIPIFICACIÓN DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA. ETAPA POST-FUCOSILACIÓN.	Pág. 80

5. MODELO ANIMAL.	Pág. 81
5.1. Instalaciones físicas. Condiciones de mantenimiento de los animales.	Pág. 81
5.2. Características del modelo animal: ratones NOD/SCID.	Pág. 82
6. DISEÑO DEL ESTUDIO. TAMAÑO MUESTRAL.	Pág. 83
7. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.	Pág. 88
7.1. Recepción e identificación de los ratones NOD/SCID.	Pág. 88
7.2. Hoja evolutiva de ratones NOD/SCID.	Pág. 89
7.3. Administración intravenosa en modelo murino NOD/SCID.	Pág. 96
7.3.1. Determinación de dosis final de producto a infundir.	Pág. 96
7.3.2. Preparación y protocolo de administración intravenosa.	Pág. 96
7.4. Protocolo de sacrificio de ratones NOD/SCID.	Pág. 99
7.5. Protocolo de necropsia reglada en ratones NOD/SCID.	Pág. 100
7.6. Evaluación de toxicidad aguda.	Pág. 106
7.6.1. Score clínico.	Pág. 106
7.6.2. Peso.	Pág. 108
7.6.3. Hemograma y bioquímica.	Pág. 109
7.6.4. Histología de órganos. Tinción de hematoxilina-eosina.	Pág. 111
7.7. Evaluación de toxicidad crónica.	Pág. 111
7.8. Evaluación de eficacia. Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-osteocalcina humana.	Pág. 111
7.9. Estudio de biodistribución. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (qRT-PCR).	Pág. 112
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	Pág. 115
RESULTADOS	Pág. 116
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS DONANTES.	Pág. 117
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.	Pág. 117
2.1. Análisis morfológico. Viabilidad pre y post-fucosilación.	Pág. 117
2.2. Citometría de flujo de Células Stem Mesenquimales (CSM).	Pág. 118
2.2.1. Pre-fucosilación.	Pág. 118
2.2.2. Post-fucosilación.	Pág. 126
2.3. Resultados de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica pre y post-fucosilación.	Pág. 136
2.4. Estudio de estabilidad cromosómica. Cariotipo.	Pág. 138
3. ASIGNACIÓN DE RAMA A LOS RATONES NOD/SCID.	Pág. 139
4. EVALUACIÓN CLÍNICA PRE-FUCOSILACIÓN.	Pág. 140
4.1. Score de bienestar animal.	Pág. 140
4.2. Peso.	Pág. 140
5. INFUSIÓN DEL PRODUCTO.	Pág. 141
6. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA.	Pág. 141
6.1. Score de bienestar animal.	Pág. 141
6.2. Peso	Pág. 142

6.3. Parámetros hemáticos.	Pág. 147
6.4. Parámetros bioquímicos.	Pág. 148
6.5. Histología en ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas sacrificados en el 1º y 2º día postinfusión.	Pág. 149
7. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD CRÓNICA.	Pág. 149
7.1. Score de bienestar animal.	Pág. 149
7.2. Peso.	Pág. 151
7.3. Parámetros hemáticos.	Pág. 155
7.4. Parámetros bioquímicos.	Pág. 156
7.5. Histología.	Pág. 158
7.5.1. Corazón.	Pág. 159
7.5.2. Pulmón.	Pág. 160
7.5.3. Hígado.	Pág. 162
7.5.4. Bazo.	Pág. 162
7.5.5. Riñón.	Pág. 163
7.5.6. Gónadas.	Pág. 164
7.5.7. Cerebro.	Pág. 164
7.5.8. Médula ósea.	Pág. 165
7.5.9. Hueso.	Pág. 165
8. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DEL XENOTRASPLANTE: INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ANTI-OSTEOCALCINA HUMANA.	Pág. 166
8.1. Análisis cualitativo de osteoblastos humanos en hueso murino mediante positividad inmunohistoquímica para osteocalcina humana.	Pág. 166
8.2. Análisis cuantitativo de osteoblastos humanos en hueso murino mediante positividad inmunohistoquímica para osteocalcina humana.	Pág. 171
8.2.1. Análisis de eficacia estratificado por sexo y localización ósea.	Pág. 176
8.2.2. Análisis de eficacia estratificado por semanas.	Pág. 177
9. RESULTADOS DE BIODISTRIBUCIÓN. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA POR RETROTRANSCRIPCIÓN (qRT-PCR).	Pág. 182
9.2.1. qRT-PCR Beta-actina murina.	Pág. 182
9.2.2. qRT-PCR Beta-2-microglobulina murina.	Pág. 183
9.2.3. qRT-PCR Beta-actina humana.	Pág. 184
9.2.4. qRT-PCR Beta-2-microglobulina humana.	Pág. 185
DISCUSIÓN	Pág. 187
1. OBJETIVO PRINCIPAL: ESTUDIAR LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA INFUSIÓN INTRAVENOSA DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA FUCOSILADAS EN UN MODELO MURINO NOD/SCID.	Pág. 188
1.1. Objetivo específico número 1: Caracterización morfológica, citométrica y funcional de CSM de médula ósea humana antes y después del proceso de fucosilación in vitro.	Pág. 188
1.2. Objetivo específico número 2: Estudiar la seguridad de la infusión intravenosa de CSM de médula ósea humana fucosiladas en el modelo murino NOD/SCID.	Pág. 189
1.3. Objetivo específico número 3: Estudiar la eficacia de la infusión intravenosa de CSM de médula ósea humana fucosiladas en el modelo murino.	Pág. 203

1.4. Objetivo específico número 4: Estudiar la biodistribución de CSM de médula ósea humana fucosiladas en el modelo murino NOD/SCID mediante reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (qRT-PCR).	Pág. 206
CONCLUSIONES	Pág. 209
REFERENCIAS	Pág. 211
ANEXOS	Pág. 242
Anexo I. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN	Pág. 243
Anexo II. DICTAMEN FAVORABLE DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEEa) DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA.	Pág. 246
Anexo III. PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO PARA LA FASE DE RECEPCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS RATONES AL ANIMALARIO.	Pág. 247
Anexo IV. FICHA IDENTIFICATIVA DE RATONES NOD/SCID.	Pág. 250
Anexo V. PROTOCOLO DE INFUSIÓN DE PRODUCTO EN RATONES NOD/SCID.	Pág. 253
Anexo VI. PROTOCOLO DE SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE RATONES NOD/SCID.	Pág. 255
Anexo VII. SOLICITUD DE ESTUDIOS AL BIOBANCO EN RED DE LA REGIÓN DE MURCIA.	Pág. 257

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

AcMo: Anticuerpo monoclonal.

ADNc: ADN complementario.

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y los productos Sanitarios.

AlotPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Biobanc-Mur: Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

BMD: Bone Mineral Density.

BUA: Broad-band ultrasound attenuation.

CEEA: Comité Ético de Experimentación Animal.

CEIB: Centro de Experimentación e Investigación Biosanitaria.

CHMP: Comité de Medicamentos de Uso Humano.

CMH: Célula Madre hematopoyética.

Cód: Código.

CP: Cifoplastia.

CPA: Célula presentadora de antígeno.

CSH: Células Stem Hematopoyéticas.

CSIC: Centro Superior de Investigaciones Científicas.

CSM: Células Stem Mesenquimales.

CSM-f: Células Stem Mesenquimales fucosiladas.

CT: Crossing threshold.

CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4.

C-TX: Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I.

DE: Desviación estándar.

DMO: Densidad mineral ósea.

DRESS: Drugs Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms.

DXA: Densitometría ósea.

EECC: Ensayos clínicos.

EVOS: European Vertebral Osteoporotic Study.

FATR: Fosfatasa ácida tartrato-resistente.

FRAVO: Fractura vertebral osteoporótica y factores de riesgo asociados de Valencia.

FRAX: Fracture Risk Assessment Tool.

FTVI: Fucosiltransferasa VI.

FTVII: Fucosiltransferasa VII.

GC: Glucocorticoides.

GM- CSF: Factor estimulante de colonias granulomacrofágicas.

GPS: Glycotransferase-Programmed Stereosubstitution of cell surface glycans.

GR: Grado de recomendación.

HAD: Herencia autosómica dominante.

Hb: Hemoglobina.

HCELL: Hematopoietic cell E and L-selectin ligand.

IC: Intervalo de confianza.

ICS: Inmunodeficiencia combinada severa.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IMC: Índice de masa corporal.

ISCT: Sociedad Internacional para Terapia Celular.

MO: Médula ósea.

MSC: Mesenchymal Stem Cell.

MSRE: Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos.

M-CSF: Factor estimulador de colonias macrofágicas.

NCI: National Cancer Institute.

NE: Nivel de evidencia.

NK: Natural Killer.

NNT: Número de sujetos a tratar.

NOD/SCID: Non-obese diabetic and severe combined immunodeficiency.

N-TX: Telopéptido aminoterminal del colágeno tipo I.

OI: Osteogénesis imperfecta.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONM: Osteonecrosis mandibular.

OP: Osteoporosis.

OPG: Osteoprotegerina.

PMMA: Polimetilmetacrilato.

PRAC: Comité para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia europeo.

PTH: Paratohormona.

qRT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por retrotranscripción.

QTC: Tomografía computarizada cuantitativa.

RANKL: RANK ligando.

RIC: Rango intercuartílico.

RM: Resonancia magnética.

rPTH: Hormona paratiroidea humana recombinante 1-84.

rSr: Ranelato de estroncio.

RVD: Receptor de la vitamina D.

SDF-1: Stromal derivated-factor 1.

sLea: Forma sializada del tetrasacárido Lewis a.

sLex: Forma sializada del tetrasacárido Lewis x.

SOS: Speed of sound.

SPF: Libre de patógenos específicos.

SSF: Suero salino fisiológico.

TBS: Trabecular bone score.

TE-TEP: Terapia con estrógenos-terapia con estrógenos /progestágenos.

THS: Terapia hormonal sustitutiva.

TRV: Técnicas de refuerzo vertebral.

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1.

VFA: Vertebral Fracture Assessment.

VLA-4: Very Late Antigen 4.

VP: Vertebroplastia percutánea.

INTRODUCCIÓN

1.- DEFINICIÓN DE OSTEOPOROSIS.

La osteoporosis es una enfermedad metabólica ósea que se define por un descenso en la resistencia del hueso, predisponiendo al aumento de fracturas con un nivel de evidencia (NE) 5 y un grado de recomendación (GR) D según el consenso del *National Institute of Health* de acuerdo aplicando el modelo del *Center for Evidence Based Medicine de Oxford*. La resistencia ósea hace referencia tanto a la calidad ósea (incluye parámetros como la arquitectura, mineralización, microlesiones y el “turnover” o recambio óseo) como a la densidad mineral ósea (DMO) determinada por el valor máximo de masa ósea y la cantidad perdida de la misma (1-3).

La correcta integridad del hueso depende también de otras características como la correcta estructura del colágeno o el tamaño de los cristales de la apatita. La mayoría de estas propiedades óseas citadas tiene escasa aplicación clínica dada la elevada complejidad o imposibilidad que supone su determinación. De todos estos parámetros emergió la DMO, fácilmente cuantificable por *absorciometría radiográfica de doble energía* o densitometría ósea (DXA) (3). La DMO expresada en gramos de mineral por área de volumen, se convirtió de esta forma en el criterio diagnóstico esencial de osteoporosis con un valor fundamental en el seguimiento y respuesta a tratamiento en los pacientes con osteoporosis (1;4).

Para poder definir evaluar la DMO entre individuos surgió el *T-score*, valor que expresa en unidades de desviación estándar (DE) la variación de la DMO de una persona medida por DXA con respecto a la media de la población joven del mismo sexo. De esta forma, el diagnóstico de osteoporosis se basó en los criterios densitométricos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1994 para mujeres postmenopáusicas de raza blanca, definiéndose como aquella persona que presentara un *T-score* inferior a -2,5 DE en columna lumbar y cuello femoral con respecto a la a la población joven del mismo sexo (5). Como veremos más adelante en el apartado de diagnóstico este score no es perfectamente aplicable en todos los sectores poblaciones por lo que surgieron otros parámetros como el *Z-score*, ajustado por edad(3;6).

La fractura osteoporótica, principal complicación de la osteoporosis, se define como aquella que se produce por un traumatismo de baja energía, como las que se producen cuando el individuo se precipita estando en bipedestación o sentado, siendo por tanto un impacto de baja energía cinética o mecánica aumentada. No serán consideradas fracturas osteoporóticas aquellas desencadenadas por traumatismos de alta energía, como en los accidentes o en el deporte, donde existe una elevada energía cinética (3).

2.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS.

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente y una de las principales causas de morbilidad en los países desarrollados. Desde 1983 se conocen datos de fracturas asociadas a esta enfermedad sistémica, reportándose el aumento de prevalencia relacionado con la edad desde un 4% de fracturas de cadera en mujeres en la sexta década de la vida hasta un 40% al final de la octava década.

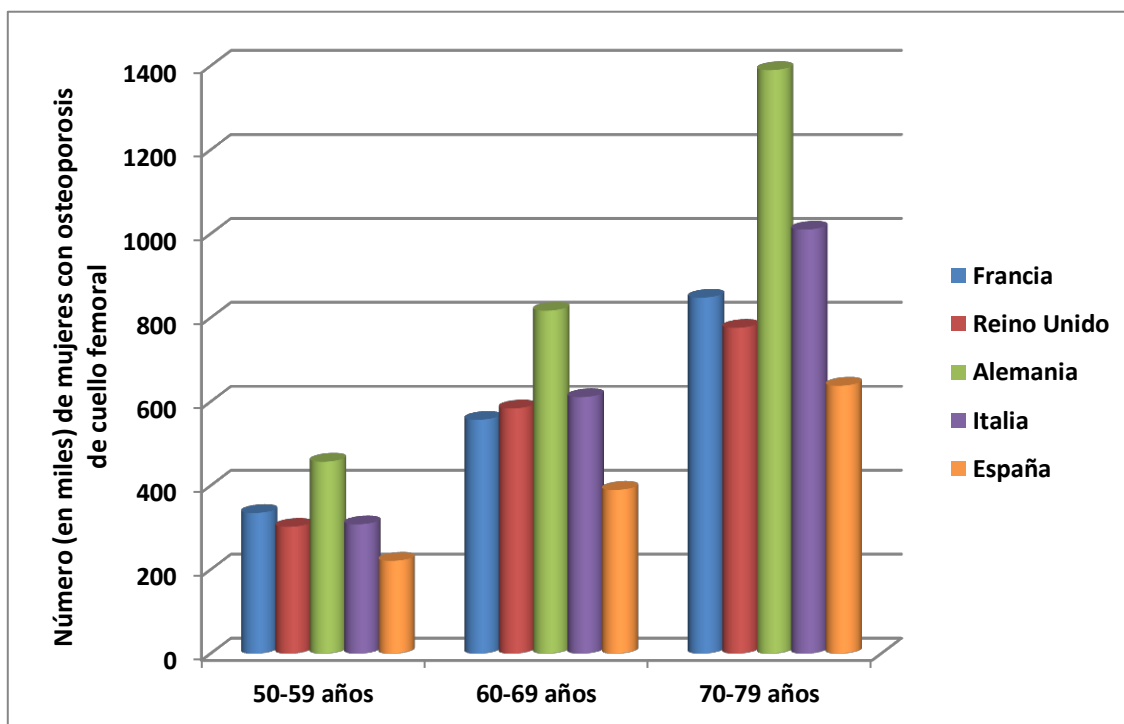
Se espera un aumento de las fracturas de cadera en mujeres entre 7,8 y 10,5 millones y en hombres entre 2,3 y 3,3 millones para el año 2020. En la actualidad afecta a unos 300 millones de personas en todo el mundo, y se estima que en 2050, afectará a más de mil millones de personas, causando un importante impacto sanitario a nivel mundial. Según datos del último estudio epidemiológico realizado en nuestro país, hay en torno a 3 millones de pacientes afectados de osteoporosis sobre una población de 40 millones de habitantes (7;8).

Durante el año 2000 en Europa, se estimó en personas mayores de 50 años una incidencia anual de más de 600.000 nuevas fracturas de cadera y otras tantas vertebrales, así como más de medio millón localizadas en antebrazo y unas 250.000 en húmero proximal, lo que representaba el 34,8% de las fracturas producidas en el mundo (9). La prevalencia de osteoporosis en mujeres de países de la Unión Europea con alta población (Francia, Reino Unido, Alemania, Italia y España), siguiendo los criterios de la OMS se sitúa en 12 millones, lo que representa el 21% de las mujeres comprendidas entre los 50 y los 84 años (tabla 1) (10-12). En el gráfico 1 representamos el aumento de incidencia en función de la década de la vida y las variaciones entre los distintos países.

Tabla 1. Número (en miles) de mujeres por rango de edad con osteoporosis de cuello femoral en 5 países de la Unión Europea. Modificado de Strom O et al (11).

Grupo de edad (años)	Francia	Reino Unido	Alemania	Italia	España
50-54	135	127	192	128	95
55-59	200	175	265	180	126
60-64	286	276	328	276	175
65-69	271	308	489	335	215
70-74	364	365	718	464	270
75-79	484	411	672	546	368
80-84	526	417	686	558	357
50-84	2266	2079	3350	2487	1606

Gráfico 1. Número (en miles) de mujeres con osteoporosis de cuello femoral en función de la edad.
Datos de 5 países de la Unión Europea



En España se desconoce cuál es la verdadera magnitud de este problema, aunque sí se disponen de algunos datos derivados del estudio de la normalidad de la masa ósea, mediante densitometría ósea realizado en la población española y finalizado en 1987. La prevalencia de osteoporosis en las mujeres a nivel de columna lumbar o de cuello femoral fue del 12,7%, lo que representa casi dos millones de mujeres afectas de este trastorno metabólico (2.7% del total poblacional). En mujeres mayores de 50 años la prevalencia aumentaba hasta un 22.8% en columna lumbar (13;14).

Estudios de prevalencia más recientes realizados en determinadas áreas o regiones de España, como por ejemplo en Cataluña sitúan la prevalencia de osteopenia y osteoporosis en columna lumbar en un 42% y un 24% respectivamente, mientras que en cadera la osteopenia fue del 40% y la de osteoporosis algo menor. Al considerar el descenso de masa ósea global (al menos dos localizaciones) la cifra de osteopenia se situó en un 52% y la de osteoporosis del 26%, cifras similares a las observadas por Díaz-Curiel et al (14;15).

Debido a la variabilidad geográfica observada en la incidencia de fracturas osteoporóticas observadas en los diferentes continentes (menor incidencia en el Sur de Europa) e incluso en el mismo país, encontrando diferencias por ejemplo entre Cataluña y el área de Valencia (región cercana a la nuestra) se realizó el estudio de prevalencia FRAVO (*Fractura vertebral osteoporótica y factores de riesgo asociados en Valencia*). En el FRAVO se incluyó una muestra aleatorizada de 823 mujeres postmenopáusicas mayores de 50 años obteniendo unas cifras de prevalencia del 31,8% y del 50,2% en osteoporosis y osteopenia respectivamente. La distribución de osteoporosis y osteopenia tanto generalizada, como a nivel de columna lumbar como de cuello femoral son mostradas en la tabla 2 (16).

Tabla 2. Prevalencia de mujeres con baja masa ósea en columna lumbar y cuello femoral y distribución por edades (estudio FRAVO). Modificado de Sanfelix-Genovés J et al (16).

Grupo edad	n	Columna lumbar		Cuello femoral		Generalizada*	
		osteoporosis		osteoporosis		osteoporosis	
		%	95%IC	%	95%IC	%	95%IC
50-54	111	15.5	8.6-22.2	1.8	0.0-4.3	16.2	9.3-23.1
55-59	156	15.5	9.8-21.2	5.8	2.1-9.4	18.6	12.4-24.8
60-64	173	18.5	12.7-24.3	6.9	3.1-10.7	22.5	16.3-28.8
65-69	170	28.2	21.4-35.0	10.1	5.5-14.6	32.4	25.2-39.4
70-74	144	37.8	28.8-45.7	15.4	9.4-21.3	39.9	31.8-47.9
≥75	69	39.1	27.5-50.7	34.8	23.4-46.1	49.3	37.4-61.2
Total	823	27.0	23.1-30.8	15.1	11.7-18.5	31.8	27.8-35.7

95%IC: intervalo de confianza del 95%

*Generalizada: en alguna de las dos localizaciones.

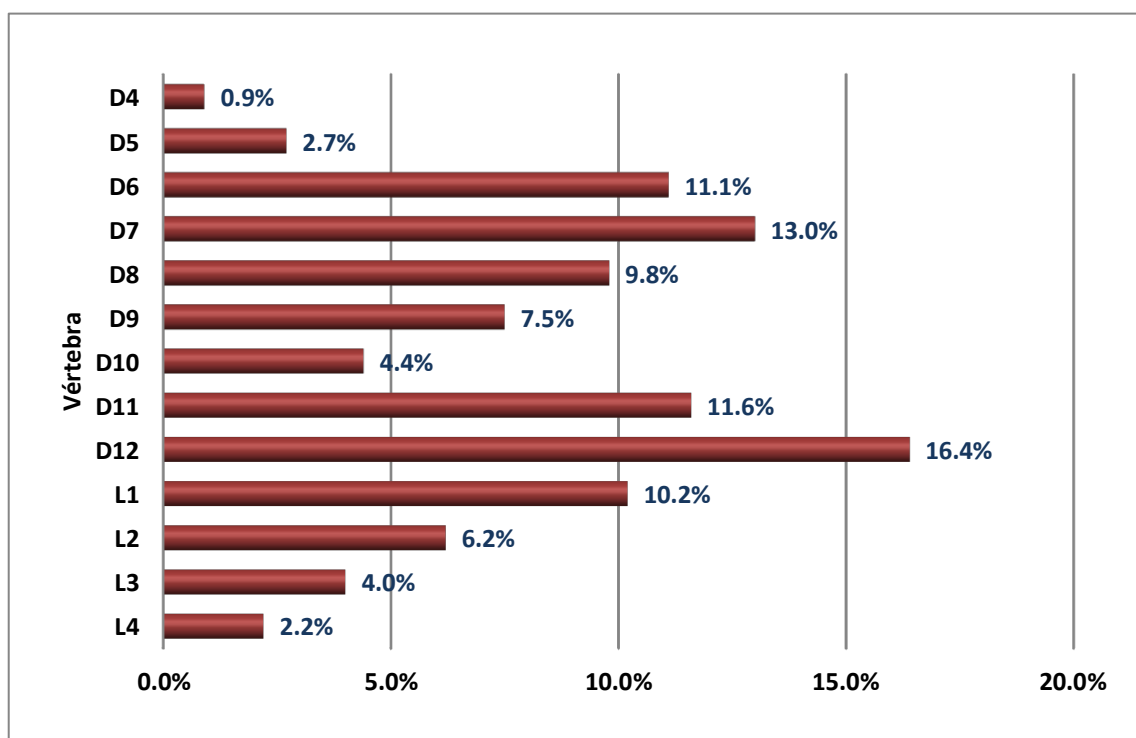
Las fracturas estimadas en ese estudio (17.1%) fueron algo inferiores a las descritas en el único estudio de prevalencia española publicado en el año 2000 (27.2%). La prevalencia de fracturas vertebrales del estudio FRAVO fueron similares a las observadas en el EVOS (*The European Vertebral Osteoporotic Study*) donde la prevalencia en mujeres europeas mayores de 50 años fue del 20,2%, aumentando a un 22.6% si sólo se consideraban a mujeres del área Mediterránea. La prevalencia de las mujeres españolas que participaron en el estudio FRAVO fueron del 26% en Barcelona, 23.5% en Oviedo, 22.7% en Las Palmas de Gran Canaria, mientras que solo un 14,9% en Madrid (16;17). También se han descrito diferencias en la incidencia de fracturas de cadera en distintas regiones de España, presentando una incidencia más baja Comunidades Autónomas como Galicia y las Islas Canarias y cifras más altas Cataluña (18). Debido a este hecho, se hace necesario el registro meticuloso de los pacientes con diagnóstico de osteoporosis y osteopenia. Con ello podríamos analizar posibles factores predisponentes o asociados en el momento actual y poder establecer medidas profilácticas y/o terapéuticas optimizadas (18-20).

La osteoporosis es una enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por la disminución de la masa ósea y la presencia de alteraciones en la microarquitectura del hueso, que comportan un aumento de la fragilidad ósea y ponen al paciente en una situación de riesgo de sufrir fracturas espontáneas o ante mínimos traumatismos, especialmente en aquellos huesos que soportan carga (columna vertebral, cadera, antebrazo distal y húmero proximal) aunque también pueden aparecer en cualquier estructura ósea puesto que se trata de una enfermedad sistémica (costillas, tibia...) (12;21). Se estima, que a partir de los 50 años, las mujeres de raza blanca tienen un riesgo de sufrir una fractura osteoporótica de casi el 50% durante el resto de su vida (22).

La fractura vertebral es la más frecuente y dado que en ocasiones cursa de forma asintomática, se calcula que hasta el 25% de las mujeres postmenopáusicas pueden presentar algún tipo de lesión vertebral, estando muchas de ellas sin diagnosticar (23).

No todas las vértebras presentan el mismo riesgo de fractura, como podemos observar en el estudio FRAVO, siendo la zona afectada con mayor frecuencia la situada entre la 11ª vértebra dorsal y la 1ª vértebra lumbar (38.2% con respecto al total de fracturas vertebrales), seguida de la que abarcaba entre las vértebras D6 y D8 (33.9%). La vértebra más afectada fue la D12 (16.4%) y en la que se detectó un menor número de fracturas fue la D4 (0.9%) (gráfico 2) (16). Sin embargo, son las fracturas de cadera, con una incidencia anual de 1.5 millones de personas en Estados Unidos las que producen mayor impacto clínico sobre la salud del paciente (23).

Gráfico 2. Distribución de fracturas vertebrales en función de la localización. Porcentaje respecto al total de fracturas vertebrales. Estudio FRAVO. Modificado de Sanfélix-Genovés J et al (16).



Las fracturas de cadera incrementan hasta en un 25% la mortalidad al año del incidente, y además suponen una importante sobrecarga para los sistemas de salud. Estas fracturas osteoporóticas desencadenan un fuerte impacto en la morbilidad y mortalidad en las personas que las padecen además de representar un elevado coste sanitario en todas las regiones del mundo. Así, buena parte de estas fracturas se acompañan además de largos períodos de hospitalización, alta morbilidad, disminución de calidad de vida, pérdida de jornadas de trabajo y requerimiento de apoyo institucional, etc. Costes tanto directos como indirectos, que multiplicados por una población de riesgo cada vez mayor se elevan cifras preocupantes. Se estima que menos de la mitad de los pacientes que sufren una fractura de cadera volverán a su situación anterior, el 25% necesitará cuidados en su domicilio y un 20% permanecerá en situación de dependencia continua tras la fractura (4;24).

Existe un amplio grupo poblacional asintomático con fracturas osteoporóticas, sobre todo fracturas por compresión vertebral, infradiagnosticado e infratratado, y sólo un 10-20% de los pacientes recibe un manejo adecuado de la osteoporosis en el período que abarca los 6-12 meses posteriores a la fractura osteoporótica (25-28).

Dada la elevada prevalencia de la osteoporosis, su elevada morbi-mortalidad y el alto coste económico asociado, se han realizado estudios de coste-efectividad que demuestran la ventaja de terapias intervencionistas en la reducción del número de fracturas, una mejora de la calidad de vida y un importante ahorro en el gasto sanitario (29). El coste directo de las casi tres millones de fracturas osteoporóticas producidas en Europa durante el año de 2006 fue de aproximadamente 36 billones de €, aunque las estimaciones del año 2010 indicaron que en los cinco países de la Unión Europea como son: Alemania, Reino Unido, Italia, Francia y España se alcanzaron los 29 billones de € y 38.7 billones de € si consideramos todos los países miembros de la Unión Europea (11;30;31). Este coste puede estar infraestimado puesto que muchas fracturas vertebrales no requieren hospitalización y pueden perderse costes directos derivados de las mismas (32).

La Sociedad Norteamericana de Menopausia también hace referencia en sus documentos de consenso al daño psicológico que las fracturas osteoporóticas provocan en pacientes que por otra parte tiene sus funciones cognitivas plenamente conservadas: el dolor, la pérdida de movilidad, el cambio en la autoimagen y la pérdida de independencia, pueden tener un impacto significativo en la autoestima y el carácter (33).

3.- ETIOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS.

En la osteoporosis se produce un desequilibrio ocasionado por un exceso de la reabsorción ósea que no es compensada con la formación de nuevo hueso y como resultado se produce una pérdida de masa ósea que debilita el hueso (23;34).

En la tabla 3 se exponen los factores etiológicos conocidos de la osteoporosis. Entre los distintos agentes etiológicos de la osteoporosis se encuentran la edad, bajo índice de masa corporal (IMC), antecedente familiar de fractura de cadera, antecedente personal de fractura previa (sobre todo columna vertebral, cadera, muñeca, hábitos tóxicos como tabaco o alcohol, ingesta deficitaria de calcio y vitamina D en la dieta, poca exposición a la luz solar (esencial para la formación de cantidades adecuadas de Vitamina D) y los antecedentes de enfermedades con marcado efecto osteopenizante (Mieloma Múltiple, Artritis Reumatoide, hipogonadismo no tratado...) u otras que favorezcan la inmovilidad y el sedentarismo (enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares...). También se ha implicado a la Diabetes Mellitus (tipo I y tipo II), Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, afecciones del hipertiroidismo, trastornos hematológicos como la talasemia o la anemia perniciosa y otras que se especifican en la tabla (3;6;35). También existen osteoporosis secundarias a la administración de fármacos: corticoides (dosis de prednisolona ≥ 5 mg diaria o dosis de otro corticoide equivalente durante al menos 3 meses) antiepilépticos, inmunosupresores, diuréticos, antiinflamatorios no esteroides, etc. La osteoporosis presenta por tanto una etiopatogenia multifactorial (3).

Tabla 3. Causas de osteoporosis secundaria

<u>Causas de osteoporosis secundaria</u>	
<u>Tratamientos farmacológicos o tóxicos</u>	Otras causas
Glucocorticoides	Desnutrición o malabsorción
Antiepilépticos	Anorexia nerviosa
Inhibidores de la aromatasa	Enfermedad inflamatoria intestinal
Heparina	Celiaquía
Alcohol	Resección intestinal
Análogos de la LHRH	Enfermedades inflamatorias crónicas
	Hepatopatía
<u>Enfermedades endocrinas</u>	Osteogénesis imperfecta
Hipogonadismo	Trasplante (tanto órgano sólido como médula ósea)
Hipertiroidismo	Osteoporosis idiopática
Enfermedad de Cushing	Osteoporosis asociada al embarazo
Déficit de hormona de crecimiento	Mastocitosis sistémica
Panhipopituitarismo	
Hiperparatiroidismo	

También hay que considerar la influencia hormonal, puesto que el hipogonadismo no tratado es considerado como un factor predisponente para el desarrollo de osteoporosis tanto en el hombre (orquiectomía, privación androgénica en varones con adenocarcinoma de próstata...) como en la mujer (ooforectomía, citostáticos empleados en el cáncer de mama...) . En las mujeres es importante conocer la fecha de menarquía y menopausia, puesto que una menarquía tardía y una menopausia precoz son factores de riesgo para el desarrollo de osteoporosis. La menarquía tardía se asocia a menor masa ósea y a cambios estructurales permanentes en el tejido óseo (36). El número de embarazos, la lactancia, el número de partos las intervenciones quirúrgicas (ooforectomía por ejemplo) son también relevantes. Conviene recordar que existen causas de hipogonadismo comunes a ambos géneros como son la anorexia nerviosa, el hipopituitarismo... (12;37).

3.1.- GENÉTICA, SEXO Y OSTEOPOROSIS.

Según numerosos estudios, el género femenino tiene una incidencia de fracturas mayor que los hombres de forma global. Sin embargo estas diferencias se ven influenciadas por la edad y la raza, constituyendo un factor de riesgo a considerar en la predisposición a presentar fracturas (38). Las mujeres de raza negra son las que presentan valores de DMO más elevados y una tasa más baja de fracturas de cadera (1;39). En la raza asiática las fracturas son más frecuentes en el género femenino con independencia de la edad. A pesar de la menor DMO objetivada en los individuos de raza asiática, éstos no presentan mayor índice de fracturas de cadera con respecto al resto de razas analizadas(38).

Los varones tienen huesos más grandes y mayor pico de masa ósea debido a una mayor talla además de una menor resorción endostal y una mayor aposición perióstica. Estas características intrínsecas a los varones se traducen en una menor incidencia de fracturas en la edad adulta pero no en una menor incidencia de osteoporosis. (40-42). La prevalencia de OP por DXA en mujeres entre los 20 y los 44 años se sitúa en un 0.17 y 0.34% en cadera y vértebras lumbares respectivamente mientras que los varones del mismo grupo de edad presentan una incidencia de 0.17 y 1.39% (43;44). El nivel pico de masa ósea se alcanza entre los 25-35 años, sin encontrar diferencias significativas en cuanto a género (45;46). En edades posteriores el descenso paulatino de estrógenos conlleva un aumento de la pérdida de DMO, observándose en unos 3 años previos a la menopausia, habiéndose comunicado una asociación entre éste hecho y el ascenso de gonadotrofinas séricas y una reducción en los niveles de estradiol (47-49).

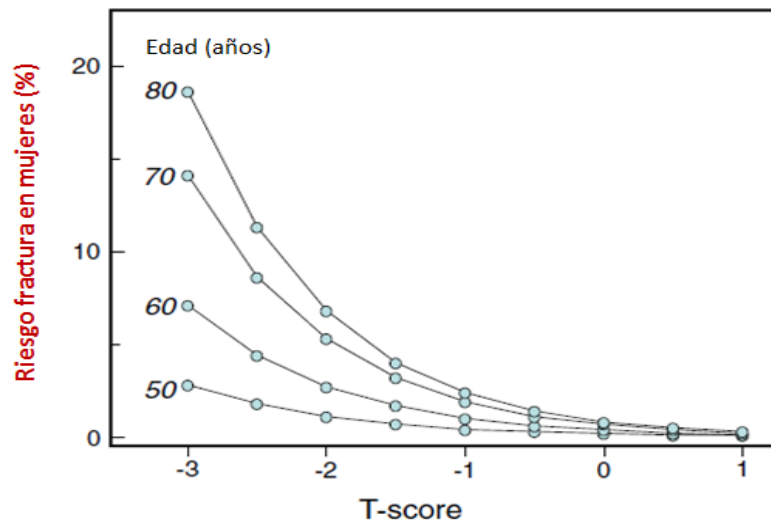
Se ha descrito la importancia de los factores genéticos en la determinación de la masa ósea y la arquitectura ósea, y continúan realizándose múltiples estudios para conocer el impacto de la genética en la predisposición al desarrollo de osteoporosis (50). Los factores genéticos, pueden llegar a representar el 50-80% de las diferentes densidades óseas observadas en la población (51;52). Las mujeres con antecedentes maternos de fractura de cadera tienen el doble de riesgo en su vida de tener fractura de cadera que mujeres sin antecedentes maternos (53;54). La presencia de diferentes polimorfismos genéticos al igual que en otras patologías han sido involucrados en una mayor susceptibilidad al desarrollo de osteoporosis. Entre ellos se encuentran los polimorfismos en los genes que codifican para el receptor de vitamina D, colágeno tipo 1, receptor de estrógenos y factores de crecimiento como el TGF β que explican parte de la influencia genética (32). Por ejemplo en el gen que codifica al receptor de la Vitamina D (RVD), localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q12-14)(58). Se ha intentado establecer una asociación entre algunos polimorfismos del gen del RVD (BsmI, ApaI, and TaqI) y una diferente DMO y un posible papel en una mayor predisposición al desarrollo de osteoporosis, con resultados contradictorios (55-58).

Otros polimorfismos han sido relacionadas con un descenso de DMO y un riesgo incrementado de fracturas de tipo osteoporótico (Receptor estrogénico, COL1A1) pudiendo llegar a suponer un 30% de la variabilidad de DMO entre los sujetos, y a día de hoy no constituyen factores de riesgo establecidos de un mayor riesgo del desarrollo de fracturas osteoporóticas (59).

3.2.- EDAD Y OSTEOPOROSIS.

La edad es un importante factor de riesgo para presentar fracturas con independencia del género y la raza (38). Especialmente constituye un factor predisponente para fractura de cadera, siendo la mediana de edad de presentación de ésta última los 82 años, mientras que en las fracturas vertebrales esa edad se sitúa en la década de los 70. A partir de los 50 años el riesgo de padecer una fractura se duplica cada 7-8 años(60). El descenso en la DMO aumenta 4 veces el riesgo de fractura de cadera entre los 55 y los 85 años, pero sin embargo si consideramos el incremento por la edad el riesgo de presentar una fractura de cadera es 40 veces mayor en esa novena década de la vida con respecto a la sexta. Así pues podemos inferir que según este estudio que el incremento en la edad a partir de los 50 años es 10 veces más potente que el riesgo que supone un descenso en la DMO (61). Un estudio en mujeres de Suecia mostró un incremento en el riesgo de fracturas de hasta cinco veces en función de la edad con independencia de la categoría densitométrica del paciente (gráfico 3) (62).

Gráfico 3. Riesgo de fractura de cadera a 10 años en mujeres en función de edad y T-score. Modificado de Kanis JA et al (62).



El 0,5% de los adultos jóvenes podrían tener descenso en la DMO según criterios de la OMS (63). No existen diferencias en la frecuencia de osteoporosis en jóvenes con respecto al género (45). La incidencia de fracturas vertebrales en adultos jóvenes (<35 años) es de 3 por 100.000 personas/año, y de 21 por 100.000 personas/año cuando se considera la franja de edad entre los 35 a los 44 años(64). La etiología más frecuente de estas fracturas es traumática, pero también se asocian a un descenso de la DMO (65;66) y suponen un factor predictivo del desarrollo de fracturas en edades más avanzadas (67). En la adolescencia se consigue aproximadamente el 86% del pico de masa ósea (antes de los 14 años dos años después de la menarquía) por lo que hay que vigilar posibles factores que puedan afectar al metabolismo óseo pues podrían inferir descensos significativos en la DMO en la edad adulta (43;68). Antes de la menopausia la masa ósea se reduce en 0,5%/año, aumentando posteriormente a >5%/año. En este proceso además de la influencia hormonal y la edad están implicados los hábitos tóxicos y el estilo de vida de las personas (32).

3.3.- DIETA: CALCIO Y VITAMINA D. OTRAS VITAMINAS (K Y C).

La dieta deficitaria en calcio se ha asociado a una menor DMO en la edad adulta, y de forma aún más marcada en personas con bajo IMC(<27 kg/m²) (69). A su vez la deficiencia de Vitamina D es un importante factor de riesgo de fracturas en personas mayores ya que conlleva un aumento en la reabsorción ósea, una disminución en la absorción de calcio, y a la pérdida directa de DMO consecuencia del hiperparatiroidismo secundario resultante del déficit (70). La 1,25 dihidroxi-vitaminaD₃ inhibe la osteoclastogénesis al disminuir la expresión de RANK clave en los precursores de los osteoclastos. Debido a ello algunos autores sugieren el posible beneficio que ésta puede suponer en disminuir la inflamación ósea producida por una excesiva activación osteoclástica (71). Por tanto es importante una adecuada ingesta de calcio desde la niñez hasta la edad adulta para conseguir una buena DMO en la edad adulta y prevenir por tanto el desarrollo de osteoporosis(72). En las recomendaciones diarias de Calcio y Vitamina D (tabla 4) destacan los mayores niveles de calcio requeridos durante el crecimiento y el incremento progresivo del aporte de Vitamina D a partir de los 50 años (73).

Tabla 4. Cantidades diarias recomendadas de calcio y vitamina D en función de la edad.

Edad (años)	Calcio (mg)	Vitamina D (UI)
3-8	800	200
9-17	1300	200
18-50	1000	400
51-70	1200	400
>70	1200	600

Un metaanálisis ha puesto de manifiesto la eficacia de aportar de forma profiláctica suplementos de calcio +/- vitamina D para evitar el desarrollo de osteoporosis en personas mayores de 50 años. Sin embargo, su uso es controvertido en la prevención de las fracturas (74). En un metaanálisis publicado por Tang, BM et al, en más de 60.000 pacientes sí se observó un descenso del 12% en las fracturas osteoporóticas tras aportar suplementos de calcio con independencia de aportar vitamina D, siendo más manifiesta su eficacia en personas mayores de 70 años con ingesta diaria de calcio menor de 700 mg al día (74). Conviene recordar que se han descrito efectos adversos cardiovasculares en mujeres que recibían suplementos con calcio y vitamina D, tales como enfermedad coronaria e incluso un incremento en el riesgo de Infarto Agudo de Miocardio. Sin embargo, estos datos se han discutido al no ser la toxicidad el objetivo primario de esos estudios (75-81).

Existen otros déficits vitamínicos que se asocian a un mayor riesgo de fracturas óseas como son el déficit de Vitamina C, ya que ésta es un cofactor imprescindible para la formación del colágeno, y para la síntesis de hidroxiprolina e hidroxilisina. Las recomendaciones mínimas diarias de Vitamina C son de 75 mg y 90 mg para mujeres y hombres respectivamente (76). También, algún estudio ha puesto de manifiesto la asociación entre el déficit de vitamina K y un aumento de las fracturas en la población anciana debido a una reducción en la carboxilación de la proteína osteocalcina en la matriz ósea lo que determina un descenso en la función osteoblástica y en la neoformación ósea. La dosis diaria de vitamina K recomendada es de 120 µg para hombres y 90 µg para mujeres (73;82).

3.4.- CAFEÍNA Y OSTEOPOROSIS.

Algún estudio ha correlacionado la cafeína con un mayor riesgo de fractura de cadera y disminución en la DMO en mujeres de edad avanzada con la variante *tt* del receptor de la vitamina D (54).

3.5.- Hábitos tóxicos: tabaco y alcohol.

El tabaquismo está asociado a una disminución progresiva de masa ósea e incrementa el riesgo de fractura de cadera en las personas mayores, independiente de la densidad ósea. El mecanismo por el que se produce sería la menor eficacia en la absorción de calcio a nivel intestinal (83-86). Un elevado consumo de alcohol (>200mL/semana) también constituye un factor de riesgo para el desarrollo de osteoporosis (86).

3.6.- Estilo de vida: sedentarismo.

El sedentarismo ha sido correlacionado con el riesgo de presentar fracturas en algunos estudios, aunque tras eliminar algunos factores de confusión como la función neuromuscular no siempre se ha reproducido. El ejercicio físico aumenta la DMO, aunque si bien de forma diferente en las distintas partes del esqueleto (54;87). Además, influye positivamente en la geometría ósea debido a un aumento en el grosor de la cortical ósea (88).

3.7.- Índice de masa corporal (IMC) y osteoporosis.

Presentar un IMC <21 kg/m² se ha asociado a una menor DMO. También se ha descrito el aumento de fracturas osteoporóticas en personas delgadas, especialmente en mujeres mayores, sin una correlación de tipo lineal. El mayor riesgo de fracturas se ha comunicado en personas con un IMC ≤ 20 kg/m², observando como el riesgo entre 25 y 25 kg/m² varía pero de forma menos acentuada. Un IMC elevado puede ser un factor protector a la hora de desarrollar fracturas de tipo osteoporótico (54;89;90).

4.- FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS.

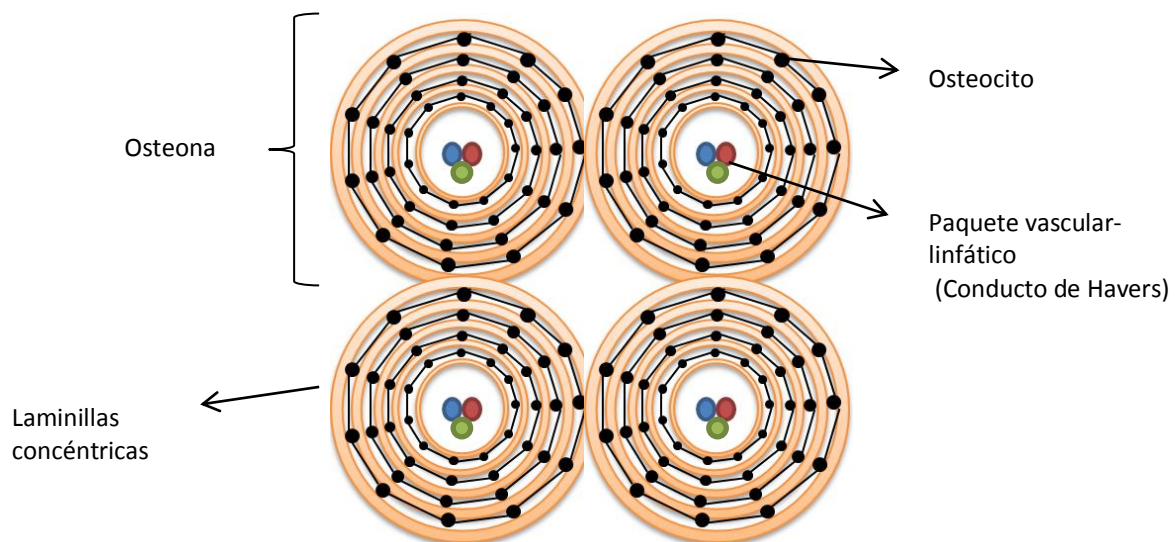
4.1.- FISIOLÓGÍA DEL TEJIDO ÓSEO.

El tejido óseo está compuesto por hidroxapatita (65%), matriz ósea, células y agua. La matriz ósea está formada principalmente por colágeno (90%), proteoglicanos y lípidos. Cabe destacar que presenta una elevada vascularización. El esqueleto está compuesto por dos tipos de hueso: cortical y trabecular (32).

a) Hueso cortical:

Constituye aproximadamente el 70%-80% de todos los huesos. Se localiza en la parte externa del hueso rodeando al trabecular. Se desarrolla predominantemente durante la fase embrionaria y es de crecimiento rápido. Podemos dividirlo en tres partes desde el punto de vista morfológico: el endostio (contacta con la médula ósea), el periostio (parte más externa del hueso) y el tejido cortical (espacio que queda entre el endostio y el periostio). Histológicamente se dispone en *sistemas Haversianos*, compuestos por túbulos de 2 nm de largo y 200 nm de diámetro (osteonas) que contienen capas concéntricas de hueso lamelar entre las que se disponen los osteocitos (ilustración 1). En el centro de cada sistema Haversiano se encuentra en el canal por el que llega el paquete vascular (conducto de Havers) (32;91;92).

Ilustración 1. Esquema de sistema Haversiano en tejido cortical óseo



b) Hueso trabecular:

Está formado de láminas óseas configuradas en red (horizontales y verticales) para una óptima resistencia mecánica a las cargas. Se localiza fundamentalmente en pelvis, vértebras, esternón y otros huesos planos. Es metabólicamente más activo que el cortical (32).

A continuación detallamos las células que podemos encontrar en el tejido óseo:

a) Osteocitos:

Son las células más abundantes (95%). Proceden de osteoblastos que quedan inmersos en unas cavidades (lagunas) en el interior de la matriz ósea. Emiten prolongaciones citoplasmáticas hacia otros osteocitos y hacia los osteoblastos (uniones tipo GAP). Su principal función es regular la composición de la matriz ósea y la adaptación frente a las diversas cargas mecánicas a las que tiene que hacer frente el sistema óseo, interviniendo de forma activa en la remodelación ósea (formación y resorción del hueso) (32).

b) Osteoblastos:

Es la principal célula responsable de la formación ósea (5% celularidad ósea). Su morfología depende de su estado de activación. Son células mononucleadas. Los osteoblastos activos tienen una morfología cuboide o poliédrica con intensa basofilia mientras que en estado inactivo son células aplanadas. Derivan de unas células progenitoras osteoblásticas que ontológicamente proceden de las Células Stem Mesenquimales (CSM) de la médula ósea. Se sitúan en hilera monoestratificada la parte externa ósea sobre la matriz ósea y en contacto con el estroma medular, diferenciándose a osteocitos. Este proceso denominado osteoblastogénesis dura aproximadamente de uno a tres meses. Son células con un retículo endoplasmático y aparato de Golgi muy desarrollados pues sintetizan el osteoide: fibras de colágeno tipo I (principal componente de la matriz ósea), proteínas no colágenas como osteonectina y osteocalcina (proteínas fijadoras de calcio) y proteoglucanos. Además en la pared celular de estas células se sitúan entre otros receptores hormonales fundamentales en el metabolismo óseo. Tras mineralizar la matriz el 30% se diferencian a osteocito, un 5% queda sobre la matriz como células de recubrimiento óseo y la mayoría entra en apoptosis (32).

c) Osteoclastos:

Es la principal célula responsable de la resorción ósea (1-2% células óseas). Son células grandes, multinucleadas que proceden de la Unidad Formadora de Colonias granulocítico-macrofágicas de las Células Stem Hematopoyéticas (CSH) de la médula ósea. De igual forma que en los osteoblastos están inmersos en la regulación del metabolismo óseo a través de la influencia de abundantes factores hormonales, citoquinas (32;93).

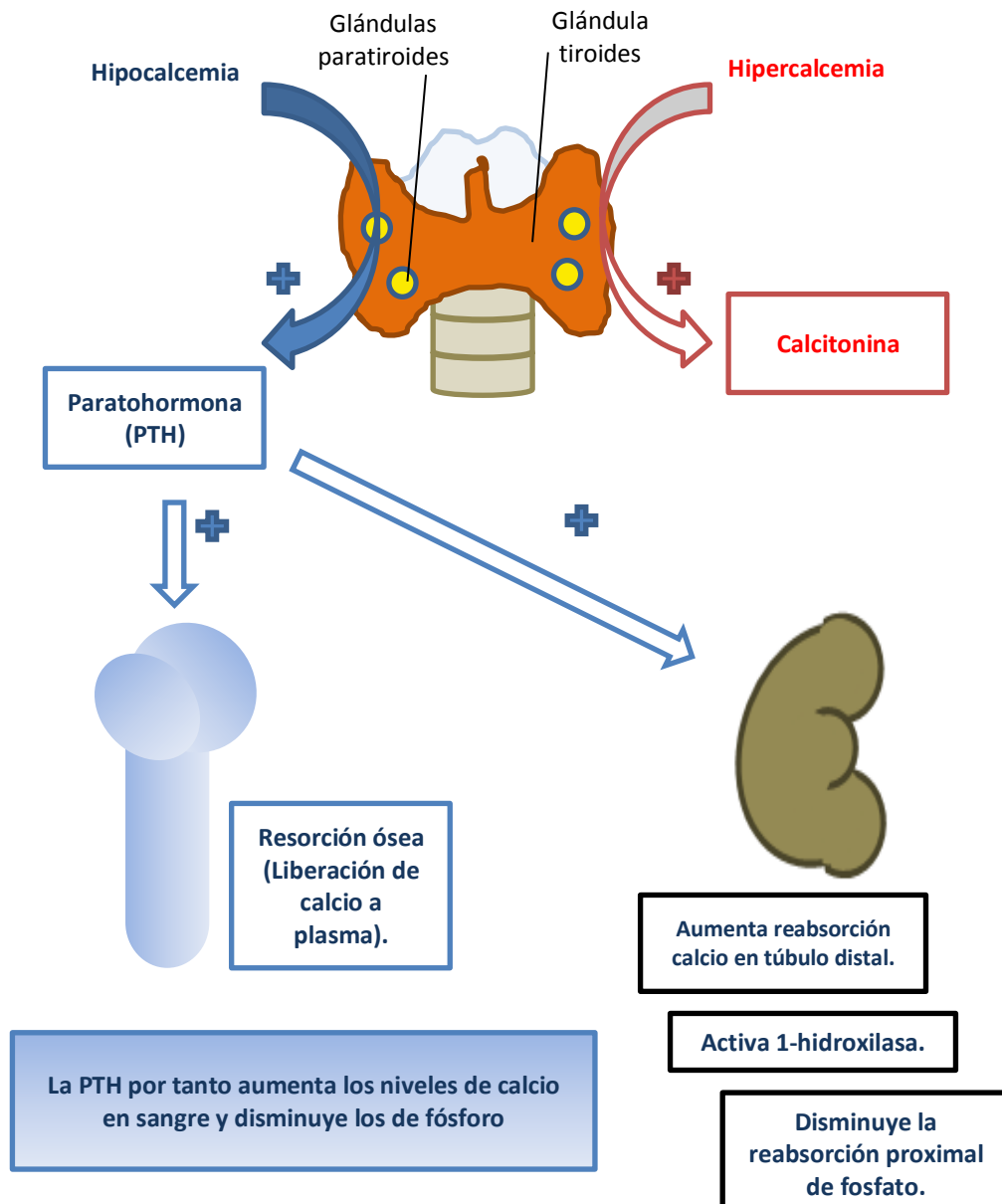
4.2.- METABOLISMO ÓSEO.

El metabolismo óseo se regula fundamentalmente por el metabolismo del calcio y el fósforo. La concentración de calcio sérico es de aproximadamente 9-10 mg/dL, encontrándose aproximadamente la mitad del mismo en forma de calcio iónico (el resto está unido a proteínas e iones). La regulación del calcio está determinada por tres órganos principalmente: intestino, hueso y riñón. En la regulación influyen distintas hormonas, entre las que destacan la paratohormona (PTH) y la calcitonina, además de citoquinas, factores de crecimiento, vitamina D, leptina y osteoprotegerina (OPG) entre otras, detallando en las siguientes líneas la acción de las más importantes (32;91).

a) Paratohormona:

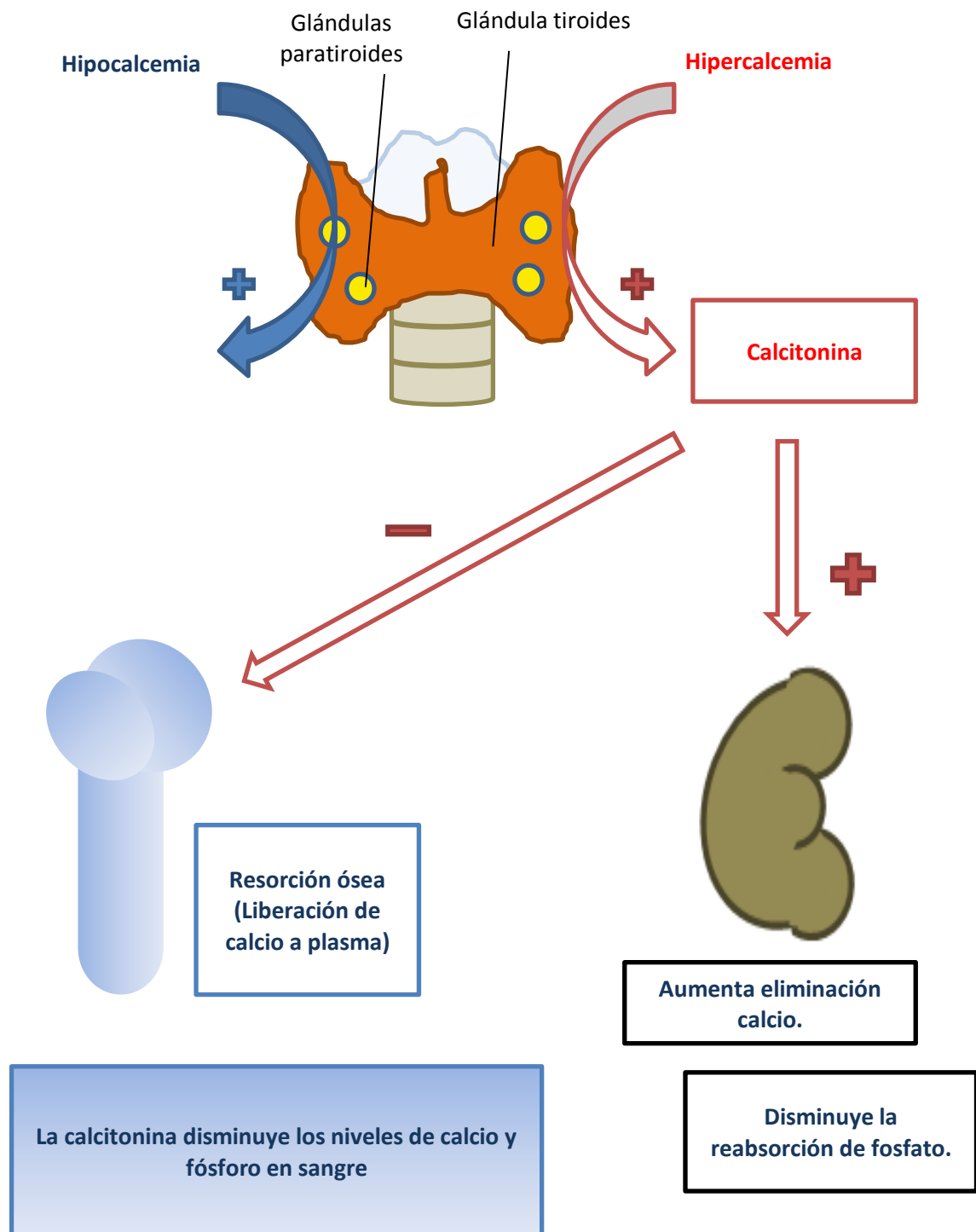
Se sintetiza en las hormonas paratiroides. Su principal acción es aumentar la calcemia a través de un aumento de la resorción ósea y un aumento de la absorción intestinal de calcio gracias a que estimula la formación renal de 1,25 dihidroxi Vitamina D (1,25 dihidroxicalciferol). También reduce la fosfatemia al aumentar su excreción renal. Por tanto de forma fisiológica la PTH se estimula en condiciones de hipocalcemia (32;91). Las acciones de la PTH se resumen en la ilustración 2.

Ilustración 2. Metabolismo calcio-fósforo. Acciones de la hormona paratiroidea (PTH).

b) Calcitonina:

Es sintetizada por las células C del tiroides. Su principal acción es disminuir los niveles séricos de calcio mediante la inhibición de su absorción intestinal, de la resorción ósea y de aumentar su excreción renal (32). Las acciones de la PTH se resumen en la ilustración 3.

Ilustración 3. Metabolismo calcio-fósforo. Acciones de la calcitonina.



c) 1,25 dihidroxi Vitamina D:

A través de la dieta se obtiene vitamina D3. En la piel se produce colecaciferol, precursor de la 1,25 dihidroxi Vitamina D gracias a la exposición solar. A nivel del hígado se produce la primera hidroxilación en la posición 25 (colecaciferol) y es a nivel renal donde se transforma en la forma activa (1,25 dihidroxi Vitamina D o calcitriol) gracias a la acción de la enzima renal 1-hidroxilasa (ilustración 4). Entre las acciones de la vitamina D3 activa se encuentra favorecer la absorción intestinal de calcio por medio de difusión facilitada y la resorción ósea al estimular la diferenciación y actividad osteoclástica. Disminuye la excreción renal de calcio y fósforo. La 1,25 dihidroxi-vitamina D3 también ejerce un efecto inhibitor sobre la proliferación de las células paratiroides. Las principales acciones de la vitamina D3 activa se resumen en la ilustración 5. (32;93).

Ilustración 4. Síntesis de la Vitamina D

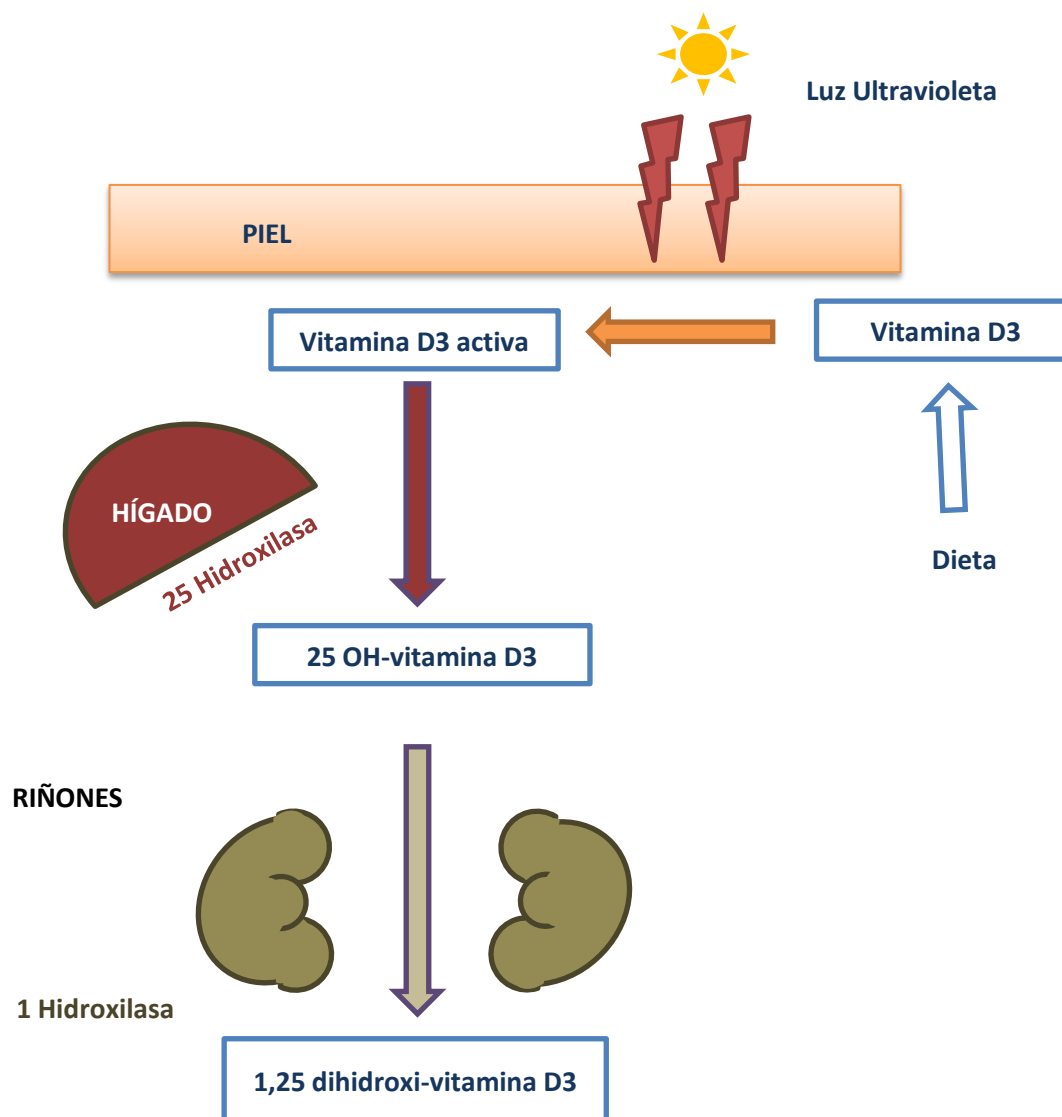
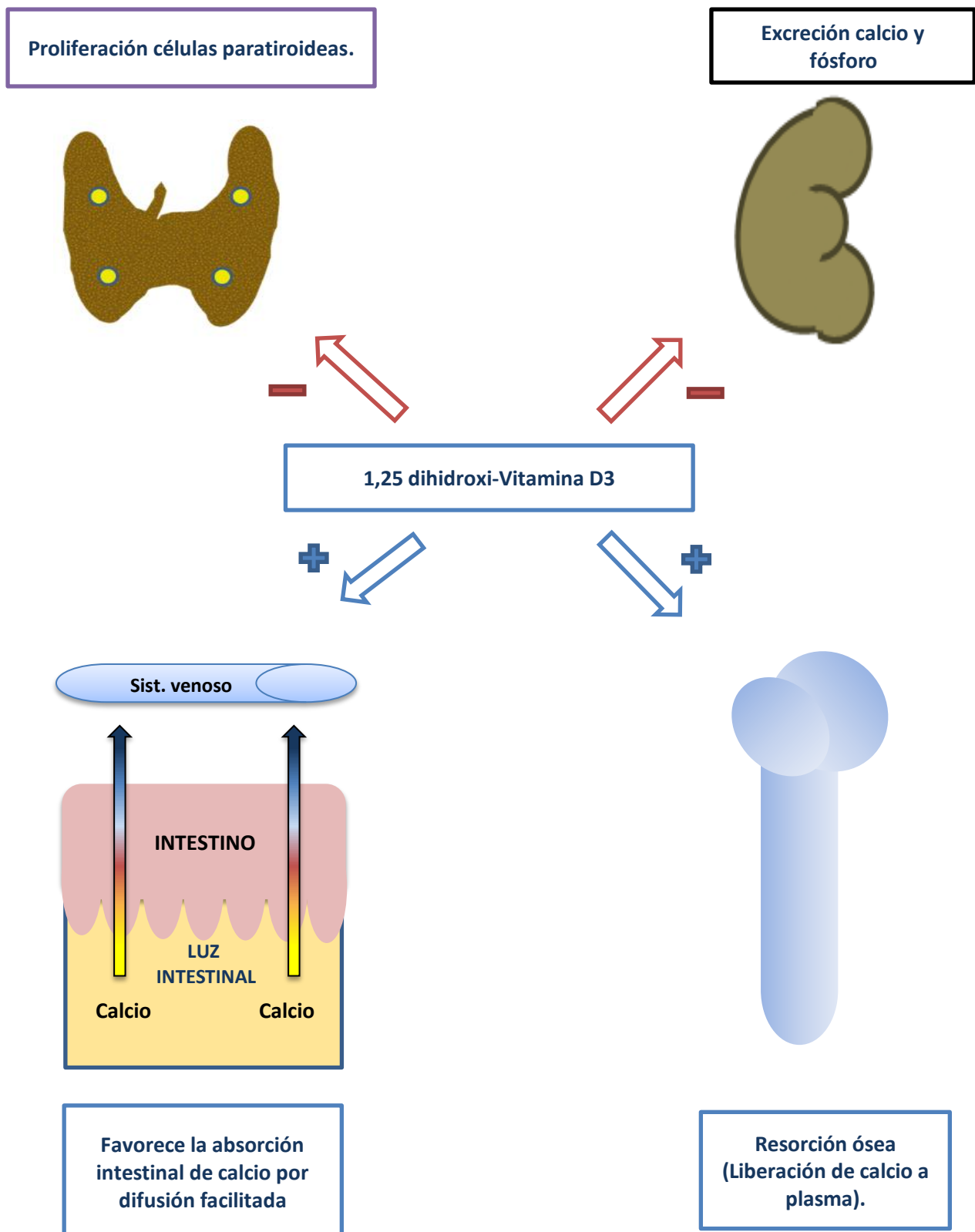


Ilustración 5. Acciones de la 1,25 dihidroxi-vitamina D3



d) Osteoprotegerina (OPG):

Es una proteína inhibidora del reclutamiento y activación de los osteoclastos gracias a la unión de la misma a RANK, receptor transmembrana situado en la pared celular de los osteoclastos, lo que impide la unión a RANK ligando (RANKL) situado en la membrana del osteoblasto, que activa a los osteoclastos activando las vías de señalización NF- κ B, MAP-quinasas y la vía *src* (93;94).

e) Estrógenos:

Inhiben el reclutamiento de los osteoclastos a través de la OPG, estimulan la proliferación osteoblástica a la vez de la formación de colágeno por parte de éstos (32;95).

f) Otras hormonas:

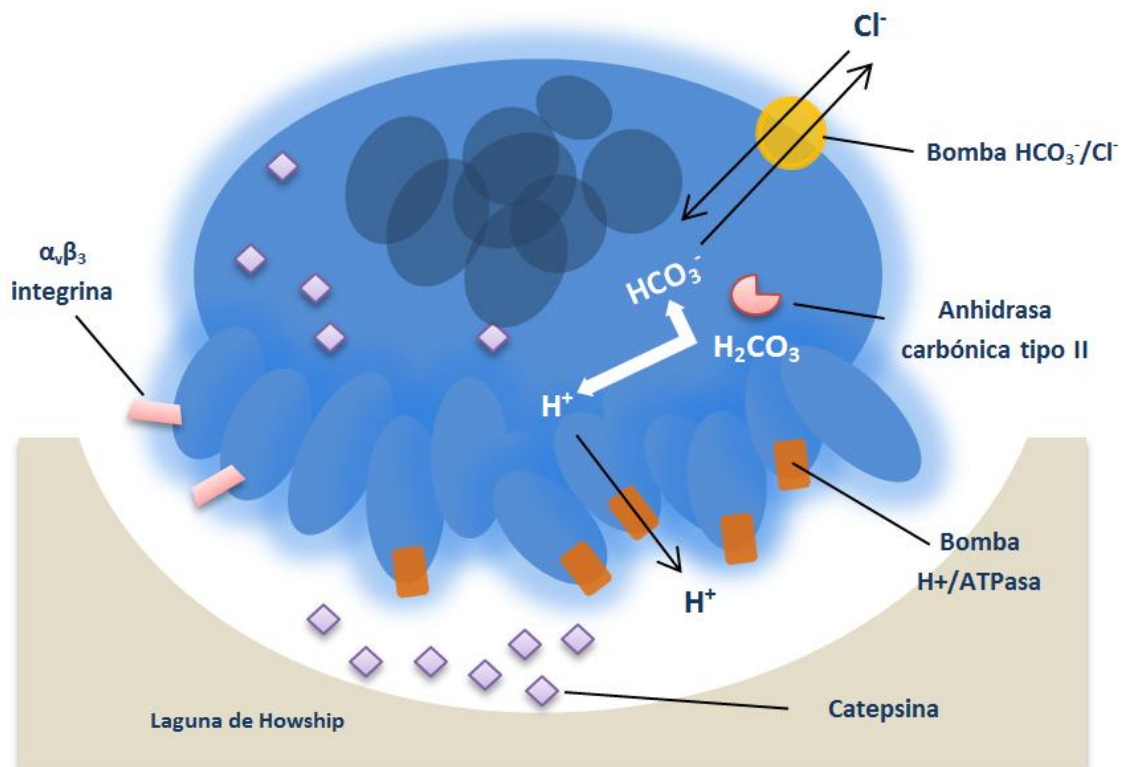
El efecto sobre el metabolismo óseo de otras hormonas como la leptina que favorece la formación ósea por estimulación de una mayor síntesis de colágeno, una mayor actividad osteoblástica y una inhibición osteoclastogénica a través de la vía de la OPG también han sido estudiadas (96).

4.3.- REMODELADO ÓSEO.

Los huesos están en perpetuo remodelamiento. Cada ciclo de remodelación oscila entre los 3 y los 6 meses, siendo más activo a nivel trabecular (4 veces más que a nivel cortical). Es por ello que ante una disminución de masa ósea el hueso con una tasa de remodelado mayor es el más sensible y por tanto el más susceptible de fracturarse. Cada ciclo de remodelación ósea es llevado a cabo por la unidad multicelular básica formada por osteoblastos y osteoclastos que se activa en función de las necesidades de reparación de un determinado segmento óseo. La secuencia de remodelado óseo comprende cuatro fases: activación, resorción, inversión y formación (32).

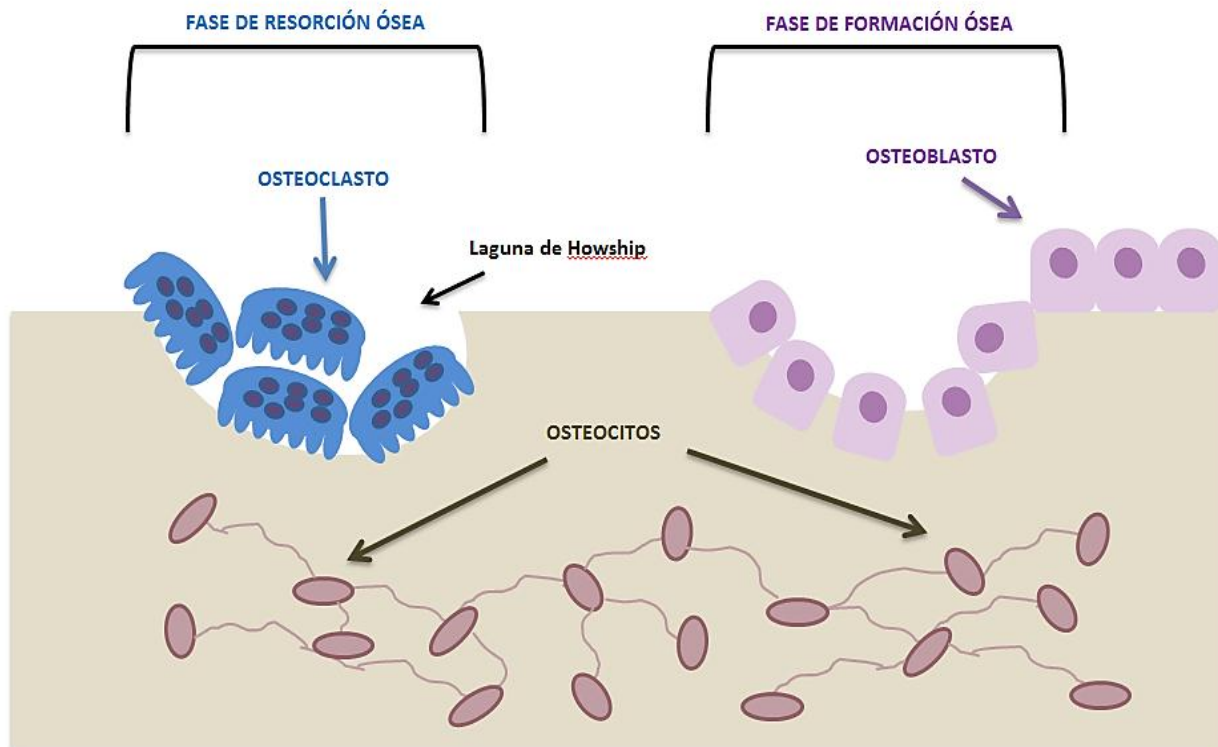
En la fase de activación, se produce la activación de los osteocitos tras el daño óseo (solución de continuidad, microfractura, inflamación...) liberando mediadores (IL-1, IL-6, PTH, calcitriol, TNF, óxido nítrico, PTH...) que activan a las células pluripotenciales de médula ósea. En la fase de resorción se produce la liberación de factor estimulador de colonias macrofágicas (M-CSF) por parte de las células estromales. La función del M-CSF es favorecer la diferenciación a la línea pre-osteoclástica. Tras la contracción de las células de revestimiento los precursores osteoclásticos se concentran en esa área fusionándose para originar células multinucleadas activas (osteoclastos) que se anclan al hueso por medio de los filamentos de actina y la integrina $\alpha_v\beta_3$ que existen en sus podocitos. Una vez allí libera enzimas proteolíticas y protones (H^+) (gracias a la existencia de una bomba H^+ /ATPasa en los podocitos y una anhidrasa carbónica en el borde basal que forma H^+ a partir de H_2CO_3) generando el pH ácido necesario para la resorción (Ilustración 6). De esta manera se conforma una oquedad en el hueso conocida como laguna de Howship (Ilustración 6). Esta fase se encuentra influenciada por citoquinas como RANKL y M-CSF (activadores de la resorción), OPG y el factor estimulante de colonias granulo-macrofágicas (GM-CSF) que ejercen un papel inhibitor. Las dos primeras fases explicadas del remodelado óseo tienen una duración aproximada de 1 a 3 semanas tras el daño producido (94;97).

Ilustración 6. Metabolismo de resorción ósea por el osteoclasto en Laguna de Howship



Tras ese período la resorción se detiene en la laguna de Howship (apoptosis y salida de los osteoclastos), dirigiéndose hacia esa zona macrófagos que se encargan de preparar la superficie ósea para el anclaje de los osteoblastos además de emitir señales quimiotácticas a los mismos (fase de inversión) para que se dirijan a esa área. El período de esta fase oscila entre 1 y 2 semanas. En la fase de formación (Ilustración 7) se produce la diferenciación, proliferación y activación de los osteoblastos (morfología cuboide-poliédrica) que van asentándose en la cavidad del hueso resorbido, depositando matriz ósea compuesta principalmente por colágeno tipo I (90%) que será después mineralizada con cristales de hidroxiapatita debido a la influencia de la vitamina D. El proceso de formación ósea comprende una duración mayor (1-3 meses) (32;97).

Ilustración 7. Fases de resorción y formación ósea (Remodelado óseo)



4.4.- PATOGENIA DE LA OSTEOPOROSIS.

En la osteoporosis se produce un desequilibrio ocasionado por un exceso de la reabsorción ósea que no es compensada con la formación de nuevo hueso y como resultado se produce una pérdida de masa ósea que debilita el hueso. Los procesos de pérdida de masa ósea ocurren al principio a nivel de las trabéculas horizontales, como hemos mencionado recientemente debido a ese recambio más acelerado que precisa de forma fisiológica. Las trabéculas disminuyen de espesor, apareciendo pequeñas fracturas en ellas adelgazan y se microfracturan. El remodelamiento óseo desbalanceado a favor de la resorción sobre la formación ósea es la principal causa de pérdida de masa ósea y puede ser debido a una actividad osteoclástica aumentada y/o a una disminución en la actividad osteoblástica (32;98). Los tipos más frecuentes de OP se exponen a continuación:

4.4.1.- OSTEOPOROSIS SENIL.

La osteoporosis senil o del envejecimiento, es un proceso asociado a la edad caracterizado por la pérdida de osteoblastos. A medida que envejecemos, el número CSM en la médula ósea disminuye con lo que la diferenciación osteoblástica decrece, llevando progresivamente a una disminución numérica de los osteoblastos medulares que no se acompaña de una disminución en el número de osteoclastos, por lo que se desequilibra la balanza de producción-resorción ósea. La disminución de la masa ósea puede resultar de una menor masa ósea máxima alcanzada durante el crecimiento esquelético o de una pérdida ósea aumentada. Se produce una continua pérdida del endostio no reemplazado por hueso perióstico lo que provoca una disminución en el grosor de la cortical (32;98).

4.4.2.- OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA.

En la osteoporosis postmenopáusica la pérdida de masa ósea se produce principalmente por un exceso de resorción debido al aumento del número y de la actividad de los osteoclastos a través de la activación del RANKL por la disminución de los niveles de estrógenos, asociada a una disminución de la osteogénesis (99). En los primeros diez años tras la menopausia se produce la progresiva pérdida de hueso, predominando el descenso a nivel del hueso trabecular (20%-30%) frente al cortical (en torno al 10%) y está directamente relacionada con el descenso en los niveles de estrógenos. Junto a esta pérdida progresiva se inicia un descenso continuo más lento que afecta por igual a ambos tipos de huesos y que supone una pérdida de casi un tercio de la masa ósea total (32).

4.4.3.- OSTEOPOROSIS SECUNDARIA A FÁRMACOS.

Se observa en pacientes que reciben tratamiento con glucocorticoides o inmunosupresores como la ciclosporina (osteoporosis postrasplante). En ellas se produce un aumento de la actividad osteoclástica y una disminución importante de la actividad osteoblástica. Esta combinación conlleva una pérdida muy acelerada de masa ósea (32). En la osteoporosis esteroidea predomina una disminución en la formación ósea, aunque inicialmente también se produzca un aumento de la resorción de hueso. El efecto principal de los glucocorticoides es por acción directa sobre la célula osteoblástica. Disminuyen la osteoblastogénesis y alteran la proliferación y funcionalidad de estas células. Los glucocorticoides reducen la replicación de las células osteoprogenitoras derivadas de las CSM, hecho demostrado en cultivos celulares in vitro, mediante una inhibición de la vía Wnt (100). Dosis farmacológicas de dexametasona aumentan la expresión por mecanismos transcripcionales de ciertos antagonistas de Wnt como DKK1 y SFRP-1 (101;102). Por otra parte se conoce que los glucocorticoides inhiben la otra vía central en el control de la osteoblastogénesis y la diferenciación osteoblástica: la vía de las BMP (Bone morphogenetic protein).

La dexametasona inhibe la expresión génica de BMP-2 in vitro (103;104). Otro mecanismo por el que los glucocorticoides pueden afectar la proliferación y función celular de los osteoblastos es a través del control de la muerte celular programada o apoptosis, produciendo una disminución del número de osteoblastos maduros y de osteocitos mediante apoptosis (105).

5.- DIAGNÓSTICO.

5.1.- HISTORIA CLÍNICA.

En el diagnóstico de la OP es fundamental realizar la DXA y ésta hay que realizarla siguiendo unos criterios de sospecha clínicos. La OP es asintomática por lo que es esencial una historia clínica detallada que refleje factores etiológicos de riesgo como tabaco, alcohol, alimentación con preguntas que nos aporten datos sobre la ingesta de calcio y vitamina D principalmente (106). También en las mujeres hay que preguntar sobre antecedentes obstétricos y ginecológicos (embarazos, edad de menarquía y menopausia). En la anamnesis hay que preguntar sobre dolores agudos y crónicos óseos ya que recordemos que las fracturas son el elemento de debut de enfermedades osteopenizantes como el Mieloma Múltiple y sobre la ingesta de fármacos con alto riesgo de desarrollo de OP además de historia de traumatismos tanto de alta como de baja energía. En esta historia hay que detallar antecedentes familiares de OP y fracturas (3).

Hay que realizar una exploración física completa que incluya medida del peso y la talla, así como reflejar la existencia de deformidades esqueléticas (cifosis, escoliosis...) y debe realizarse palpación/percusión de la columna sobre puntos dolorosos(3;63;107).

5.2. CRITERIO DIAGNÓSTICO DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).

El *T-score* se define cómo el número de DE de DMO que un paciente se aleja de la media de DMO de su población de referencia, constituidos por sujetos sanos de edad joven del mismo sexo (108). El diagnóstico de osteoporosis se basa en los criterios densitométricos establecidos por la OMS en 1994 para mujeres postmenopáusicas de raza blanca y se define como aquella persona que presenta *T-score* inferior a -2,5 DE en columna lumbar y cuello femoral con respecto a la a la población joven del mismo sexo (5). Aquellas personas en las que se objetiva un *T-score* entre -1 y -2.5 DE son diagnosticadas de osteopenia, mientras que aquellas con un *T-score* superior a -1 DE se encuadran dentro de la normalidad (ilustraciones 8 y 9) (5). Aunque el *T-score* fue diseñado en mediciones sobre cadera y columna lumbar, está siendo empleado en diferentes localizaciones óseas(109). El *T-score* es útil para diagnosticar de osteoporosis pero sin embargo no implica la necesidad de acometer ninguna actitud terapéutica. En varios estudios, se observó que en menos del 50% de las fracturas en mujeres con descenso de DMO, sucedían en aquellas con un *T-score* menor o igual de -2.5 DE (110;111). Luego expondremos las características de la aplicación FRAX® (Fracture Risk Assessment Tool), una herramienta online desarrollada en 2008 por la OMS que estima en base a factores de riesgo la probabilidad que tiene un determinado sujeto de tener fracturas a 10 años (112-114).

El *T-score* no tiene aplicabilidad en mujeres premenopáusicas. El riesgo de fracturas en mujeres posmenopáusicas es superior al encontrado en el período premenopáusico con la misma DMO debido a factores protectores presentes en las personas comprendidas en esta etapa como son mayor masa muscular, corticales óseas de mayor grosor, remodelamiento óseo menos acelerado y padecer un menor número de caídas. La Sociedad Internacional de Densitometría propone emplear en este sector poblacional el *Z-score*: expresado en DE de DMO (g/cm²) de un individuo con respecto a la media de su población normal (misma edad y

sexo del individuo). Así un valor de Z menor de -2 en columna lumbar o fémur se considera como “por debajo del rango para su edad”. El Z-score es el más empleado en niños y adolescentes (12). Un Z-score bajo puede ser indicativo de osteoporosis secundarias. Para realizar el diagnóstico de osteoporosis fuera de esta edad menopáusica no es suficiente con el criterio densitométrico, puesto que se precisa la presencia de factores de riesgo clínicos como por ejemplo el antecedente de toma de fármacos con potencial desarrollo de osteoporosis como los glucocorticoides o la constatación de fracturas secundarias a traumatismos de baja energía. Un descenso en la DMO de una persona joven representa una adquisición deficiente de pico de masa ósea, pero no está relacionada de forma absoluta con un mayor riesgo de fracturas y por ello solo debe realizarse DXA en este sector poblacional en aquellos casos que objetivamos factores de riesgo clínicos para el desarrollo de osteoporosis (6;43;63).

Ilustración 8. Densitometría ósea normal en cadera de mujer menopáusica (T score > -1 DE).

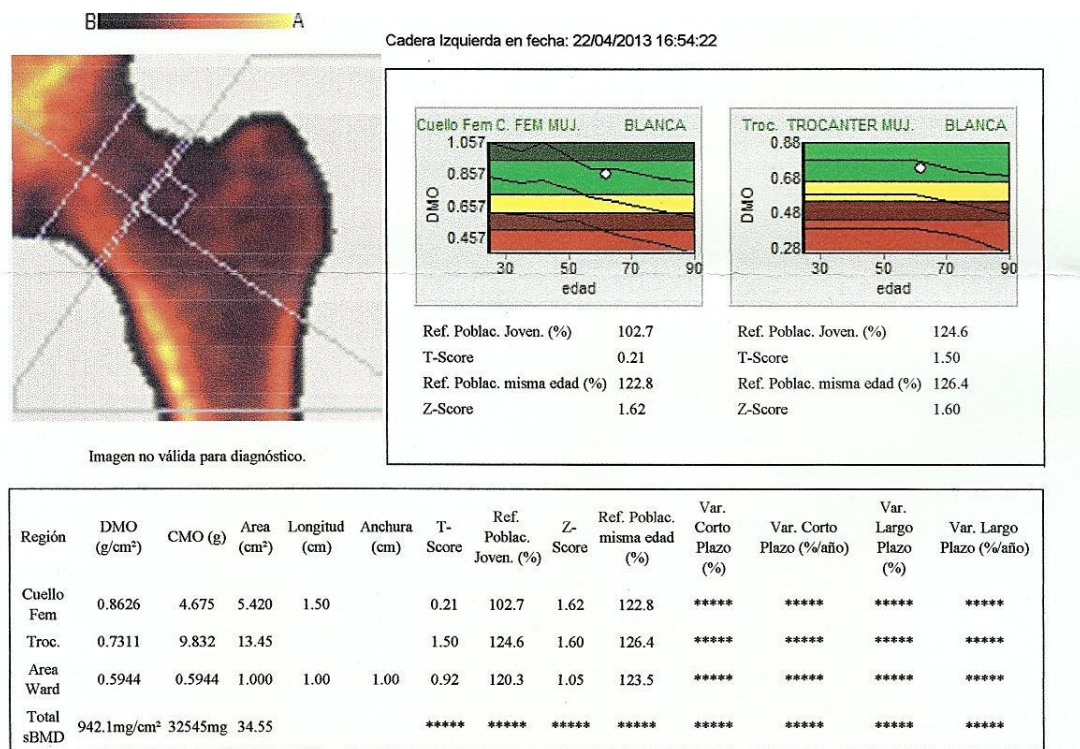
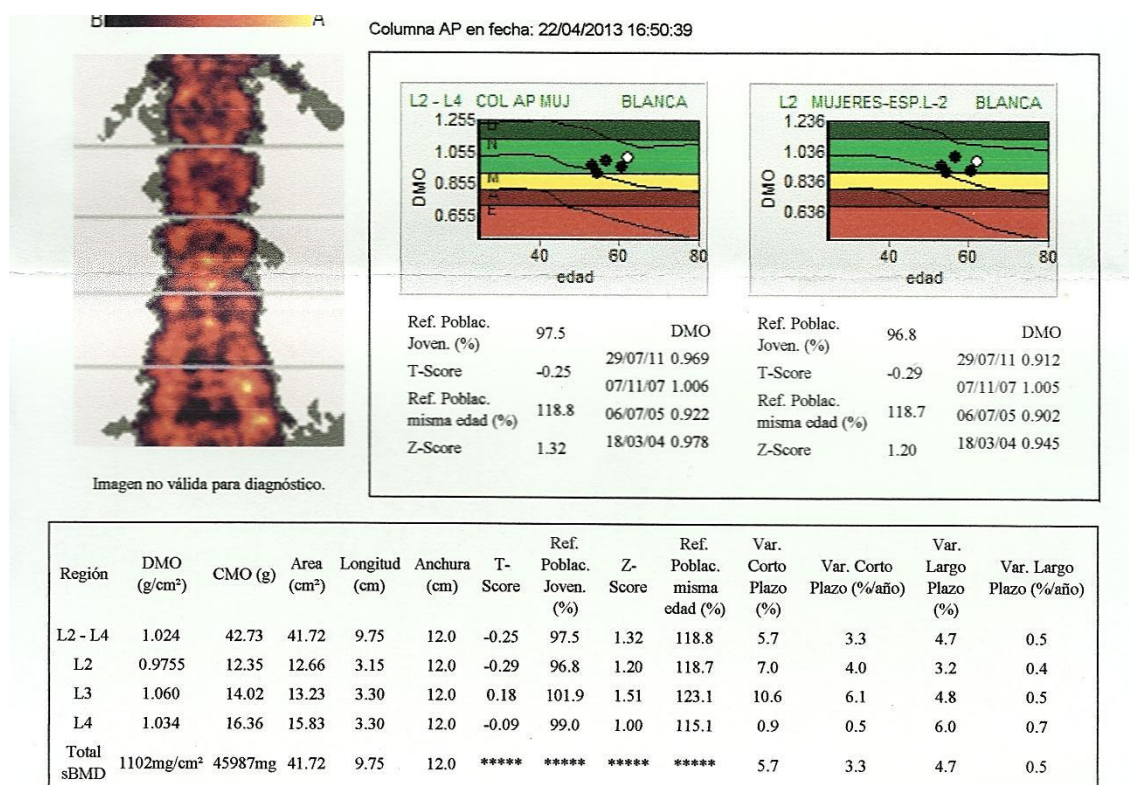


Ilustración 9. Densitometría ósea normal en columna lumbar de mujer menopáusica (T score > -1 DE).



5.3. EVALUACIÓN DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA (DMO) MEDIANTE PRUEBAS RADIOLÓGICAS.

La DMO es el parámetro fundamental en el diagnóstico de osteoporosis. Se han descrito diferentes técnicas radiológicas para realizar la medición de la DMO entre las que se encuentran la radiología convencional, los ultrasonidos, la tomografía computarizada cuantitativa (QTC) central y periférica así como las DXA central (continúa siendo la herramienta gold estándar) y periférica. La QTC, los ultrasonidos y los equipos DXA periféricos son útiles para predecir un riesgo elevado de fractura pero no deben utilizarse para el diagnóstico, el seguimiento o la evaluación de la respuesta terapéutica en pacientes con osteoporosis con un nivel de evidencia 1a y grado de recomendación A (3;115). En las siguientes páginas describiremos características de estas pruebas de imagen (35).

5.3.1. EVALUACIÓN DE LA DMO MEDIANTE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA CUANTITATIVA (QCT).

La QCT es una técnica radiológica en auge que también se puede utilizar para medir la DMO como la DXA, aportando ventajas frente a ésta como permitir tomar la DMO volumétrica en columna lumbar, cadera y radio distal en lugar de área de superficie además de distinguir entre la cortical ósea y las trabéculas del hueso, presentando por tanto una mayor sensibilidad en la detección de un recambio óseo acelerado (116;117). Para poder ser realizada el aparato de QCT tiene que calibrarse con densidades estandarizadas para cristales de hidroxapatita cálcica (*sistema phantom*)(118). Debido a su elevada sensibilidad, puede ser empleada para el seguimiento de la enfermedad pero todavía su papel en la monitorización de la respuesta a los distintos tratamientos, sobre todo en estimar la reducción en el riesgo de fractura, es controvertida (117;119-121).

5.3.2. EVALUACIÓN DE LA DMO MEDIANTE ULTRASONIDOS.

El empleo de ultrasonidos de forma cuantitativa se ha empleado para valorar hueso, realizándose sobre todo a nivel de calcáneo. Mediante esta técnica analizamos la atenuación (*broad-band ultrasound attenuation* o BUA) y la velocidad del ultrasonido (*speed of sound* o SOS). Es útil para clasificar a personas con alto riesgo de fractura pero todavía su aplicabilidad clínica es limitada puesto que hacen falta delimitar mejor puntos de corte de los que se deriven modificaciones en el manejo clínico de los pacientes (122).

5.3.3. EVALUACIÓN DE LA DMO MEDIANTE ABSORCIOMETRÍA RADIOGRÁFICA DE DOBLE ENERGÍA O DENSITOMETRÍA ÓSEA (DXA).

La DXA, continúa siendo la herramienta gold estándar en la medición de la DMO para el diagnóstico de la osteoporosis (5;123;124). Es una técnica con buena precisión que determina el área de densidad ósea que expresa en gramos de mineral por cm² de área de hueso, sirviendo ésta medida para establecer el T-score comentado anteriormente (1;3;4). Es capaz de medir la DMO tanto en regiones axiales (columna y cuello femoral) así como en localizaciones periféricas, como radio distal (116). Su fundamento técnico se basa en hacer pasar dos haces de rayos X por el área del hueso a evaluar, presentando como gran ventaja que expone al paciente a una baja dosis de radiación (una 10% aproximadamente de la radiación que supone una placa de tórax) (118;125). La DMO medida por DXA central es un factor predictivo de fracturas osteoporóticas tanto en mujeres postmenopáusicas como en varones en la senectud (126-132).

La *National Osteoporosis Foundation* y la *International Society for Clinical Densitometry* establecieron la DXA central de columna o cadera como el gold estándar para el diagnóstico de osteoporosis(5;123;124), y no la obtención de valores bajos de DMO en localizaciones periféricas. Este hecho se debe al escaso valor predictivo del riesgo de fracturas del T-score en localizaciones extraaxiales y al poco incremento observado en la DMO en pacientes respondedores al tratamiento (118). Por tanto, la realización extraaxial de la en esqueleto periférico de técnicas como la DXA periférica (rodilla, falange...), al igual que los ultrasonidos en calcáneo constituyen un ahorro de tiempo, de coste económico y de complejidad pero su precisión es más baja que la DXA central, por lo que quedan reservados a aquellas circunstancias en las que no se pueda realizar la DXA central (133-136).

Estos motivos pueden ser secundarios a las características del paciente (escoliosis importante, obesidad mórbida...) o a factores relacionados con la técnica (pacientes sometidos a intervenciones de columna o cadera en la que se han colocado objetos metálicos) de objetos metálicos se recomienda realizar la DXA en el tercio distal del radio del antebrazo no dominante con un nivel de evidencia 2b y un grado de recomendación B (3;13).

El T-score no debe obtenerse por medio de diferentes técnicas y/o localizaciones puesto que un mismo individuo podría cambiar de categoría diagnóstica al tener valores discordantes. Para ello algunos autores han recomendado elegir el cuello femoral como la localización ósea de referencia sin excluir la utilidad que puede proporcionar la realización de la DXA en otras localizaciones (tabla 5) (12;138).

Tabla 5. T-scores estimados y prevalencia de osteoporosis según técnica y localización.

Localización	Técnica	T-score a los 60 años	Clasificación WHO	Prevalencia osteoporosis (%)
Columna	QTC	-2.5	Osteoporosis	50
Columna	DXA lateral	-2.2	Osteopenia	38
Columna	DXA	-1.3	Osteopenia	14
Antebrazo	DXA	-1.4	Osteopenia	12
Cadera	DXA	-0.9	Normal	3

Hay que elegir el T- score más bajo de las localizaciones óseas donde se realizan la medición de la DXA central columna o cuello femoral y no existen estudios que avalen la media de ambas caderas para establecer el diagnóstico de OP (34). Es importante contemplar que siempre que se pueda tiene que realizarse la medición en el mismo paciente con el mismo equipo puesto que la precisión y reproducibilidad de las mediciones, expresada como coeficiente de variación, varía según el segmento óseo elegido y el aparato que se ha utilizado (3;139-141).

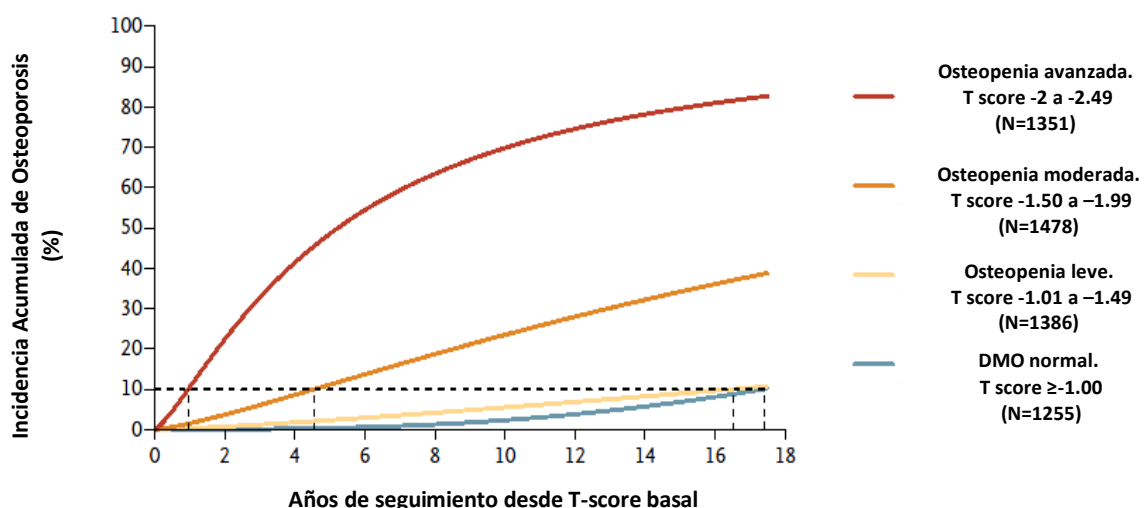
Las indicaciones para realizar una DXA se establecen en función de la sospecha ante la presencia de los siguientes criterios clínicos (nivel de evidencia 5 grado de recomendación D): (3;142;143)

1. Mujeres con menopausia precoz y la existencia de algún factor mayor de riesgo de fractura.
2. Mujeres posmenopáusicas y varones > 50 años con un factor mayor de riesgo de fractura como mínimo.

3. Antecedentes de fractura espontánea o con traumatismo de baja energía en personas mayores de 50 años.
4. Enfermedad o tratamiento crónico asociado a descenso de DMO (por ejemplo corticoides).
5. Mujeres > 65 años y varones con > 70 años, aún sin factores de riesgo conocidos, al menos en una ocasión, si el paciente lo solicita.
6. Evaluación de tratamiento farmacológico.
7. En caso de utilizar el FRAX[®], se recomienda realizar una DXA a mujeres a partir de los 65 con independencia de presentar factores de riesgo y menores de 65 años que presenten al menos riesgo de fractura mayor, según el FRAX[®], semejante al de una mujer de 65 años sin factores de riesgo (FRAX español 3,6%).

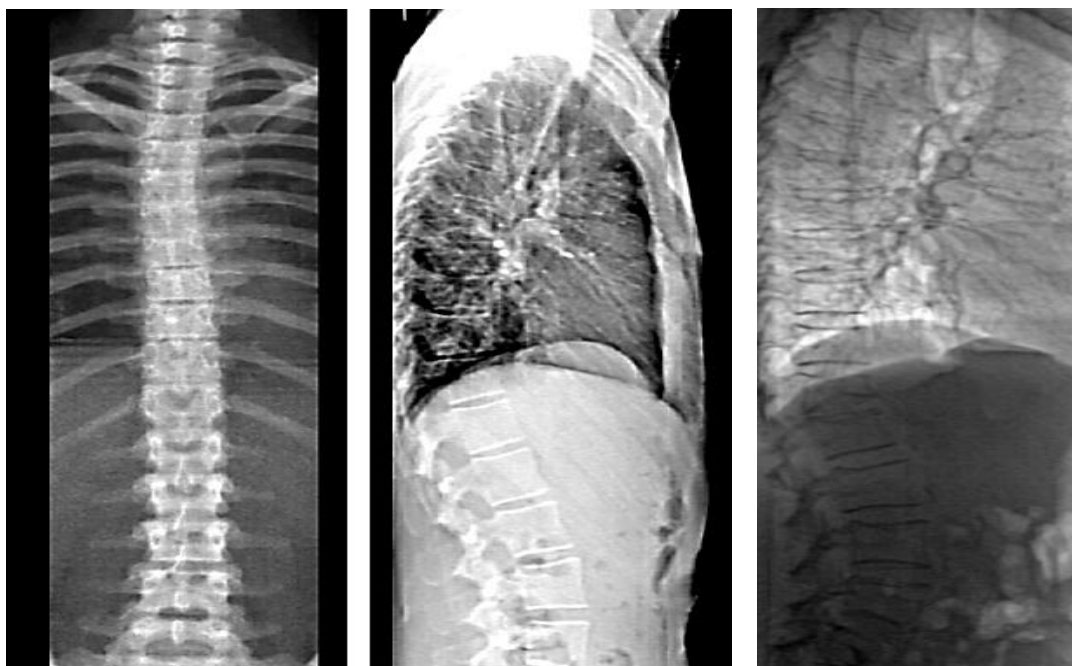
Recientemente se ha comunicado la importancia del *BMD (Bone Mineral Density) testing interval* como el tiempo estimado para que el 10% de las mujeres postmenopáusicas con DMO normal u osteopenia en sus diferentes grados (leve, moderada o severa) evolucionen a osteoporosis antes de presentar una fractura vertebral o de cadera sintomáticas, ajustada al uso de estrógenos y factores clínicos de riesgo. La incidencia acumulada del 10% en la evolución densitométrica a osteoporosis de mujeres postmenopáusicas con DMO normal en 16.8 años, mientras que los tiempos de progresión a un T-score menor de -2.5 DE en mujeres con osteopenia fueron de 17.3 (leve), 4.7 (moderada) y 1.1 años (severa), como se muestra en la ilustración 10 (144).

Ilustración 10. Incidencia acumulada de Osteoporosis según el T-Score basal en pacientes sin criterios de Osteoporosis según la OMS. Modificado de Gourlay ML et al (144).



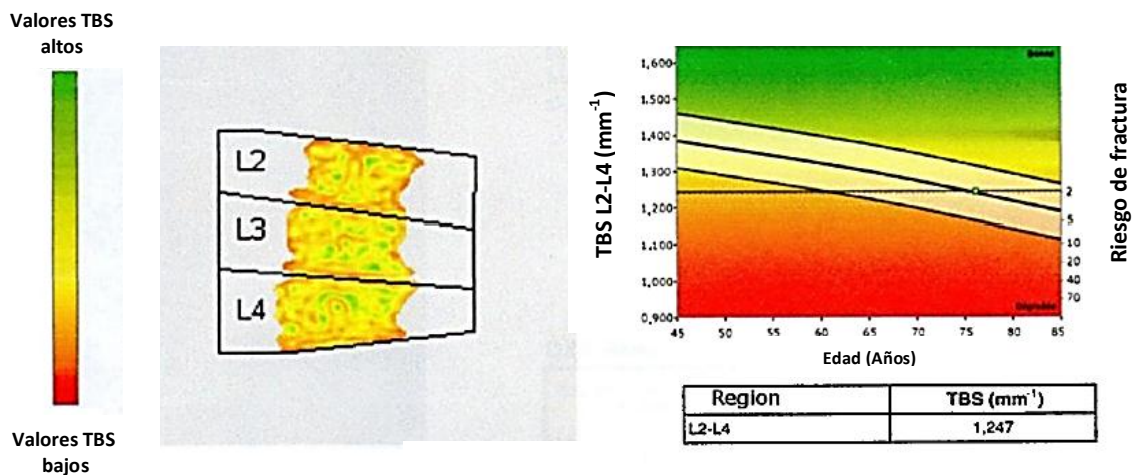
La DXA aporta otros parámetros adicionales a la DMO, de importancia clínica relevante que pueden ayudar a identificar a individuos con osteoporosis que tengan un alto riesgo de fracturas y que por tanto se beneficien de comenzar con tratamiento. La DXA puede incorporar un software denominado *Vertebral Fracture Assessment* (VFA) o Evaluación de Fracturas Vertebrales, que permite con una dosis muy baja de radiación detectar deformidades esqueléticas como escoliosis, cifosis en columnas dorsal y lumbar así como detectar fracturas en vértebras de éstas localizaciones, asociadas a un aumento de morbimortalidad (ilustración 11). La VFA frente a la radiología convencional aporta ventajas frente a la radiología convencional: menor dosis de exposición (10 microSieverts versus 800 microSieverts de las radiografías lateral y anteroposterior de columna dorsal y lumbar) por lo que puede emplearse como cribado de fracturas asintomáticas en la población general, además es más económica, tarda en realizarse unos pocos minutos, se realiza en la misma sesión de la DXA y algunos estudios han señalado una mayor sensibilidad y especificidad, excepto en vértebras dorsales altas. La VFA tiene un muy buen valor predictivo negativo, conllevando hasta en un tercio de los casos cambios en el manejo del paciente (seguimiento más estrecho, inicio de tratamiento...) (112;145-148).

**Ilustración 11. Proyecciones anteroposterior y laterales para la detección de fracturas vertebrales mediante la técnica *Vertebral Fracture Assessment* (VFA).
Modificado de Briot K (112).**



Otro parámetro obtenido de imágenes conseguidas se consigue en aparatos de DXA que contienen instalado el software para la medición del *trabecular bone score* o score trabecular óseo (TBS) y que es el expresado en forma de trabeculograma con valores de TBS. Mayor presencia de trabéculas óseas se representa mediante color verde y una baja densidad trabecular por colores amarillo y rojo. Al igual que la DMO se puede realizar para cada vértebra y cada región de interés, aunque de momento se realiza a nivel de columna lumbar (se está desarrollando para cadera). Los valores de TBS se correlacionan con la microarquitectura ósea de forma independiente a la DMO permitiendo detectar de forma efectiva a aquellos sujetos con fracturas (ilustración 12). Otros datos conseguidos con ésta técnica de imagen como la evaluación tridimensional de las vértebras y la evaluación de la composición corporal en áreas concretas están siendo estudiados (90).

Ilustración 12. Trabeculograma. Modificado de Briot K (112).



5.3.3.1. CRIBADO POBLACIONAL MEDIANTE DXA.

El cribado poblacional para el diagnóstico de OP mediante DXA no es coste efectivo puesto que existen discrepancias en cuanto a las indicaciones específicas de los valores densitométricos para adoptar estrategias terapéuticas en la población general para disminuir el riesgo de fractura (148-154). Debido a esto no existe un protocolo de cribado poblacional establecido y consensuado para identificar personas con OP, siendo necesaria la búsqueda de los casos ante constatación en la historia clínica de factores de riesgo clínicos para OP o fracturas por fragilidad, o la presencia de factores de riesgo clínicos (155). Sin embargo la DMO junto con factores de riesgo ya comentados anteriormente si es útil para el seguimiento de estos pacientes(3).

5.3.3.2. SEGUIMIENTO MEDIANTE DXA.

En mujeres que diagnosticadas de osteoporosis postmenopáusica se recomienda realizar DXA cada 2-3 años (152). No existe indicación de seguimiento antes de los dos años con DXA puesto que puede existir pérdida de DMO durante el primer año de tratamiento e inicio de ganancia a partir del segundo (156). Para detectar cambios significativos con un intervalo de confianza (IC) del 95%, estos deben ser, como mínimo, 2,8 veces el coeficiente de variación (cambio mínimo significativo). Aunque se pueden llegar a detectar diferencias en un 2% de DMO (cambio de la DMO lumbar $\pm 0,05$ g/cm²). Los mayores cambios de densidad se detectan en columna, aunque hay que considerar los artefactos que pueden producirse con frecuencia debido a los cambios degenerativos a ese nivel (3;157;158).

5.3.4 EVALUACIÓN DMO MEDIANTE RADIOLOGÍA CONVENCIONAL.

La radiología convencional no debe utilizarse para el diagnóstico de osteoporosis ya que se necesita una pérdida muy importante de masa ósea para que ésta sea detectada radiológicamente y un descenso en la DMO por esta técnica clásica de imagen no implica el diagnóstico de osteoporosis. Si nos aporta en algunos casos algunos signos de sospecha como son la disminución del grosor cortical, de trabéculas (por ejemplo a nivel de cuello femoral) (32).

Las radiografías de columna no son útiles para valorar el descenso de DMO, pero permiten el diagnóstico de fracturas, incluidas las asintomáticas, por lo que en pacientes con sospecha de osteoporosis o ya diagnosticados la radiología de columna lateral de columna dorsal y lumbar (con foco en la 8ª y 12ª vértebra dorsal) sigue siendo la técnica gold estándar para detectar esas fracturas, puesto que constituyen un factor de riesgo independiente para presentar fracturas en cualquier localización ósea(3;31;115;159-163). Más del 50% de las fracturas vertebrales son asintomáticas(106). No es imprescindible la realización de proyección anteroposterior en este screening inicial de fracturas no son imprescindibles(3). No debe emplearse la radiología convencional para detectar fracturas asintomáticas en la población general dado su coste y la radiación que supone(112).

5.4. PARÁMETROS DE LABORATORIO Y MARCADORES DE METABOLISMO ÓSEO.

Su realización es fundamental para realizar el diagnóstico diferencial con otras enfermedades que cursan con descenso de la DMO (164-168). Cuando nos encontremos con un paciente con alta sospecha de OP o ya diagnosticado hay que determinar una serie de parámetros como: hemograma, bioquímica que incluya: creatinina, fosfatasa alcalina, proteinograma, velocidad de sedimentación globular, calcio y fósforo en suero, y calciuria en orina de 24 h. También es recomendable en la primera visita medir la 25-hidroxivitamina D (25-[OH]-D3), los niveles de paratohormona (PTH) y hormonas tiroideas (3).

Los marcadores de remodelado óseo proporcionan información adicional y complementaria al estudio de la DMO (tabla 6). Entre los marcadores de formación ósea formados por osteoblastos y detectados en suero se encuentran la osteocalcina, la fosfatasa alcalina ósea y el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I. El principal producto sintetizado por los osteoblastos es el colágeno tipo I, pero su aplicabilidad es limitada para la práctica clínica porque su formación no es exclusiva del tejido óseo (3;169-172).

El aumento de marcadores de actividad osteoclástica y por tanto de resorción ósea se ha asociado con un aumento del riesgo de fracturas en pacientes con osteoporosis de forma independiente a la DMO (169;172). Entre ellos destacamos las piridolinas, los telopéptidos carboxi y aminoterminal del colágeno tipo I (C-TX en suero y N-TX en orina) y la fosfatasa ácida tartrato-resistente (FATR) 5b, isoforma de la enzima lisosomal FATR específica de los osteoclastos (3;169-172). Los niveles elevados de FATR 5b constituyen un factor de riesgo independiente para el desarrollo de fracturas vertebrales (173-175). Estos marcadores descritos aumentan la sensibilidad y especificidad con respecto a marcadores clásicos como son la fosfatasa alcalina total y la hidroxiprolina. Hay que recordar al valorar sus niveles que tienen un ritmo circadiano por lo que para una correcta interpretación hay que tener en cuenta su variabilidad biológica y la obtención de la muestra en la hora adecuada. No se recomienda la determinación sistemática de los marcadores óseos en el diagnóstico ni en el seguimiento clínico pero sí para clasificar en los pacientes en distintos grupos de riesgo de fractura, y monitorizar de forma precoz la respuesta al tratamiento tanto (eficacia antirresortiva y osteoformadora).(3;169-172).

En el caso de sospecha de una enfermedad se tienen que realizar todas las pruebas pertinentes para diagnosticarla como por ejemplo la inmunofijación en suero, orina o aspirado medular en caso de que estemos ante un paciente con sospecha de Mieloma Múltiple (3).

Tabla 6. Marcadores de formación y resorción ósea. Modificado de Khosla et al (172)

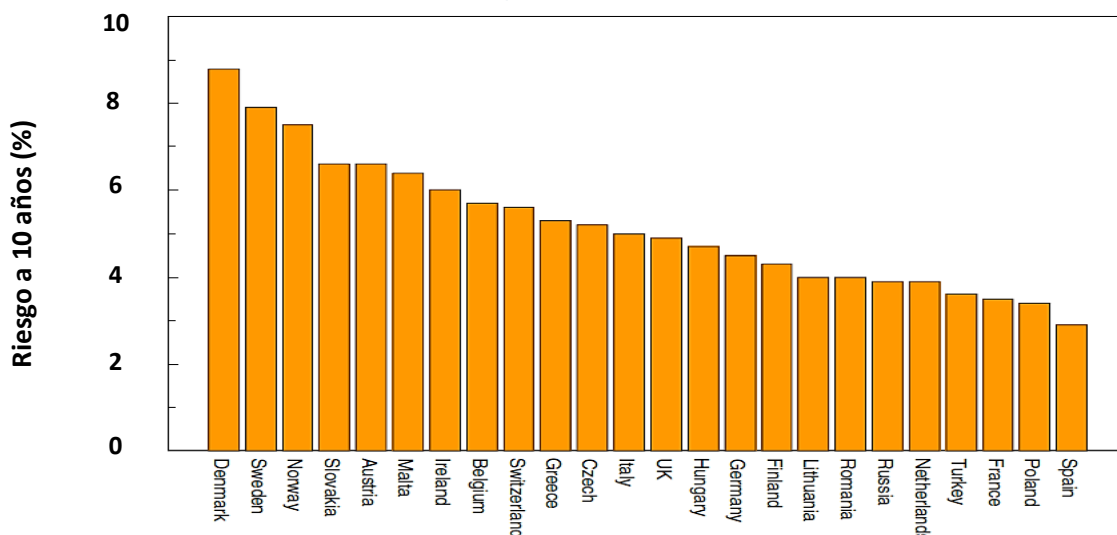
Marcadores de formación ósea.	
Suero	Fosfatasa alcalina ósea. Osteocalcina. Propéptido carboxiterminal del colágeno tipo I. Propéptido aminoterminal del colágeno tipo I.
Marcadores de resorción ósea.	
Suero	Región C-terminal del telopéptido del colágeno tipo I. Fosfatasa ácida tartrato-resistente. Telopéptido N del colágeno tipo I (NTX). Telopéptido C del colágeno tipo I (CTX).
Orina	Hidroxiprolina. Piridinolinas. Desoxipiridinolinas. Telopéptido N del colágeno tipo I (NTX). Telopéptido C del colágeno tipo I (CTX).

5.5. FRACTURE RISK ASSESSMENT TOOL (FRAX®).

La aplicación FRAX® (*Fracture Risk Assessment Tool*) es un instrumento online (<http://www.shef.ac.uk/FRAX/>) desarrollado en 2008 por la OMS que estima la probabilidad absoluta que tiene un determinado sujeto de tener fracturas mayores (cadera, columna vertebral, humero o muñeca) a 10 años y de manera exclusiva el riesgo de fractura de cadera en el mismo período, considerando en conjunto diversos factores de riesgo lo que aumenta la sensibilidad de la estimación sin perder sensibilidad en base a un algoritmo (89;113;114;176;177). Es frecuentemente empleada en mujeres postmenopáusicas y varones mayores de 50 años (178). La FRAX® permite clasificar a personas de alto riesgo que se beneficiarían de un tratamiento precoz y otras de bajo riesgo en los que el inicio de tratamiento no tendría un beneficio-riesgo ni un coste-beneficio aceptable. Hoy por hoy, es la herramienta “gold estándar” para establecer el riesgo de fractura osteoporótica (3).

Entre los factores de riesgo considerados por la FRAX® se encuentran la edad, el IMC y factores de riesgo incorporados como variables dicotómicas (presencia/ausencia del ítem) entre los que se incluyen: antecedente de fractura previa, antecedente parental de fractura de cadera, hábitos tóxicos como el tabaquismo o el consumo de alcohol (≥ 8 -10 gramos/día), ingesta prolongada de glucocorticoides, (dosis ≥ 5 mg/día de prednisona o equivalentes de otros esteroides durante 3 meses) diagnóstico confirmado de artritis reumatoide y otras causas de osteoporosis secundarias (Diabetes Mellitus tipo I, malnutrición o síndrome malabsortivo de larga evolución, menopausia antes de los 45 años, hipertiroidismo de larga evolución no tratado, hipogonadismo, Osteogénesis Imperfecta o enfermedad hepática crónica). A su vez también se incluye la posibilidad de introducir la DMO en cuello femoral, el T-score u otras escalas si las conocemos en una pestaña de selección y de esta forma optimizar el riesgo (89;176). La probabilidad de fractura es evaluada considerando el riesgo de fractura y el riesgo de muerte derivado de la misma. Estas probabilidades varían entre los diferentes países, como se observa en las diferencias entre los distintos países europeos (gráfico 4), y por ello hay la FRAX® es calibrada en función la epidemiología de las fracturas y las muertes relacionadas con las mismas de cada país, siendo actualmente 45 los países con posibilidad de aplicación. Como vemos en el gráfico 4 el riesgo de fractura de cadera en España es menor con respecto a los demás de países (12).

Gráfico 4. Probabilidad de fractura de cadera en mujeres con más de 65 años o T-Score < -2.5 o antecedente de fractura previa en distintos países de la Unión Europea. Índice de masa corporal establecido en 24 Kg/m^2 . Modificado de Kanis JA et al (12)



Así, pues para calcular el riesgo de fractura de una persona española mediante la FRAX®, accederíamos de forma online a la siguiente página con la que accederemos directamente a la FRAX® calibrada para la población española (versión 3.8) (<http://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.aspx?country=4>) (ilustración 13). Para facilitar la comprensión existe una pestaña en la esquina superior derecha que nos permite cambiar el idioma al castellano (89;113;114).

Ilustración 13. Captura de pantalla inicial de herramienta FRAX®.

FRAX® Herramienta de Evaluación de Riesgo de Fractura desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Inicio Herramienta de Cálculo Tablas FAQ Referencias Español

Herramienta de Cálculo

Por favor responda las preguntas siguientes para calcular la probabilidad de fractura a diez años sin DMO o con DMO.

país: España Nombre/ID: Sobre los Factores de riesgo

Cuestionario:

- Edad (entre 40-90 años) o fecha de nacimiento
Edad: A: M: D:
- Sexo ☐ Hombre ☐ Mujer
- Peso (kg)
- Estatura (cm)
- Fractura previa ☒ No ☐ Sí
- Padres con Fractura de Cadera ☒ No ☐ Sí
- Fumador Activo ☒ No ☐ Sí
- Glucocorticoides ☒ No ☐ Sí
- Artritis Reumatoide ☒ No ☐ Sí
- Osteoporosis secundaria ☒ No ☐ Sí
- Alcohol, 3 o más dosis por día ☒ No ☐ Sí
- DMO de Cuello Femoral
T-Score

Weight Conversion
Pounds → kg

Height Conversion
Inches → cm

00189616
Individuals with fracture risk assessed since 1st June 2011

Si por ejemplo queremos conocer el riesgo de fractura mayor y de fractura de cadera en una mujer de 60 años de edad, de 64 kg de peso, 165 cm de altura, fumadora con un T-score en cuello femoral de -2.7 DE sin otros factores de riesgo, solamente debemos introducir los datos (ilustración 14) y pulsar “Calcular”.

Ilustración 14. Captura de pantalla tras la introducción de datos en herramienta FRAX®.

FRAX® Herramienta de Evaluación de Riesgo de Fractura desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Inicio Herramienta de Cálculo Tablas FAQ Referencias Español

Herramienta de Cálculo

Por favor responda las preguntas siguientes para calcular la probabilidad de fractura a diez años sin DMO o con DMO.

país: España Nombre/ID: Sobre los Factores de riesgo

Cuestionario:

- Edad (entre 40-90 años) o fecha de nacimiento
Edad: 60 A: 1953 M: D:
- Sexo ☐ Hombre ☒ Mujer
- Peso (kg) 64
- Estatura (cm) 165
- Fractura previa ☒ No ☐ Sí
- Padres con Fractura de Cadera ☒ No ☐ Sí
- Fumador Activo ☐ No ☒ Sí
- Glucocorticoides ☒ No ☐ Sí
- Artritis Reumatoide ☒ No ☐ Sí
- Osteoporosis secundaria ☒ No ☐ Sí
- Alcohol, 3 o más dosis por día ☒ No ☐ Sí
- DMO de Cuello Femoral
T-Score -2.7 [Borrar] [Calcular]

Weight Conversion
Pounds → kg [Convert]

Height Conversion
Inches → cm [Convert]

00189616
Individuals with fracture risk assessed since 1st June 2011

De forma inmediata, observamos en una ventana roja que el IMC calculado de nuestra paciente es de 23.5 y que tiene un riesgo de fractura mayor a 10 años del 5.3% y de fractura de cadera del 2.6% (ilustración 15).

Ilustración 15. Captura de pantalla con datos del riesgo de fractura obtenido en aplicación FRAX®.

FRAX® Herramienta de Evaluación de Riesgo de Fractura desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Inicio Herramienta de Cálculo Tablas FAQ Referencias Español

Herramienta de Cálculo

Por favor responda las preguntas siguientes para calcular la probabilidad de fractura a diez años sin DMO o con DMO.

país: España Nombre/ID: Sobre los Factores de riesgo

Cuestionario:

- Edad (entre 40-90 años) o fecha de nacimiento
Edad: 60 A: 1953 M: D:
- Sexo ☐ Hombre ☒ Mujer
- Peso (kg) 64
- Estatura (cm) 165
- Fractura previa ☒ No ☐ Sí
- Padres con Fractura de Cadera ☒ No ☐ Sí
- Fumador Activo ☐ No ☒ Sí
- Glucocorticoides ☒ No ☐ Sí
- Artritis Reumatoide ☒ No ☐ Sí
- Osteoporosis secundaria ☒ No ☐ Sí
- Alcohol, 3 o más dosis por día ☒ No ☐ Sí
- DMO de Cuello Femoral
T-Score -2.7 [Borrar] [Calcular]

Weight Conversion
Pounds → kg [Convert]

Height Conversion
Inches → cm [Convert]

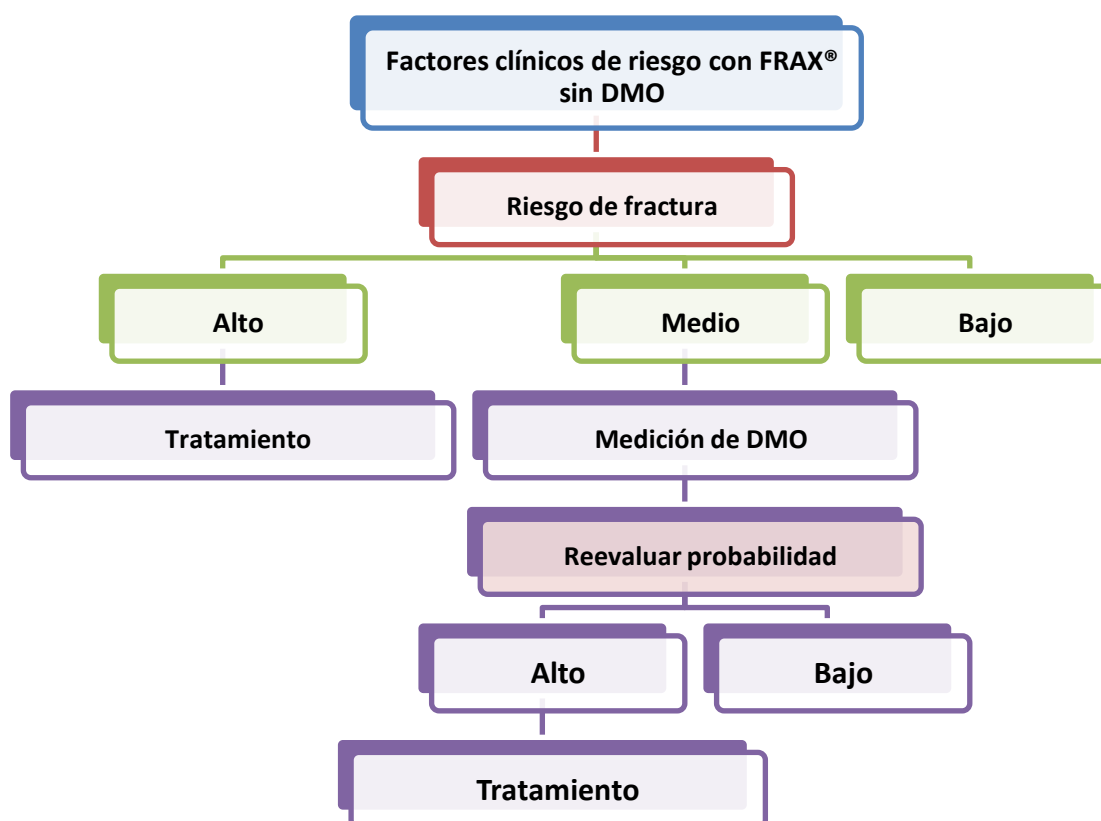
00189616
Individuals with fracture risk assessed since 1st June 2011

IMC: 23.5
The ten year probability of fracture (%)
con DMO

Major osteoporotic	5.3
Hip fracture	2.6

Algunos autores han sugerido que un riesgo absoluto de fractura inferior al 10% en 10 años sería bajo, mientras que uno superior al 20% sería alto. Aquellos pacientes que se situaran $\geq 10\%$ y $< 20\%$ se catalogarían como de riesgo moderado. Un riesgo de fractura mayor del 15% en la población española se considera muy específico de osteoporosis (3). Así pues nuestra paciente problema sería de bajo riesgo. Se han propuesto diversos algoritmos de tratamiento en función del riesgo de fractura en base a estos parámetros (179) (ilustración 16)

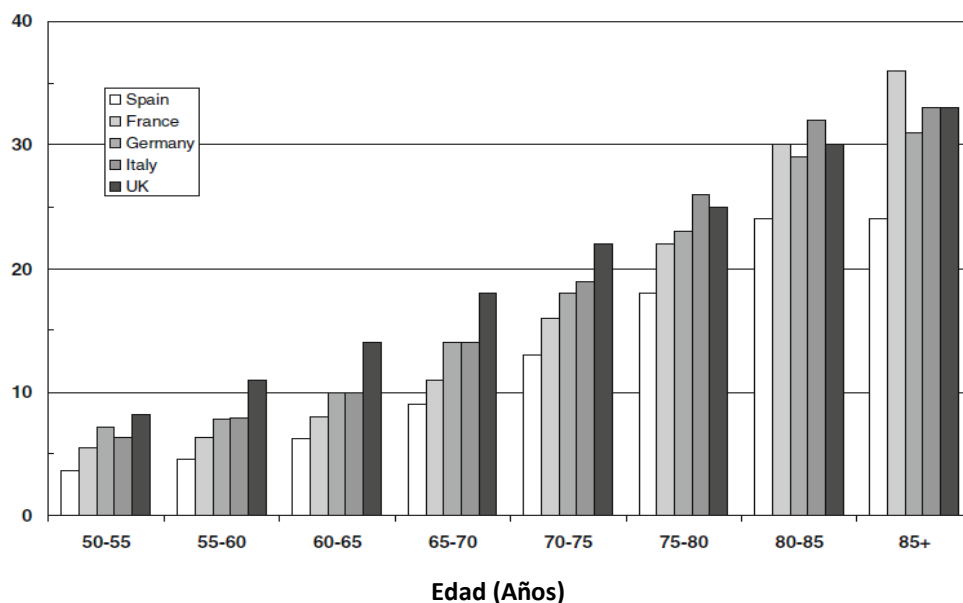
Ilustración 16. Algoritmo de manejo terapéutico en función del riesgo de fractura.
Modificado de Kanis JA et al (179)



La FRAX® nos puede ayudar a definir de forma más precisa aquellos pacientes que se beneficiarían de una DXA y/o de una intervención terapéutica precoz y aquellos en los que no sería necesario realizar ninguna de estas medidas. Para ello se eligen unos umbrales de riesgo en los que hay que tener en cuenta aspectos de índole económica y epidemiológica diferentes entre los diferentes sistemas de Salud de los países, ya que el riesgo de fracturas puede variar entre los distintos países (ilustración 17) (12).

Ilustración 17. Riesgo de fractura osteoporótica a 10 años determinado mediante la herramienta FRAX® en mujeres con antecedente previo de fractura en los distintos países de la Unión Europea. Índice de masa corporal establecido en 24 Kg/m². Modificado de Kanis JA et al (12).

Riesgo de fractura a 10 años (%)

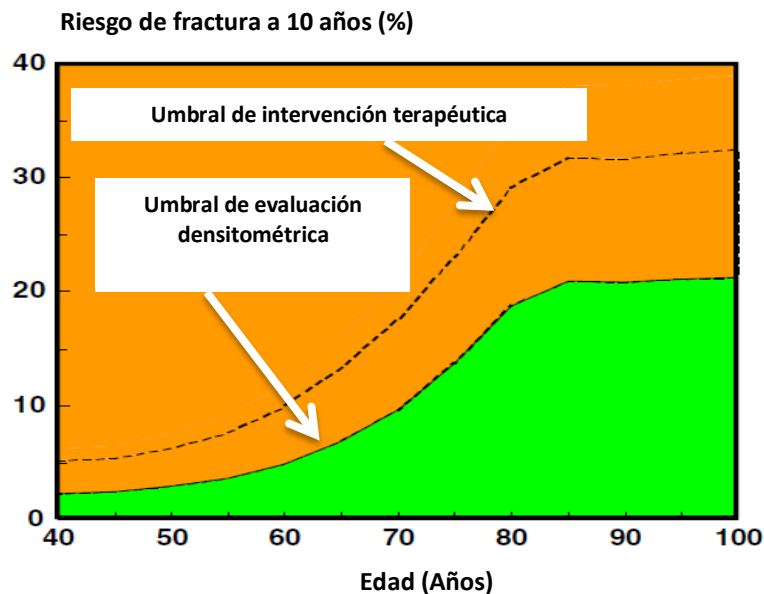


Se definen en base a la FRAX® sin necesidad de incluir la DMO, una probabilidad umbral por debajo de la cual no estarían indicadas ni la medición de la DMO ni el inicio de tratamiento (umbral inferior de riesgo), y otra probabilidad donde el tratamiento estaría totalmente indicado (umbral superior de riesgo). En base a estas probabilidades obtenemos dos puntos de corte: uno en el que sería recomendable la evaluación de la DMO (umbral de evaluación mediante DMO) y otra donde además de la medición de la DMO estaría indicado comenzar con tratamiento (Umbral de intervención terapéutica) (179). En la tabla 7 y en el gráfico 5 se muestran dichos umbrales establecidos a nivel de los países de España, Francia, Alemania, Italia y Reino Unido. (12;179)

Tabla 7. Umbrales de intervención y evaluación del riesgo de fractura a 10 años obtenidos mediante la herramienta FRAX® ajustado a la edad (Media de las poblaciones de España, Francia, Alemania, Italia y Reino Unido).

Edad (años)	Riesgo de fractura a 10 años (%)	
	Umbral de intervención terapéutica	Umbral de evaluación
50-54	6.3	2.9
55-59	7.6	3.6
60-64	9.9	4.9
65-69	13.4	6.9
70-74	17.6	9.7
75-79	23.0	13.7

Gráfico 5. Umbrales de intervención y evaluación del riesgo de fractura a 10 años obtenidos mediante la herramienta FRAX® ajustado a la edad (Media de las poblaciones de España, Francia, Alemania, Italia y Reino Unido). Modificado de Kanis JA et al (12).



Así al calcular en un individuo la FRAX® el riesgo individual de fractura de un sujeto observaríamos si supera la línea de intervención terapéutica. En la tabla observamos que el punto de intervención terapéutica para personas entre 60 y 64 años se establecería en riesgo de fractura a 10 años del 9,9%. Si en una persona situada en esa franja de edad obtuviéramos mediante la FRAX® un riesgo a los 10 años del 15% estaría indicado comenzar con medidas terapéuticas, mientras que si fuera del 7% deberíamos realizar una DXA para volver a calcular el riesgo teniendo en cuenta la DMO (179). Así pues, aquellos sujetos que presenten una probabilidad por encima del umbral bajo y por debajo del dintel de intervención terapéutica serían candidatos a una medición de la DMO con DXA central y reevaluar su riesgo de fractura a 10 años y comprobar si queda por encima o por debajo de la línea marcada para adoptar estrategias de tratamiento.

No obstante, la FRAX® presenta algunas limitaciones, como no analizar de forma cuantitativa los factores de riesgo (mayor número de cigarrillos, ingesta de alcohol, diferentes dosis de esteroides o antecedente de un mayor número de fracturas) (180-183). Además el T-score y el Z-score varían en función del aparato de DXA con el que se evalúan por lo que la reproducibilidad puede estar algo limitada por la variabilidad de los resultados entre diferentes países e incluso centros. Otra limitación es la exclusión de la medida de la DMO en columna lumbar, recomendada en numerosas guías y la no incorporación en los ítems de medidas de DMO en localizaciones periféricas. Por estos motivos entre otros, existen discrepancias en fijar la gradación que supone el valor obtenido mediante esta aplicación. Por este motivo se recomienda su uso en aquellos pacientes en los que se valore realizar una DXA, iniciar tratamiento para la osteoporosis o tengan una edad superior a los 65 años de edad (3;12).

6.- TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS.

La osteoporosis es, hoy por hoy, una enfermedad incurable. El objetivo clínico principal en su manejo es mejorar en lo posible la calidad ósea y reducir el riesgo de fractura. Para ello se dispone de numerosos fármacos, algunos de ellos muy costosos y que han de ser administrados de forma continuada a largo plazo, hecho que se asocia a elevadas tasas de abandono y la falta de adherencia, junto con posibilidad de aumento de efectos adversos a largo plazo. De aquí el interés en la comunidad médica por continuar desarrollando nuevos tratamientos para el tratamiento de la osteoporosis. En resumen las estrategias empleadas en la actualidad son:

6.1. ESTRATEGIAS PREVENTIVAS Y MEDIDAS NO FARMACOLÓGICAS.

Existen una serie de medidas generales que deben de recomendarse a toda la población, y en especial a los pacientes con osteoporosis, como son la práctica de ejercicio físico, prevenir las caídas, evitar el tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol llevar una dieta equilibrada capaz de proporcionar un aporte adecuado de calcio y vitamina D.

6.1.1. EJERCICIO FÍSICO Y PREVENCIÓN DE LAS CAÍDAS.

La inmovilización es una causa importante de pérdida de hueso, por lo que debe de evitarse en la medida de lo posible. Aunque la cantidad óptima de ejercicio en los pacientes con osteoporosis no se conoce con exactitud (184), se recomienda evitar el sedentarismo y realizar una actividad física moderada, específica para cada individuo, teniendo en cuenta su edad, estado físico y la presencia de otras enfermedades (3). Además, se ha demostrado que el ejercicio físico moderado-intenso incrementa la masa ósea de los jóvenes (185;186), y también en los adultos, aunque de forma menos intensa y por otro lado, el aumento de la fuerza que se produce con el ejercicio físico, puede prevenir las caídas ya que mejora la confianza y la coordinación, al mismo tiempo que mantiene la masa ósea mediante la estimulación de la formación de hueso y la disminución la resorción ósea (187).

Para disminuir el riesgo de caídas, es importante actuar también sobre otros factores modificables, como la corrección de la disminución de la agudeza visual, la reducción del consumo de medicamentos que alteran el estado de alerta/equilibrio y por mejorar o adaptar el entorno en el que vive el paciente (iluminación insuficiente, barandillas, etc.) (188). Sin embargo, no hay evidencia científica de que estas medidas disminuyan de forma significativa la tasa de fracturas (12;189).

6.1.2. NUTRICIÓN.

La ingesta diaria adecuada de calcio, vitamina D y proteínas contribuye a reducir el riesgo de osteoporosis y fracturas en las etapas más tardías de la vida (190). También se recomienda una exposición solar moderada y evitar el exceso de sal.

Se recomienda una ingesta diaria de al menos 1000 mg de calcio y 800 UI de vitamina D o un nivel sérico de 25-OH vitamina D ≥ 30 ng/mL (75 mmol/L), en hombres y mujeres mayores de 50 años (191). Las fuentes dietéticas de calcio son la opción preferida, y los suplementos de calcio sólo deben ser dirigidos a aquellos que no obtienen suficiente calcio de su dieta. Los principales alimentos ricos en calcio son los productos lácteos que además contienen nutrientes adicionales que contribuyen a la salud de los huesos (192).

6.1.3. SUPLEMENTOS DE CALCIO Y VITAMINA D.

En ocasiones, la dieta habitual no aporta los requerimientos cálcicos mínimos, siendo necesario añadir suplementos farmacológicos. Los suplementos de calcio administrados de forma aislada, reducen la pérdida de masa ósea pero no han demostrado un efecto significativo sobre la reducción de fracturas en la osteoporosis posmenopáusica (193-196). En varios estudios, los suplementos de calcio en las mujeres mayores se asociaron a un mayor riesgo de eventos cardiovasculares (75;76;81). Sin embargo, se trata de un tema controvertido, debido a que este aumento se produjo principalmente en personas con ingesta normal de calcio en la dieta (81) y a que en un ensayo aleatorizado controlado publicado posteriormente en 2011, tampoco se observó un aumento de la enfermedad vascular aterosclerótica (196).

Aproximadamente el 50% de los pacientes con osteoporosis presentan concentraciones séricas de vitamina D bajas, recomendándose suplementos de 800-1.000 U de vitamina D en estos casos. La eficacia de los suplementos de vitamina D en la prevención de fracturas es controvertida (74;197;198)

6.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.

El tratamiento farmacológico de la osteoporosis, está indicado en Mujeres posmenopáusicas que cumplan uno de los siguientes requisitos (3):

- Fractura por traumatismo de baja intensidad, independientemente del valor de DMO.
- Osteoporosis (DMO $< -2,5$ DE en la puntuación T, en columna y/o fémur) con o sin fracturas, valorando los factores de riesgo.
- La utilización del algoritmo FRAX® puede ayudarnos en la toma de decisión cuando consideremos la instauración de un tratamiento farmacológico

Se debe valorar la posibilidad de tratamiento farmacológico de forma individualizada en las siguientes situaciones (3):

- Menopausia precoz (< 45 años) según DXA y/o otros factores de riesgo.
- Osteopenia (DMO entre -1 y $-2,5$ DE en la puntuación T). En este supuesto, el tratamiento se reservará a casos muy concretos, como serían las osteopenias intensas cercanas a la osteoporosis en las mujeres más jóvenes y con factores de riesgo alto de fractura.

El objetivo fundamental del tratamiento farmacológico en la osteoporosis es reducir el riesgo de fractura. Los fármacos antiosteoporóticos empleados en la actualidad se clasifican en:

- Antirresortivos o anticatabólicos: inhiben la resorción ósea actuando sobre los osteoclastos o sus precursores. Disminuyen la tasa de activación del remodelado óseo, incrementan la densidad mineral ósea y preservan la microarquitectura del hueso.
- Anabólicos: actúan sobre los osteoblastos o sus precursores. Producen un aumento del remodelado óseo, con un incremento de la formación de hueso mayor que la tasa de resorción, por lo que aumentan la masa y la resistencia del hueso.
- Fármacos de acción mixta: muestran una combinación de ambos mecanismos.

6.2.1. FÁRMACOS ANTIRRESORTIVOS O ANTICATABÓLICOS.

6.2.1.1. BIFOSFONATOS.

Son actualmente los fármacos más utilizados y la primera línea de tratamiento de la osteoporosis (NE 1a; GR A) (3). Inhiben la resorción ósea al actuar sobre los osteoclastos, disminuyendo tanto su reclutamiento como su funcionalidad, e induciendo su apoptosis (199). No se dispone de suficiente evidencia para recomendar un bifosfonato u otro, puesto que la mayor parte de ensayos clínicos con bifosfonatos en los que se mide la reducción de fracturas son frente a placebo (200-202).

Su biodisponibilidad oral está en torno a 1% de la dosis ingerida, y se ve disminuida por los alimentos, calcio, hierro, café, té y zumo de naranja. El 50% se deposita en el hueso y el resto se excreta en la orina, siendo su vida media en el hueso muy prolongada (203). Se deben tomar después de un ayuno prolongado (generalmente a primera hora de la mañana) y con abundante agua para minimizar la posibilidad de lesiones esofágicas, posteriormente se debe esperar al menos media hora para consumir alimentos sólidos o líquidos distintos de agua. El tratamiento con bifosfonatos requiere de la ingesta adecuada de calcio y vitamina D. Esta circunstancia hace que, en la práctica, los pacientes deban recibir suplementos de calcio y vitamina D por vía oral para asegurar la eficacia del tratamiento antirresortivo (3).

Aunque no existe consenso sobre la duración adecuada del tratamiento con bifosfonatos, se aconseja un periodo medio de 5 años, a partir del cual se deberá evaluar la continuación, la suspensión temporal o definitiva del tratamiento o su sustitución por otro fármaco (3).

Entre los bifosfonatos empleados en la Osteoporosis se encuentran:

a) Etidronato:

El etidronato incrementa la masa ósea y reduce moderadamente el riesgo de fracturas vertebrales en mujeres con osteoporosis (201;204). Sin embargo, no se ha observado una reducción significativa en el riesgo de fracturas de cadera y no vertebrales. Es importante señalar que su uso continuado puede provocar osteomalacia (205).

b) Alendronato:

A diferencia del etidronato, el alendronato reduce de forma significativa no solo el riesgo de fracturas vertebrales, sino también las no vertebrales, incluidas las de cadera. Aunque no se conoce la duración óptima del tratamiento, se ha observado que a los 5 años de suspender el fármaco tras 5 años de tratamiento, se produce una reducción en la DMO lumbar y de cadera (206), por lo que se puede mantener el tratamiento a durante 10 años (207) o realizar un descanso de 5 años para posteriormente volver a reintroducirlo (3).

c) Risedronato:

Es eficaz en la reducción del riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales, incluidas las de cadera (208-210).

d) Ibandronato:

Está demostrada su eficacia en la prevención de fracturas vertebrales. No presenta eficacia en la fractura de cadera (211-214). Se puede administrar de forma intravenosa trimestralmente, mejorando así el cumplimiento terapéutico (3).

e) Zoledronato:

Bifosfonato de uso exclusivo por vía intravenosa y de administración anual. Eficaz para reducir la incidencia de fracturas vertebrales, no vertebrales y de cadera (215-217). Se ha observado una reducción de la mortalidad global en los pacientes con fractura de cadera, aunque no existe una explicación claramente definida de este efecto (3).

En la tabla 8 se refleja la posología y la vía de administración de los diferentes bifosfonatos.

Tabla 8. Vía de administración y posología de los principales bifosfonatos empleados en la Osteoporosis.

Fármaco	Posología oral diaria	Posología oral larga	Posología intravenosa
ETIDRONATO	400 mg/día en pauta cíclica de 14 días cada tres meses (no más de 20 ciclos)		
ALENDRONATO	10 mg/día	70 mg/semana	
RISEDRONATO	5 mg/día	35 mg/semana 150 mg/mes (2 días 75 mg)	
IBANDRONATO		150 mg/mes	3 mg/3 meses
ZOLEDRONATO			5 mg/año

Los bifosfonatos orales están contraindicados o deben ser empleados con precaución en pacientes con alteraciones esofágicas o con trastornos que retrasen el vaciamiento esofágico, como la estenosis o la acalasia. También están contraindicados en caso de imposibilidad de permanecer en posición sentada erguida o en bipedestación durante el tiempo necesario tras la administración. Todos los bifosfonatos están contraindicados en caso de hipocalcemia y no se recomienda su empleo en insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina inferior a 30 mL/min). Además, deben emplearse con precaución en los pacientes con otro tipo de trastornos del aparato digestivo como gastritis, duodenitis, úlcera péptica, etc (3).

Aunque el perfil general de seguridad de los bifosfonatos es aceptable, se ha comunicado una serie de eventos adversos. El problema de seguridad mejor conocido de los bifosfonatos es la toxicidad gastrointestinal, que puede llegar a comprometer el tratamiento, pero también se han descrito efectos adversos a otros niveles, que describimos a continuación (3):

a) Efectos gastrointestinales:

Pueden provocar: dispepsia, dolor abdominal, estreñimiento, diarrea, flatulencia, gastritis, náuseas, esofagitis, duodenitis y glositis. Son los efectos adversos más frecuentes. No se han evidenciado diferencias en la incidencia de este tipo de efectos adversos entre los bifosfonatos orales e intravenosos. Sin embargo, especial mención merecen las alteraciones a nivel esofágico que pueden originar los bifosfonatos orales (3).

b) Osteonecrosis mandibular (ONM):

Efecto adverso raro pero grave que se puede presentar tras meses o años de tratamiento. Se ha asociado a extracciones dentales o infecciones locales (incluyendo osteomielitis) en pacientes oncológicos que recibían bifosfonatos de administración intravenosa; además, la mayoría de los pacientes recibían quimioterapia y corticosteroides. Sin embargo, también se ha observado osteonecrosis mandibular en pacientes con osteoporosis tratados con bifosfonatos de administración oral. Entre las recomendaciones publicadas en este sentido, destacan las de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Un paciente tiene ONM asociada a bifosfonatos si tiene las siguientes tres características: 1) Hueso expuesto o necrótico en la región maxilofacial que ha persistido durante más de ocho semanas, 2) Ausencia de historia de irradiación en la región maxilar y 3) Tratamiento actual o previo con un bifosfonato. A su vez se definen tres estadios en la ONM establecida: estadio 1 (asintomático), estadio 2 (dolor y pruebas clínicas de infección), estadio 3 (además, presencia de complicaciones) (3;218). Las recomendaciones incluyen una higiene y revisión bucal correcta, y en caso de procedimiento odontológico invasivo (exodoncia o implante), esperar a que finalice el proceso de cicatrización para pautar un bifosfonato. Por otro lado, existe controversia sobre la actitud que se debe seguir en aquellos pacientes que ya estén tomando bifosfonatos, desde la interrupción del tratamiento durante 3-6 meses hasta el uso del marcador Telopéptido C del colágeno tipo I para estratificar el riesgo (3).

c) Fibrilación auricular:

En el ensayo HORIZON (3;215), el grupo tratado con zoledrónico presentó una mayor incidencia de arritmias, en concreto fibrilación auricular grave (1,3% vs 0,5%, $p < 0,001$) que el grupo tratado con placebo. La mayor parte de los casos ocurre pasados 30 días de la administración. Sin embargo, con los datos actuales no se puede concluir que la fibrilación auricular constituya un efecto de clase de los bifosfonatos (3).

d) Trastornos de la mineralización ósea:

El etidronato administrado de forma continua induce defectos en la mineralización (osteomalacia) a la misma dosis que inhibe la resorción, por este motivo se estableció su administración en pauta cíclica intermitente. Por otro lado, se han descrito casos de fracturas de estrés atípicas en pacientes tratados con alendronato durante períodos prolongados (entre 18 meses y 10 años) (3).

e) Otros efectos adversos:

Al comienzo del tratamiento pueden aparecer síntomas transitorios de tipo pseudogripal, con fiebre y malestar general. También se han descrito dolores osteomusculares, cefalea, afectación ocular inflamatoria, hipocalcemia e incremento de la creatinina sérica e insuficiencia renal (3).

En caso de evento adverso relevante con el uso de bifosfonatos, se recomienda la suspensión del mismo y valorar la indicación de un fármaco con mecanismo de acción diferente (NE 5; GR D) (3).

6.2.1.2. MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (MSRE).

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos: tienen carácter agonista sobre el tejido óseo (por lo que favorecen su mantenimiento) y antagonista sobre la mama y el endometrio. Dos moléculas de este grupo están autorizadas en nuestro país para la osteoporosis: raloxifeno y bazedoxifeno (3).

a) Raloxifeno:

Se recomienda como segunda línea de tratamiento de la Osteoporosis postmenopáusica (NE 1a; GR A) (3). El raloxifeno disminuye la pérdida de DMO y reduce el riesgo de fracturas vertebrales en mujeres con OP posmenopáusica (219), pero no reduce el riesgo de fracturas no vertebrales (220). Además, disminuye los niveles séricos de colesterol y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, aunque no se ha demostrado una reducción de la enfermedad coronaria en los pacientes sometidos a este tratamiento. También disminuye la incidencia de cáncer de mama con receptor estrogénico positivo (221).

Los efectos adversos más frecuentes son sofocos, calambres en las piernas, síndrome gripal y edema periférico. Merecen especial mención los episodios tromboembólicos venosos, que incluyen la trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y trombosis venosa de la retina. Como consecuencia, se debe suspender el tratamiento con raloxifeno en caso de inmovilización prolongada, debido al riesgo de tromboembolismo (222;223). Está contraindicado en caso de insuficiencia hepática, insuficiencia renal severa, sangrado uterino inexplicado, cáncer de endometrio y en mujeres con historia de episodios tromboembólicos venosos (3).

b) Bazedoxifeno:

Constituye una alternativa al raloxifeno en el tratamiento de la OP posmenopáusica (NE 1c; GR B) (3). El bazedoxifeno ha demostrado su acción protectora en la pérdida de DMO y la reducción de fracturas vertebrales en mujeres con osteoporosis posmenopáusica, pero al igual que el raloxifeno, no ha demostrado eficacia en la reducción de fracturas no vertebrales, excepto en el análisis post hoc de la población con alto riesgo de fractura (224;225).

Al igual que raloxifeno, bazedoxifeno está contraindicado en caso de sangrado uterino inexplicado, cáncer de endometrio y en mujeres con historia de episodios tromboembólicos venosos. Las reacciones adversas más frecuentes son los sofocos y los espasmos musculares (incluidos calambres en las piernas). También se han observado otros como somnolencia, hipersensibilidad, sequedad de boca, urticaria, edema periférico y elevaciones sanguíneas de triglicéridos y enzimas hepáticas. Al igual que con raloxifeno, hay un riesgo incrementado de tromboembolismo venoso (3).

c) Terapia hormonal sustitutiva (THS):

Los estrógenos actúan aumentando la absorción intestinal de calcio, disminuyendo la calciuria, originando un balance de calcio positivo; y, disminuyendo el recambio óseo frenando la acelerada actividad osteoclástica. Actualmente, la THS no se debe recomendar para el tratamiento de la OP posmenopáusica como fármaco de primera línea por el balance riesgo/beneficio de la misma, excepto en el caso de mujeres con menopausia precoz, con intensa sintomatología climatérica o en el caso de no poderse administrar otros fármacos para la osteoporosis por efectos adversos o ineficacia (NE 1c; GR B). La principal indicación de la Terapia con estrógenos-terapia con estrógenos /progestágenos (TE-TEP) sistémica es tratar los síntomas moderados a graves de la menopausia (por ejemplo, los síntomas vasomotores). Cuando los síntomas se controlan o cesan, se debe considerar la continuación de dicha terapia hormonal sopesando sus beneficios y riesgos. (3). Aunque, los estrógenos pueden reducir la incidencia de fracturas vertebrales y periféricas, son inferiores a otros fármacos como los bifosfonatos (226;227). Además, existe evidencia de que la THS aumenta el riesgo de cáncer de mama, cardiopatía isquémica, accidente vascular cerebral y tromboembolismo venoso (228).

d) Calcitonina:

La calcitonina es una hormona que participa en la regulación del metabolismo del calcio, inhibiendo la resorción ósea mediante la reducción de la actividad de los osteoclastos. Por vía intranasal a dosis de 200 UI diarias se puede administrar de forma preventiva y como segunda línea de tratamiento en la Osteoporosis postmenopáusica, después de los bifosfonatos, pudiendo estar indicada en el tratamiento de las fracturas vertebrales recientes y sintomáticas por vía parenteral (NE 1c; GR B) (3).

La calcitonina ha demostrado prevenir la pérdida de DMO en la columna (229), reducir el riesgo de nuevas fracturas vertebrales en mujeres posmenopáusicas con fracturas vertebrales previas, pero no disminuye el riesgo de fracturas periféricas (230). Por otro lado, tiene un efecto analgésico en pacientes con fracturas vertebrales y su eficacia parece mantenerse a largo plazo.(3). En este año 2013 tras la correspondiente decisión de la Comisión Europea, la Agencia Española del Medicamento y los productos Sanitarios (AEMPS) ha procedido a suspender la autorización de comercialización de los medicamentos con calcitonina de administración intranasal debido a que su uso prolongado presenta un balance beneficio/riesgo desfavorable tras conocerse los resultados de nuevos ensayos clínicos que indicaron un ligero incremento de riesgo de tumores asociado a tratamientos prolongados.

Considerando lo dictaminado por la Comisión Europea la AEMPS ha prohibido la prescripción y la dispensación de calcitonina intranasal a los profesionales sanitarios, mientras que los preparados de calcitonina inyectable deben de utilizarse durante el menor tiempo posible y a la mínima dosis eficaz. La calcitonina inyectable tiene indicación autorizada en la prevención de pérdida aguda de masa ósea debida a inmovilización repentina, tratamiento de la enfermedad de Paget en situaciones de refractariedad y en el tratamiento de la hipercalcemia por cáncer. Para la prevención de pérdida aguda de masa ósea debida a inmovilización repentina, como es el caso de pacientes con fracturas osteoporóticas recientes, se recomienda una dosis de 100 UI/día o 50 UI dos veces al día durante dos semanas, sin exceder las cuatro semanas de tratamiento. Para el tratamiento de la enfermedad de Paget, el tratamiento no debe prolongarse más de tres meses, sin embargo, en circunstancias excepcionales como el riesgo de fractura patológica inminente, este puede prolongarse hasta un máximo recomendado de seis meses (231).

e) Denosumab:

El Denosumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el ligando del activador del receptor nuclear del factor- κ B (RANKL) que inhibe la formación, activación y supervivencia de los osteoclastos. Está autorizado para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica con riesgo alto de fractura por vía subcutánea. Su efecto es reversible, dado que la inhibición que produce en la resorción ósea desaparece rápidamente conforme declinan sus niveles séricos (232). Este fármaco reduce el riesgo de nuevas fracturas vertebrales un 68% frente a placebo a los 3 años de tratamiento, el riesgo de fracturas de cadera en un 40%, el de fracturas no vertebrales en un 20% y el de fracturas múltiples (233). Es eficaz en pacientes previamente tratados con alendronato. Reduce los niveles de los biomarcadores de remodelado óseo, más rápida e intensamente que el alendronato (234;235). También produce incrementos marcados de DMO en columna lumbar, cadera total y cuello femoral, radio distal y cuerpo total, desde los 12 meses de tratamiento, mayores que con el alendronato (236;237). Aunque se ha descrito un leve aumento de infecciones urinarias y cutáneas, parece que la incidencia global de eventos adversos es similar a la de placebo en cuanto a infecciones en general, cáncer, hipocalcemia y eventos cardiovasculares (238)

6.2.2. FÁRMACOS ANABÓLICOS.

6.2.2.1. ANÁLOGOS DE LA PARATOHORMONA (PTH).

La hormona paratiroidea endógena (PTH) es el principal mediador del metabolismo del calcio y fósforo a nivel renal y óseo. Administrada de forma intermitente estimula la formación del hueso al activar a los osteoblastos. Los fármacos derivados de la PTH se pueden considerar, por tanto, anabólicos. Se pueden recomendar como fármacos de primera línea para el tratamiento de la osteoporosis con elevado riesgo de fractura durante un tiempo máximo de 24 meses (NE 1b; GR A)(3). Se administran diariamente por vía subcutánea y de forma continuada entre 18 y 24 meses. Una vez que finaliza el ciclo de 24 meses, se debe administrar otro tratamiento antiosteoporótico (bifosfonato, ranelato de estroncio) para evitar la pérdida de la masa ósea obtenida. En este momento están comercializados dos fármacos que comparten mecanismo de acción con la PTH:

a) Teriparatida:

Es el fragmento activo (N-terminal 1-34) de la PTH endógena, obtenido mediante tecnología del ADN recombinante (3).

b) Hormona paratiroidea humana recombinante 1-84 (rPTH):

Es idéntica al polipéptido natural de 84 aminoácidos intacto (3).

La principal diferencia farmacocinética es que la teriparatida, se mantiene elevada menos de 3 horas, mientras que la rPTH lo hace hasta 9 horas. La rPTH reduce la incidencia de fracturas vertebrales (con y sin fractura previa) y no vertebrales, aunque no las fracturas de cadera (239). Ambas son superiores al alendronato en el incremento de la DMO (240). Los efectos adversos más comunes para la teriparatida son dolor en las extremidades, calambres, náuseas, mareo y cefalea. Para la rPTH, los efectos secundarios más frecuentes son la hipercalciuria, la hipercalcemia y las náuseas, por lo que se aconseja estudiar los niveles de calcio en sangre y orina en los pacientes que inicien tratamiento. En los ensayos preclínicos de ambos fármacos se ha descrito el desarrollo de osteosarcoma metastásico en ratas, de forma dosis dependiente, lo que ha obligado a establecer un tiempo máximo de tratamiento de 24 meses para la osteoporosis posmenopáusica (241).

6.2.3. FÁRMACOS DE ACCIÓN MIXTA.**6.2.3.1. RANELATO DE ESTRONCIO (rSr).**

La parte activa de la molécula de ranelato de estroncio (rSr) es el ion estroncio, un catión divalente similar al calcio, que se incorpora a los cristales de hidroxiapatita del tejido óseo aumentando la formación del hueso, a la vez que disminuye la resorción ósea. Se puede recomendar como fármaco de primera línea en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica para reducir el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales y las fracturas de cadera en un subgrupo de alto riesgo (> 70 años y DXA cuello femoral $T \leq 3$ DE) (NE 1b; GR A) (3). El rSr está autorizado para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres tras la menopausia a fin de reducir la aparición de fracturas vertebrales y de cadera así como en la osteoporosis en hombres adultos con riesgo elevado de fractura (242). El rSr a los 3 años de tratamiento reduce las fracturas vertebrales un 41%, las no vertebrales en un 16%, las fracturas no vertebrales mayores en un 19% y las fracturas de cadera en un 36% en un subgrupo de riesgo alto (243;244). Se ha observado también un aumento de la DMO del 12,7 al 14,4% en la columna lumbar, un 5,7-8,2% en el cuello de fémur y un 7,1-9,8% en la cadera total. Sin embargo, parte de este aumento se debe al depósito de estroncio en el hueso, por lo que el incremento es un 50% de los referidos (3). Los efectos adversos clásicos más frecuentes son náuseas, diarrea, cefalea, dermatitis y eccema, siendo los principales motivos de abandono del tratamiento. Se han descrito también casos de síndrome de DRESS (*Drugs Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms*), una toxicodermia grave que cursa con erupción cutánea, fiebre y afectación de diversos órganos como riñón e hígado relacionados con la toma de rSr. Debido a este hecho ante cualquier sospecha de reacción cutánea se debe suspender de forma indefinida el tratamiento (245;246). Aunque no está claramente demostrado, se ha señalado la posibilidad de que aumente la tendencia a la trombosis venosa profunda y el embolismo pulmonar (247), por lo que se recomienda extremar las precauciones en pacientes en riesgo de desarrollar estos eventos. En este año 2013 el Comité para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia europeo (PRAC) ha recomendado la revisión del balance beneficio-riesgo de ranelato de estroncio, así como no utilizar este medicamento en pacientes

con alto riesgo de cardiopatía isquémica tras evaluar en el último informe periódico de seguridad del fármaco los datos agrupados de ensayos clínicos realizados frente a placebo (aproximadamente 7500 pacientes tratados con ranelato de estroncio o placebo). En estos ensayos se observó de forma global un incremento de riesgo de infarto de miocardio en la rama de pacientes tratados con ranelato de estroncio frente a los que recibieron placebo sin asociarse con un aumento en la mortalidad. Esta recomendación está pendiente de ser confirmada en las próximas semanas en el Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP). Debido a estas la AEMPS recomienda mientras tanto restringir el uso de ranelato de estroncio al tratamiento de la osteoporosis severa en mujeres posmenopáusicas con alto riesgo de fracturas y de la osteoporosis severa en hombres con alto riesgo de fractura junto a la recomendación de no iniciar el tratamiento en pacientes con elevado riesgo de cardiopatía isquémica (antecedentes de cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica, enfermedad cerebrovascular o hipertensión arterial no controlada) (242). En la tabla 9 se compara la eficacia de los diferentes tratamientos farmacológicos antiosteoporóticos, mostrando la magnitud de la eficacia frente a placebo en función del número de sujetos a tratar (NNT) para conseguir evitar una fractura (3).

Tabla 9. Magnitud de eficacia de fármacos antiosteoporóticos en régimen preventivo en diferentes ensayos clínicos

FÁRMACO	Ensayo	Prevención	NNT* FRACTURAS (vs placebo)		
			Vertebrales	No vertebrales	Cadera
Bifosfonatos					
Alendronato	FIT-1	2ª	15	36	90
	FIT-2	1ª	64	ns	ns
Etidronato	Revisión Cochrane	2ª	22	ns	ns
		1ª	ns	ns	ns
Ibandronato	BONE	2ª	20	ns	ns
Risedronato	VERT-EEUU HIP	2ª	20	43	ns
		1ª(Alto riesgo)	--	--	99
Zoledronato	HORIZON	mixta	14	40	91
Estroncio					
Ranelato de estroncio	SOTI TROPOS	2ª	8	ns	ns
		mixta	--	40	ns
Moduladores selectivos de receptores estrogénicos					
Raloxifeno	MORE	2ª	16	ns	ns
		1ª	46	ns	ns
Bazedoxifeno	EMEA	1ª	59	ns	ns
Hormonas					
Calcitonina	PROOF	2ª	16	ns	ns
Análogos de PTH					
Teriparatida	Neer 2001	2ª	11	34	ns
rPTH	TOOP 207	mixta	49	ns	ns

*NNT: Número de sujetos que hay que tratar con el fármaco para conseguir evitar una fractura.

ns: no significativo

6.2.4. FÁRMACOS EN FASE DE DESARROLLO.

En los últimos años se ha realizado un gran avance en la identificación de los mecanismos implicados en la regulación del remodelado óseo, lo que ha permitido el estudio de nuevos fármacos en el campo de la osteoporosis. Los fármacos que se encuentran en fase de desarrollo se pueden clasificar en dos grandes grupos y se enumeran a continuación (3).

a) Fármacos anabólicos:

- i. Moduladores de la vía de señalización Wnt: Anticuerpos anti-esclerostina (AMG-785), Inhibidor de la sFRP.
- ii. Inhibición de las activinas (ACE-011).

b) Fármacos anabólicos:

- i. Inhibidores de la catepsina K: Odanacatib, Elacatib, MK-0674.
- ii. Inhibición de las integrinas.
- iii. Inhibición de la Src-quinasa.
- iv. Inhibición de los mecanismos de acidificación.

6.2.5. SELECCIÓN DEL FÁRMACO ANTIOSTEOPORÓTICO.

A la hora de seleccionar el fármaco específico para un paciente concreto con osteoporosis, debemos tener en cuenta las siguientes consideraciones (3):

- a) Evidencia de la eficacia en pacientes de sus características
- b) Ausencia de contraindicaciones
- c) Potencialidad real de cumplimentación
- d) Eventos adversos
- e) Eficiencia de su prescripción
- f) Comorbilidades del paciente y otros tratamientos asociados

A continuación, se describen una serie de recomendaciones generales (3):

- El alendronato (70 mg semanal) es posiblemente el medicamento de elección para el tratamiento de la osteoporosis primaria posmenopáusica, dado que presenta uno de los balances eficacia/seguridad más favorables y la posología que mejor promueve la adherencia al tratamiento, al menor coste.
- El risedronato presenta un balance eficacia/seguridad similar a alendronato, aunque con un coste de tratamiento superior. La posología semanal es la que ha demostrado favorecer en mayor medida la adherencia al tratamiento, aunque la posología mensual podría resultar de utilidad en pacientes seleccionados.

- Al igual que alendronato y risedronato, el zoledronato también ha demostrado reducir el riesgo de fractura de cadera, aunque su perfil de seguridad es menos favorable que el de los bifosfonatos orales, hace que deba emplearse en pacientes con dificultades para la administración oral.
- Ranelato de estroncio ha demostrado reducir las fracturas vertebrales y constituye una alternativa a los bifosfonatos cuando no estén indicados o en caso de fracaso terapéutico.
- Teriparatida ha demostrado reducir las fracturas vertebrales pacientes de alto riesgo de fractura, por lo que es una opción para pacientes de riesgo elevado o en caso de fracaso terapéutico con los fármacos anteriores.

6.2.6. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA Y DURACIÓN DEL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.

A excepción de los análogos de la PTH, el tratamiento de la osteoporosis debe mantenerse durante años (NE 5; GR D) (3). El resto de tratamientos ha mantenido su eficacia y seguridad durante periodos variables de 3 a 10 años. Los fármacos antiosteoporóticos reducen pero no anulan el riesgo de nuevas fracturas, por lo que el tratamiento puede ser eficaz a pesar de que el paciente presente nuevas fracturas.

Se recomienda evaluar la respuesta a tratamiento mediante DXA central al año del inicio del fármaco y posteriormente cada 2-3 años (248), independientemente del tipo de tratamiento (NE 5; GR D)(3). En situaciones de riesgo alto de fractura, como pacientes trasplantados, corticoterapia a dosis altas y fracturas vertebrales múltiples, es aconsejable realizar cada 6 o 12 meses la DXA central (NE 5; GR D) (3). Los marcadores de remodelado óseo pueden ser útiles para valorar precozmente la eficacia del tratamiento (249) y para ayudar a mejorar la persistencia de éste (3).

La aparición de nuevas fracturas junto a un descenso de los valores de DMO superior al 2%, después de al menos un año de tratamiento, se puede considerar como una respuesta terapéutica inadecuada. Si sólo se da una de esas dos situaciones, estaremos ante una probable respuesta inadecuada. Por el contrario, si el paciente presenta una respuesta adecuada al tratamiento, no presentará ninguna de estas dos circunstancias. A la hora de seleccionar el fármaco específico para un paciente concreto con osteoporosis, debemos tener en cuenta estas consideraciones (3).

6.3. TRATAMIENTO DE LAS FRACTURAS VERTEBRALES. TÉCNICAS DE REFUERZO VERTEBRAL (TRV): VERTEBROPLASTIA PERCUTÁNEA (VP) Y CIFOPLASTIA (CP).

Además de las indicaciones de tratamiento farmacológico descritas anteriormente en los pacientes con fracturas osteoporóticas, existen una serie de medidas terapéuticas adicionales no farmacológicas en el caso de las fracturas vertebrales. Así, los objetivos principales del tratamiento de una fractura vertebral aguda son el control del dolor y la recuperación funcional, siendo los analgésicos por vía oral, el reposo relativo, las ortesis y la rehabilitación son los pilares fundamentales del tratamiento (3).

Los analgésicos orales son los fármacos de primera línea para reducir el dolor de las fracturas vertebrales. En los casos en los que el dolor no se pueda controlar con analgésicos convencionales como los antiinflamatorios no esteroideos, es aconsejable utilizar un opiáceo (250). En caso de reposo absoluto, se debe intentar la reincorporación para estar sentado y reanudar la bipedestación y la marcha en el mínimo tiempo posible. Durante el episodio agudo puede estar indicada la prescripción de ortesis y, una vez conseguido el control del dolor agudo, puede ser útil la realización de rehabilitación. Las ortesis se deberán utilizar con precaución, pues una inmovilidad raquídea excesiva podría incrementar la osteoporosis (3).

La indicación de una TRV es la evidencia radiológica de una fractura compresiva dorsolumbar con edema en la resonancia magnética (RM) o en su defecto con captación en gammagrafía ósea y dolor significativo relacionado anatómicamente con la fractura e incontrolable de forma satisfactoria desde el punto de vista médico. No existe indicación profiláctica ante osteoporosis sin fracturas, leves fracturas asintomáticas o sin edema en RM (35). La VP ha demostrado una gran efectividad, con disminución del dolor hasta en el 90% de los casos (251-253). Las TRV consisten en la inyección de un cemento de polimetilmetacrilato (PMMA) en el interior del cuerpo vertebral enfermo con lo que se intenta endurecer la vértebra para darle mayor fuerza y estabilidad, evitando la progresión del colapso y el dolor. Los ensayos clínicos acerca del beneficio de estas medidas son controvertidos, por lo que no se debe recomendar de manera generalizada la vertebroplastia o la cifoplastia para el tratamiento de las fracturas vertebrales osteoporóticas (254-256).

Puede haber complicaciones en 1–5% de los casos. Pueden aparecer hasta un 20% de nuevas fracturas en vértebras adyacentes al nivel reforzado (similar a la tasa de refractura general en osteoporosis) y en osteopenia secundaria a tratamiento esteroideo puede llegar hasta un 38% en la VP y a un 48% en la CP (257).

6.4. TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS EN POBLACIONES ESPECIALES.

6.4.1. OSTEOPOROSIS EN EL VARÓN.

El 26% de las fracturas osteoporóticas de cadera diagnosticadas en España suceden en pacientes varones (7). El descenso de DMO en varones está relacionado también con la disminución en los niveles de estrógenos sin embargo faltan más estudios para conocer si los parámetros de DMO empleados en la DXA que se aplican en la población femenina pueden ser empleados en el varón. No existen criterios estandarizados para el uso de test de screening en el varón a pesar de que muchas de las fracturas acontecen en varones con valores de DMO menores de 2.5 DE con respecto a la población normal (258)

En primer lugar, se aconseja realizar un estudio básico de las causas más frecuentes de OP secundaria, puesto que son las más frecuentes en este grupo de población. En España, la causa más frecuente es el hipogonadismo (10-20%), seguido del tratamiento crónico con corticoides y el enolismo, habitualmente asociado a enfermedad hepática (3).

Los fármacos que tienen en la actualidad indicación para la osteoporosis masculina son: risedronato (259), zoledronato (260) y teriparatida (261). La posología es la misma que para la osteoporosis en la mujer. No existe recomendación según las guías clínicas para el tratamiento con testosterona en la Osteoporosis con excepción del Hipogonadismo sintomático. La testosterona puede producir efectos secundarios tales como: policitemia,

Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño, Hipertrofia Benigna de Próstata así como adenocarcinoma prostático. Estudios recientes están investigando la utilidad del Denosumab en la Osteoporosis del varón (258).

6.4.2. OSTEOPOROSIS PREMENOPÁUSICA.

Los criterios de diagnóstico según la DXA son distintos para la mujer premenopáusica. Se debe usar la escala-Z y el diagnóstico de «masa ósea baja» se establece si es < -2 DE. La presencia de fracturas por fragilidad, particularmente asociadas a una masa ósea baja, permite establecer el diagnóstico de osteoporosis. Se recomienda un estudio exhaustivo de la paciente, puesto que en la mitad de los casos existen otros procesos asociados. Las causas más frecuentes son: tratamiento con glucocorticoides o enfermedad de Cushing, asociación al embarazo, osteogénesis imperfecta o déficit estrogénico, anorexia nerviosa y/o enfermedades malabsortivas intestinales (262). El tratamiento incluye medidas generales como realizar ejercicio físico, evitar el consumo de tabaco y alcohol, una ingesta adecuada de calcio y vitamina D, y el tratamiento de la causa subyacente (263). En pacientes que únicamente presentan una disminución de la DMO sin otros factores de riesgo asociados, se recomienda realizar un seguimiento. El tratamiento farmacológico sólo se considerará en casos concretos como en las pacientes con fracturas o en aquéllas que presentan factores asociados, especialmente el tratamiento con glucocorticoides y el hipogonadismo (3).

6.4.3. OSTEOPOROSIS INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES.

La osteoporosis provocada por glucocorticoides (GC) es la causa más frecuente de osteoporosis secundaria. Se estima además que en un tercio de los tratados al año de tratamiento y en un 50% se producirán fracturas en algún momento de su evolución (264). La pérdida de DMO es rápida, sobre todo durante el primer año, incluso con dosis bajas, siendo el hueso trabecular es el más afectado. Varios factores intervienen en el riesgo de desarrollar fracturas en los pacientes en tratamiento con GC como la DMO al comienzo del tratamiento, la dosis diaria y acumulada, y la enfermedad subyacente. Las fracturas producidas por los GC aparecen con valores de DMO mayores que en otros tipos de osteoporosis debido a la gran alteración que producen sobre la microarquitectura. Por este motivo, el umbral de intervención se debe situar por encima de la puntuación T de la osteoporosis posmenopáusica (3). Se debe indicar medidas preventivas a los pacientes que vayan a tomar dosis equivalentes ≥ 5 mg/día de prednisona durante más de 3 meses. Se recomienda una adecuada ingesta de calcio y de vitamina D (265). Si hay antecedentes de fractura por fragilidad y en los pacientes de más de 65 años, se recomienda iniciar tratamiento farmacológico. En aquellos que no presenten fracturas y tengan menos de 65 años, se realizará una DXA y si esta presenta una $T < -1,5$ DE también está indicado iniciar el tratamiento farmacológico (3). Los bifosfonatos y la teriparatida, han demostrado ser eficaces en la prevención y el tratamiento de la osteoporosis por GC (266-269). Se debe considerar el tratamiento con tiazidas (25 mg/día) en aquellos pacientes que presenten hipercalcemia (3).

7.- TERAPIA CELULAR EN OSTEOPOROSIS.

7.1. CÉLULAS STEM MESENQUIMALES (CSM).

En los últimos años la Terapia Celular se perfila como una prometedora opción terapéutica en el tratamiento de numerosas enfermedades (270-297). Las Células Stem mesenquimales (CSM) debido a su fácil obtención y expansión *in vitro*, así como por sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, de multipotencialidad y de baja inmunogenicidad, constituyen una herramienta muy atractiva en la denominada Medicina Regenerativa o reparadora (270-297). Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han reflejado su capacidad de migración al nicho hematopoyético consiguiendo mejorar el injerto hematopoyético (298;299). Por su naturaleza, las CSM se perfilan como candidatas ideales para el tratamiento de la patología degenerativa ósea y del cartílago, ya que por definición se diferencian a tejido óseo y cartilaginoso. Las CSM forman parte de la población de células estromales de la médula ósea, dan origen a las células osteoprogenitoras y osteoblastos e influyen directamente en la homeostasis del hueso. Hace más de 4 décadas se objetivó su capacidad de formación ósea al implantar en ratones medula ósea total bajo la capsula renal sin necesidad de incorporar factores de inducción. El cultivo de la medula ósea total después de su trasplante *in vivo* demostró la presencia de células adherentes formadoras de colonias, que tras varios pases mostraron su capacidad diferenciadora a tejido óseo, adiposo, cartilaginoso, fibroso y estromal (300-302). Estas células stem mesenquimales estromales se adhieren al plástico y tienen la capacidad de autorreplicación, proliferación y diferenciación (273;283-285;295-297).

Las CSM representan una de cada 100.000 células de la médula ósea, por lo que la cantidad de células osteoprogenitoras en una médula de una persona adulta sana representa aproximadamente el 0.001% de las células nucleadas, siendo necesaria su selección, concentración y expansión *in vitro* para su empleo clínico en terapia regeneradora ósea. Actualmente la técnica más utilizada para la obtención de una cantidad adecuada de progenitores a partir de médula ósea ha sido el harvest, tomando como referencia el recuento de células nucleadas totales. Los progenitores de tejido conjuntivo en medula ósea de cresta iliaca posterosuperior representan aproximadamente $3/10^4$ células nucleadas totales. Conforme al recuento medio de células nucleadas por mililitro (18×10^6), la medula ósea obtenida por aspiración de cresta iliaca contendría unos 600 progenitores/mL y tras su aislamiento y concentración, esta se podría incrementar a unas 2.500 células/mL. Sin embargo factores como la edad o la enfermedad, se acompañan de una disminución de elementos celulares, especialmente precursores osteogénicos lo que provoca dificultades para conseguir un número suficiente de células osteoprogenitoras que favorezca el éxito de la terapia regenerativa ósea (303-306). Diversos estudios clínicos han mostrado que las células mesenquimales poseen un enorme potencial osteogénico dada su capacidad de diferenciación en células osteoblásticas responsables de la formación ósea (307). Existen, por otra parte, estudios *in vitro* que indican que las CSM humanas producen constitutivamente OPG, lo que resulta en la inhibición de la osteoclastogénesis y la expresión de NF-ATc1 y catepsina K. Por lo tanto las CSM humanas además de incrementar la osteogénesis, ejercen un efecto supresor sobre la osteoclastogénesis, por lo que ejercen un efecto muy positivo en el balance de la formación ósea (308). En efecto, las CSM han sido utilizadas con éxito en estudios clínicos y modelos animales para la regeneración ósea y de cartílago (309) y actualmente existen numerosos ensayos clínicos registrados utilizando CSM en distintas patologías del aparato locomotor como las fracturas óseas, relleno de defectos óseos secundarios a tumores

benignos, necrosis avascular de cabeza femoral, osteoartritis de rodilla y alteraciones del cartílago (tanto traumáticas como degenerativas), etc...(310).

La terapia celular empleando CSM en patología osteoarticular se suele asociar a biomateriales y, en la mayoría de los protocolos, la vía de administración es intralesional o perilesional ya que se trata de patología localizada (270;275;282;291;293). Sin embargo, y en contraste con lo que parece deducirse de las características de las CSM que se han comentado previamente, se han realizado muy pocos estudios de terapia celular en la enfermedad ósea sistémica más prevalente: la osteoporosis. Existen datos preliminares de terapia con células en una enfermedad congénita con afectación generalizada del esqueleto como la osteogénesis imperfecta (OI), que ha sido tratada con trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (AloTPH) y con infusión de CSM (311-315). Las osteogénesis imperfectas (OI) o enfermedad de los niños de cristal son un grupo de patologías genéticas hereditarias del tejido conectivo, caracterizadas por la producción anómala de colágeno tipo I por parte de los osteoblastos que ocasiona fragilidad ósea y que cursa con fracturas, deformidades óseas y crecimiento óseo retardado. Son causadas por mutaciones en los dos genes que codifican las cadenas peptídicas del colágeno tipo 1; COL1A 1 (cromosoma 17) y COL1A 2 (cromosoma 7). Las osteogénesis imperfectas se clasifican en diversos tipos; I, II, III, IV, V y VI (1-3). La OI tipo I, de herencia autosómica dominante (HAD), es la variante menos grave, presentando estos niños una fragilidad ósea de leve a moderada y otros rasgos fenotípicos como escleróticas azules o macrocefalia entre otros. El 23% de estos niños presentará una fractura durante el primer año de vida. La OI tipo II es la forma más grave. Su herencia puede ser HAD o recesiva. La OI tipo III es de HAD y se caracteriza por una deformidad progresiva de los miembros. La OI tipo IV se caracteriza por presentar un fenotipo menos grave y un pronóstico mejor. El resto de formas tiene un pronóstico intermedio entre la forma IV y las formas más severas llegando incluso a un 90% de mortalidad en la OI tipo IIA en el primer mes de vida.

La OI es un modelo "in vivo" de patología ósea sistémica y resulta de utilidad para conocer los potenciales problemas de un tratamiento sistémico y establecer hipótesis para su resolución. Los resultados del AloTPH en esta enfermedad no han sido lo satisfactorios que se esperaban debido en gran parte a problemas en el injerto de las células madre alogénicas, como consecuencia de un "homing" deficiente (311-314).

En modelos animales se ha demostrado que las CSM infundidas por vía sistémica pueden injertar y constituir una fuente celular renovable en la médula ósea, detectándose ADN de las CSM inoculadas hasta 2,5 meses tras su infusión. Este dato se ha confirmado en un modelo murino de OI, infundido con CSM de ratón sano, en el que además se observó una mejoría leve pero significativa del contenido en colágeno y la masa ósea al mes de la infusión (301). Posteriormente Panaroni et al. publicaron su experiencia con el trasplante intrauterino de células de médula ósea de ratón sano GFP en un modelo murino de OI clásica. Estos investigadores observaron cómo dichas células injertaban tanto en tejido hematopoyético como no hematopoyético, y se diferenciaban a células óseas trabeculares y corticales sintetizando colágeno tipo I en cantidades suficientes como para disminuir la mortalidad perinatal de la enfermedad (316). A la luz de estos datos, Horwitz publica en 2002 sus resultados de seguimiento en tres niños con OI sometidos a AloTPH. El estudio concluye que la técnica es segura y eficaz en cuanto que confirma el injerto de CSM de médula ósea en el receptor. Dichas células contribuyeron a la formación de nuevo hueso, lo que se tradujo clínicamente en un mayor crecimiento de los niños, menor incidencia de fracturas e incremento en la masa ósea. No obstante, tras un período de seguimiento se observa un *plateau* en la velocidad de crecimiento, por el que el autor sugiere que quizá la adición de infusiones secuenciales de CSM expandidas in vitro podrían proporcionar respuestas más

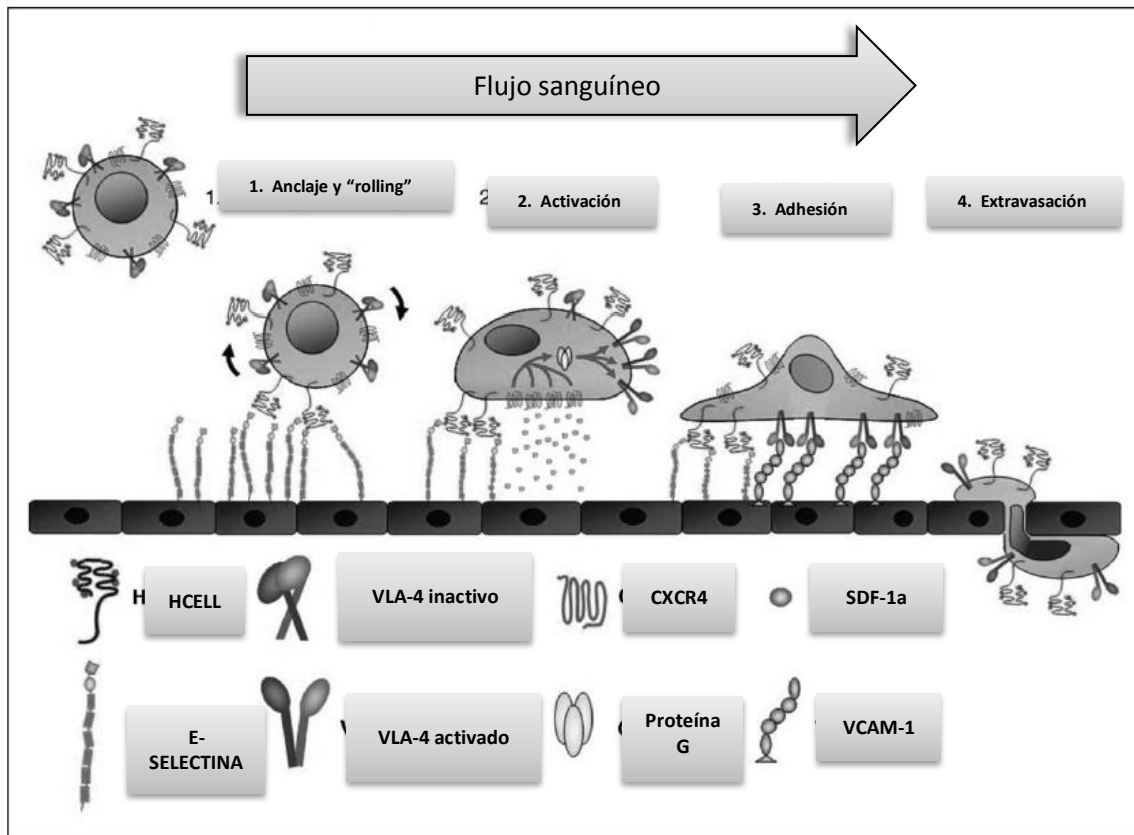
duraderas. De hecho, posteriormente el mismo grupo publica los resultados de un estudio en el que infunden de forma secuencial (2 infusiones/paciente) CSM de médula ósea alogénicas marcadas mediante un vector viral a 6 niños con OI que habían recibido previamente un AloTPH. Los resultados mostraron que las CSM injertaban en el hueso, estroma medular y piel sin necesidad de la administración de un régimen de acondicionamiento previo, y desde ahí producían beneficios clínicamente medibles (311-314). Recientemente Otsuru y cols. han publicado sus resultados con AloTPH en niños con OI y sus esperanzadores resultados con la infusión de CSM (318). Estos estudios en modelos animales y casos clínicos en humanos muestran que en una patología en la que existe una alteración difusa de la célula mesenquimal y el osteoblasto, las CSM infundidas por vía sistémica tras la administración o no de un régimen de acondicionamiento ablativo, son capaces de injertar en el hueso y diferenciarse a osteoblastos funcionales productores de matriz ósea. No obstante en todos estos casos se observa que el número de CSM que injerta en médula ósea es muy deficiente, entre el 1 y el 5% y por eso se plantea la necesidad de incrementar el acceso de las CSM a la médula ósea mediante nuevas tecnologías que mejoren el tráfico dirigido hacia la misma y permitan un injerto mucho más eficaz tras su infusión sistémica (314;316).

Los datos de la cinética de la biodistribución de las CSM tras su infusión intravenosa, obtenida con diferentes técnicas en modelos animales indican que la mayoría de las células administradas quedarán retenidas en la microcirculación de los grandes filtros vasculares del organismo (el pulmón, el hígado, el bazo), de forma que el número de células que finalmente alcanza el tejido diana es limitado tras evaluar su biodistribución. Para ellos se han empleado técnicas como la luciferasa en la que las CSM se localizan gracias a la emisión de fotones generada por la actividad luciferasa que portan tras ser transducidas, o como el marcaje con nanopartículas de hierro (317-319). Esta barrera puede ser superada, al menos parcialmente, y mejorar la afinidad de las CSM por los tejidos diana. Para analizar este proceso, resulta de utilidad repasar la fisiología del tráfico celular normal hacia la médula ósea. La migración desde el compartimento vascular al extravascular se produce principalmente en los sinusoides postcapilares gracias a la interacción de varias moléculas de adhesión de la superficie celular con sus respectivos ligandos expresados en las células endoteliales. Este fenómeno tiene lugar tras una cascada de acontecimientos que se resumen en las ilustraciones 18 y 19 y que concluyen con la extravasación o transmigración de la célula desde el interior del vaso capilar hasta el tejido mismo. Las células que por antonomasia poseen osteotropismo y que migran a través del torrente sanguíneo siendo posteriormente reclutadas por el hueso a través de los capilares medulares, son las CSH. Este fenómeno, denominado “homing” se produce merced al intercambio de señales entre el microambiente medular y la célula que migra hacia él. En la primera fase del proceso de transmigración se producen interacciones físicas entre la E-Selectina de las células endoteliales de los capilares de la médula ósea y su ligando en la CSH (Hematopoietic cell E and L-selectin ligand o HCELL) lo que facilita su contacto, en lo que se denomina fase de *rolling* o anclaje. Gracias a este próximo contacto se produce la interacción entre el CXCL12 o SDF-1 (stromal derived-factor 1) y su receptor CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) en la CMH, el cual está acoplado a un sistema de proteínas G que transducen la señal para la activación de la β 1-integrina VLA-4 (Very Late Antigen 4) en la superficie de la CMH (fase de activación). La VLA-4 activada es capaz de unirse a su ligando VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), fuertemente expresado de forma constitutiva en el endotelio medular (fase de adhesión), lo que desemboca la transmigración de la CMH fuera del vaso (fase de extravasación). En el caso del hueso, el portal de entrada desde el torrente sanguíneo se encuentra en los sinusoides de la médula ósea y en estudios *in vivo* se ha demostrado que el ligando endotelial E-selectina (CD62E) tiene un papel esencial en este proceso como acabamos de describir en el párrafo anterior. E-selectina se une específicamente a las formas sializadas y fucosiladas del tetrasacárido Lewis x (sLex) presente en las células hematopoyéticas y su

isómero, Lewis a (sLea) que se encuentra en células epiteliales humanas y tumores derivados de éstas. Dicha unión es dependiente de calcio. (319).

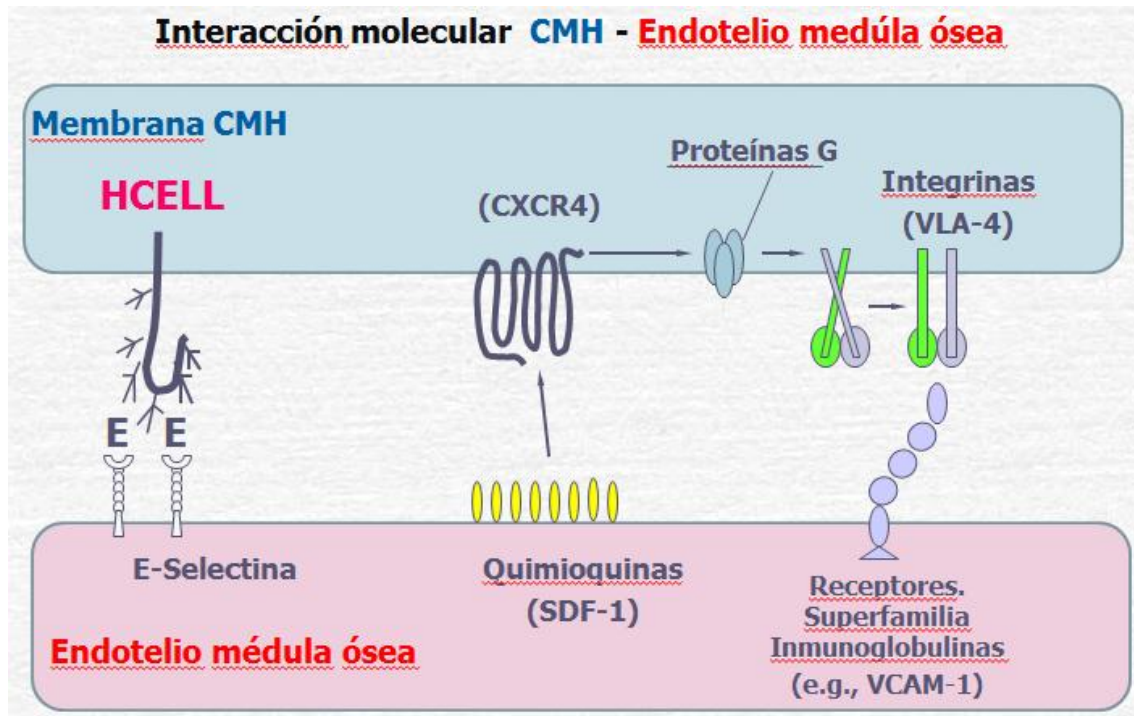
Las CSM obtenidas de médula ósea poseen una ventaja frente a las procedentes de otras fuentes en el sentido de que ya han estado en contacto con el nicho o microambiente medular, y poseen receptores específicos capaces de reconocer señales procedentes de éste. Además, como hematólogos, la obtención de células madre de médula ósea forma parte de nuestra práctica habitual, por lo que ésta será la fuente utilizada en nuestro estudio (320;321).

Ilustración 18. Representación esquemática de los pasos en la migración celular de las células que expresan HCELL y VLA-4, interaccionando con células endoteliales que expresan E-selectina y VCAM-1. Modificado de Sackstein R et al (320).



CMH (Célula Madre Hematopoyética); CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4); HCELL (Hematopoietic cell E and L-selectin ligand); SDF-1 (stromal derived-factor 1); VLA-4 (Very Late Antigen 4); VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1).

Ilustración 19. Interacción molecular Célula Madre Hematopoyética con el endotelio de médula ósea



CMH (Célula Madre Hematopoyética); CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4); HCELL (Hematopoietic cell E and L-selectin ligand); SDF-1 (stromal derived-factor 1); VLA-4 (Very Late Antigen 4); VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1).

El ligando de E-selectina más potente expresado por las CMH: *HCELL* es la glicoforma sialofucosilada (sialil-Lewis o sLex) del antígeno de superficie CD44. Aunque CD44 se expresa de forma ubicua de todos los tipos celulares humanos, su glicoforma *HCELL* se encuentra exclusivamente de forma nativa en la membrana de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Las CPH son capaces de sialofucosilar CD44 en el citoplasma celular merced a la acción enzimática de la enzima fucosiltransferasa VII (FTVII), que apone una fucosa en posición α -1,3 a la N-acetil glucosamina en los residuos lactosamina.

La presencia en la superficie celular de sialil Lewis x (sLex) se identifica al demostrar su unión con los anticuerpos monoclonales (AcMo) HECA452 y KM93 (anti-sLex) y su unión con la E-selectina-Ig (E-Ig) mediante Western blot. Las CSM no expresan *HCELL* pero tienen una fuerte expresión de antígeno CD44, lo que muestra que la falta de expresión de *HCELL* en las CSM no se debe a que estén desprovistas de CD44, sino a que dicho antígeno no posee los residuos de carbohidratos que caracterizan a la forma glicosilada. Los trabajos de Robert Sackstein y cols, han demostrado que se debe a la falta del residuo α -1,3-fucosa (98;320-327). Este mismo grupo ha puesto a punto un método para modificar de forma transitoria el antígeno CD44 mediante fucosilación enzimática selectiva “ex vivo” con una fucosiltransferasa diseñada para aplicarse sobre células vivas (Fucosiltransferasa VI) (FTVI). La FTVI convierte la molécula CD44 en la glicoforma *HCELL* (ilustración 20) consiguiendo obtener CSM con *HCELL* de forma semejante al expresado en la fucosilación intracelular que acontece en las CMH (ilustración 21). Los experimentos del Dr. Sackstein demuestran de manera elegante con ensayos funcionales e inyectando in vivo células humanas fucosiladas en un modelo animal que está modificación confiere tropismo a las CSM por los tejidos inflamatorios y el tejido óseo. Este

método denominado GPS (Glycotransferase-Programmed Stereosubstitution of cell surface glycans) se está modificando para su aplicación clínica de manera que los reactivos empleados (glicosiltransferasas y tampones) se han formulado específicamente para preservar la viabilidad celular y el fenotipo celular (98;320-327).

Ilustración 20. Reacción enzimática de la fucosilación

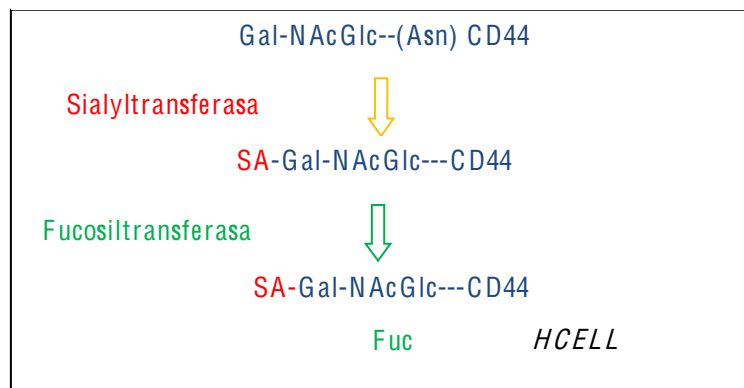
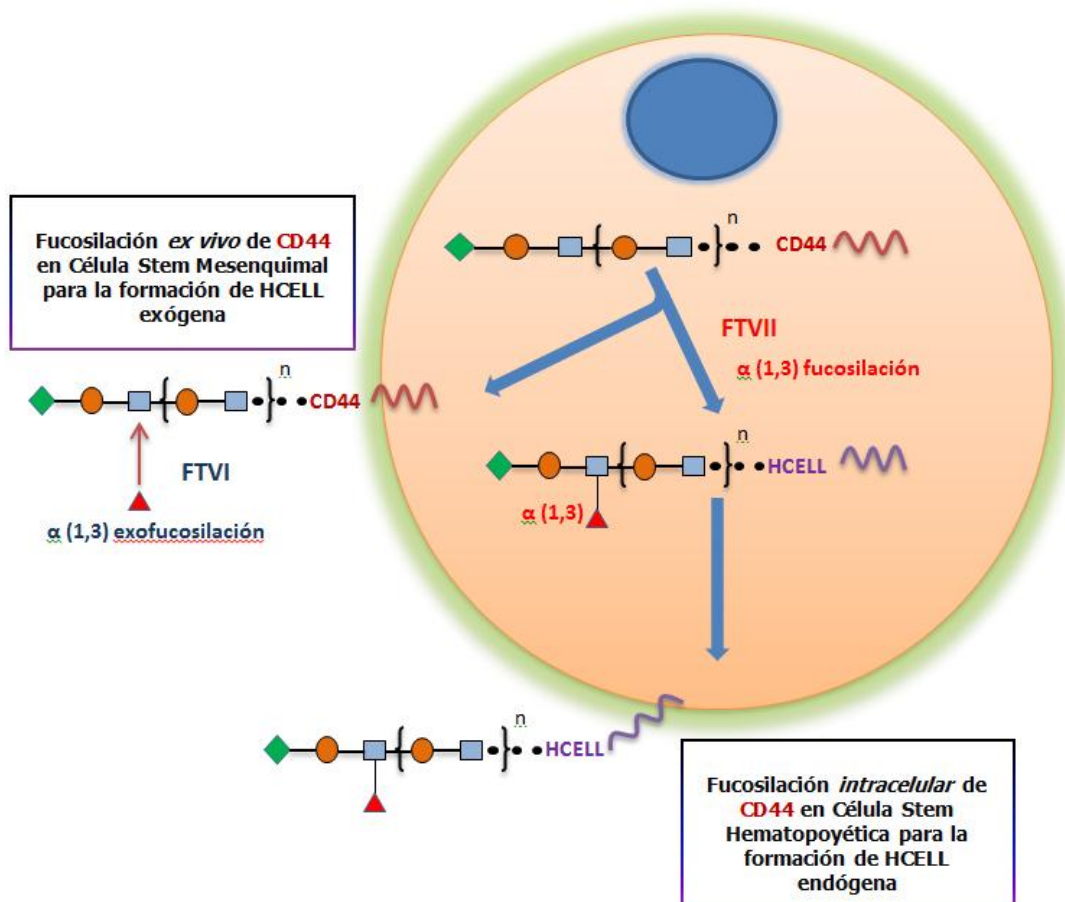


Ilustración 21. Mecanismos de fucosilación intrínseca y extrínseca



Por otro lado, se ha comprobado que la fucosilación *in vitro* de las CSM no solo aumenta la adhesividad de las células al endotelio, sino que además potencia la trans migración de las células a través del endotelio mediante la activación directa de la integrina VLA-4 sin necesidad del estímulo de las quimiocinas (en ausencia de CXCR4) (328). Se ha sugerido que esta modificación podría mejorar la eficacia del tratamiento con CSM al aumentar el número de estas células en los tejidos dianas después de ser administradas por vía sistémica. Además se trata de una modificación transitoria, de manera que la expresión de *HCELL* en las células fucosiladas se mantiene estable durante 24 horas, haciéndose progresivamente indetectable en torno a las 96 horas, probablemente debido al propio turnover de la proteína de superficie, dado que no se producen cambios en los niveles de CD44 observados mediante citometría de flujo (98). Estos datos junto a la ausencia de cambios en las CSM fucosiladas en cuanto a morfología, expresión fenotípica, diferenciación... sugieren que la fucosilación de las CSM es una biotransformación inocua y que se puede realizar con seguridad.

Nuestro grupo de investigación, lleva más de una década investigando el papel potencial de la terapia celular en diferentes enfermedades, habiendo puesto en marcha varios ensayos clínicos (270;271;273;276-278;281-283;287-294). Uno de los problemas prácticos que impiden un uso más generalizado de la terapia celular es la necesidad de la infusión local de las células para asegurar que ejercen su efecto beneficioso en el lugar donde se precisa y que no quedan atrapadas en los filtros de la microvasculatura, lejos de la diana terapéutica. Por otro lado, la inyección localizada de las CSM tiene otras limitaciones entre las que cabe destacar:

- a) No se podrían utilizar para tratar patologías de órganos o tejidos sin un límite anatómico estricto (por ejemplo el tubo digestivo, el pulmón, etc).
- b) La inyección de las células con presión hidrostática (con jeringas) y en una solución con cristaloides, puede acentuar la reacción inflamatoria local e interrumpir el proceso reparatorio fisiológico incipiente.
- c) La inyección localizada en un sitio con patología local "hostil", puede limitar la viabilidad y la función de las células infundidas.
- d) Los procedimientos de inyección localizada suelen ser invasivos y se asocian con un rango relativamente elevado de morbilidad dependiendo del tejido en el que se infunden.

Finalmente cabe concluir que la inyección localizada de las células tiene poco o ningún papel en las enfermedades multifocales o sistémicas en las que son necesarias otras aproximaciones. Para intentar dar un nuevo enfoque a este problema, iniciamos una colaboración con el Dr. Robert Sackstein, enfocándonos en la modulación del tráfico celular mediante técnicas de glicobiología que alteraban los ligandos de la membrana y mejoraban la migración intravascular facilitando el anclaje y trans migración al nicho medular (329). Nos propusimos por tanto reproducir la técnica de fucosilación *in vitro* de las CSM (GPS o Glycotransferase-Programmed Stereosubstitution of cell surface glycans) con el objetivo final de poner en marcha un ensayo clínico en pacientes con osteoporosis. A tal efecto y siguiendo los requerimientos de la AEMPS, iniciamos los experimentos preclínicos que son la base de esta memoria de investigación, enfocados a demostrar que las CSM humanas fucosiladas en nuestro laboratorio son seguras y tienen un osteotropismo superior al de las CSM humanas sin fucosilar, convirtiéndolas en una herramienta útil para el tratamiento de enfermedades óseas generalizadas como la osteoporosis.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente y una de las principales causas de morbilidad en los países desarrollados, siendo hoy por hoy una enfermedad incurable para cuyo tratamiento se han comercializado numerosos fármacos que mejoran transitoriamente la calidad del hueso, pero que son caros y precisan largos períodos de administración, lo que dificulta la adherencia al tratamiento. Por tanto es una patología para la que tanto la sociedad como la comunidad científica demandan nuevas opciones terapéuticas.

Aunque en la actualidad hay numerosos ensayos clínicos en terapia celular que aplican células mesenquimales para el tratamiento de diversas patologías osteomusculares, ningún grupo ha iniciado estudios para tratar la osteoporosis. Las propiedades biológicas de las CSM las hace candidatas ideales para el tratamiento de la OP, no obstante, como ocurre en otras enfermedades sistémicas donde no es viable la administración intralesional de las células, en la OP resulta fundamental conseguir que las CSM alcancen de manera eficaz su nicho o lugar de acción terapéutica, tras su infusión intravenosa. Merced a los adelantos en el campo de la glicobiología, actualmente se conocen técnicas como la publicada por el Dr. Robert Sackstein de GPS (Glycotransferase-Programmed Stereosubstitution of cell surface glycans), que mediante la fucosilación enzimática de moléculas-ligando de la superficie celular mejoran la migración intravascular y facilitan el anclaje y transmigración al nicho medular (98;320-327). Con estos antecedentes, hemos pretendido reproducir en nuestro medio las técnicas GPS, enfocados a demostrar que las CSM humanas fucosiladas en nuestro laboratorio son seguras y tienen un osteotropismo superior al de las CSM humanas sin fucosilar, convirtiéndolas en una herramienta útil para el tratamiento de enfermedades óseas generalizadas como la osteoporosis.

Las hipótesis principales del estudio son que las CSM humanas de médula ósea expandidas *in vitro*, sometidas a un proceso de fucosilación enzimática e infundidas vía intravenosa son seguras en el modelo murino inmunodeprimido NOD/SCID (*Non-obese diabetic and severe combined immunodeficiency*), y que además son capaces de anidar con mayor eficacia en el hueso del receptor, mejorando los parámetros de calidad y cantidad de masa ósea en el hueso murino. Una vez que se ha producido el injerto óseo, las CSM serían capaces de diferenciarse a osteoblastos funcionales productores de matriz ósea, mejorando la masa ósea. Además, las CSM sintetizan constitutivamente osteoprotegerina, molécula clave en la inhibición de la osteoclastogénesis. En consecuencia, las CSM pueden restaurar equilibrio formación/resorción ósea actuando en las dos vías patogénicas de la homeostasis del hueso. La demostración de seguridad y eficacia del uso de estas células en el modelo murino, abre el camino para iniciar ensayos clínicos en pacientes con osteoporosis que es otro objetivo posterior. Por lo tanto, planteamos que las CSM fucosiladas podrían ser eficaces como medicamento de terapia celular en el tratamiento de la osteoporosis.

El desarrollo de esta tecnología, novedosa en la terapia celular, nos proporcionará una información y experiencia muy relevantes en el manejo de CSM bioingenierizadas para uso clínico y en su producción siguiendo normas GMP. En caso de confirmarse su eficacia, esta técnica hará posible el desarrollo de protocolos clínicos para diversas patologías resolviendo el actual problema de la infusión y anidamiento de las CSM en número y cantidad adecuada para la reparación tisular en enfermedades sistémicas.

2.- OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL.

Estudiar la seguridad y eficacia de la infusión intravenosa de células stem mesenquimales de médula ósea humana fucosiladas en un modelo murino NOD/SCID.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Caracterización morfológica, inmunofenotípica y funcional de Células Stem Mesenquimales de médula ósea humana antes y después del proceso de fucosilación in vitro. Para confirmar que la fucosilación no altera las características biológicas de las células mesenquimales.
2. Estudiar la seguridad de la infusión intravenosa de Células Stem Mesenquimales de médula ósea humana fucosiladas en el modelo murino NOD/SCID. Para ello se realizará una evaluación de la toxicidad aguda y crónica utilizando un score de toxicidad murina y un estudio histológico de todos los órganos identificando si existen alteraciones de la histología normal o presencia de neoformaciones.
3. Estudiar la eficacia de la infusión intravenosa de Células Stem Mesenquimales de médula ósea humana fucosiladas en el modelo murino NOD/SCID. Para ello se evaluará la expresión de osteocalcina humana mediante anticuerpos específicos en diferentes huesos del ratón.
4. Estudiar la biodistribución de Células Stem Mesenquimales humanas de médula ósea humana fucosiladas en el modelo murino NOD/SCID mediante reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (qRT-PCR).

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.

1.1.- SELECCIÓN DE DONANTES. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Las CSM humanas fueron obtenidas de donantes altruistas mayores 18 años de ambos sexos. Se seleccionaron aquellos pacientes de la lista programada quirúrgica del Servicio de Traumatología, que iban a ser sometidos a cirugía por algunos de los siguientes motivos: fractura por traumatismo de alta energía, patología ligamentosa o de menisco en rodilla o cualquier otra intervención que fuera a realizarse bajo anestesia para no causar morbilidad al donante durante la extracción de la médula ósea. Se utilizaron 4 donantes distintos. Todos ellos firmaron el correspondiente consentimiento informado (anexo I) para la donación de médula ósea que incluía la concesión del excedente de muestra al biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Biobanc Mur) para su uso investigacional.

1.2.- OBTENCIÓN DE MÉDULA ÓSEA HUMANA

La extracción se realizó bajo condiciones estériles en quirófano de traumatología, una vez se había procedido a la anestesia del paciente. Para la obtención de la médula ósea empleamos la técnica mini-Harvest. Tras la palpación de la cresta iliaca posterosuperior seleccionada se administró anestesia local con mepivacaína (6-8 mL) mediante punción con aguja intramuscular. A continuación se procedió a la punción con trócar de aspirado de médula ósea en la cresta iliaca posterosuperior. Tras atravesar el periostio se procedía a la retirada del fiador y se conectaba una jeringa de 10 mL heparinizada previamente con 0.5 mL de heparina sódica al 5% (Mayne Pharma®, España). Una vez conectada se realizaron aspiraciones de médula ósea, con la premisa de no obtener más de 2-3 mL en cada aspiración para asegurar una buena celularidad medular y la mínima contaminación con sangre periférica en la muestra obtenida. El volumen final recolectado de médula ósea fue de 10 mL en cada donante. Posteriormente se colocaba un tapón estéril a las jeringas de médula ósea y se llevaban al laboratorio de Terapia Celular para su procesamiento.

1.3.- AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.

En campana de flujo laminar la muestra de médula ósea contenida en las jeringas era traspasada a un tubo Falcon® estéril de 50 mL (Greiner Bio-One®, Alemania) diluyéndola en una proporción 1:1 con PBS. La médula ósea diluida se filtró a través de un tamiz de 100 µ (BD Falcón, Estados Unidos) y se tomó una muestra de 1 mL para realizar controles de recuento, viabilidad y microbiología. La viabilidad se evaluó mediante la tinción por exclusión Trypan-blue (Sigma Aldrich®, Estados Unidos) por recuento manual en cámara Neubauer. En esta tinción las células no viables se tornan de color azul reflejando la falta de integridad selectiva de la membrana células, por el contrario las células con buena viabilidad no se colorean con el colorante azul de tripano debido a la barrera que supone la membrana

plasmática. La viabilidad debía ser superior al 75% de las células evaluadas. A continuación se llenaban con 4 mL de Ficoll® (GE Healthcare®, Estados Unidos) tantos tubos de 15 mL como eran necesarios, teniendo en cuenta que la proporción para hacer el gradiente de densidad con el Ficoll fue 1:2 (Ficoll: médula ósea diluida). Se depositaba cuidadosamente el Ficoll sin rozar las paredes del tubo. Añadimos a cada tubo 8 mL de médula diluida muy lentamente, dejándola deslizar por las paredes del tubo. Centrifugamos a 495 g durante 30 minutos a una temperatura de 15°C. Se recogía cuidadosamente el anillo celular formado sobre la solución de Ficoll de todos los tubos siendo transferidos todos los anillos celulares a un único tubo estéril de 15 mL limpio. La fracción de células mononucleadas (anillos) fue lavada dos veces mediante centrifugación con 10 mL con PBS a 493 g durante 10 minutos a 4°C. En la última centrifugación, el pellet celular se resuspendía en 5 mL de medio de cultivo alpha-MEM 94% (Gibco®, Life Technologies Ltd®, Reino Unido) + 2 UI de heparina/mL + 5% de lisado plaquetario + 1% penicilina-estreptomycin (Lonza Biologicals Inc®, Estados Unidos).

El lisado plaquetar se obtenía a partir de bolsas de plaquetas caducadas extraídas en el Centro Regional de Hemodonación de Murcia, debidamente identificadas y testadas según los estándares legales aplicables a los productos hemoterápicos. Tras su recepción en el laboratorio GMP de Terapia Celular del Hospital Virgen de la Arrixaca, se congelaban a -80°C un mínimo de 3-4 días para el lisado de las plaquetas y la obtención del extracto que contenía los factores de crecimiento. Posteriormente se descongelaban a 37°C y se alicuotaban en tubos Falcon estériles de 50cc realizando el procesamiento en una cabina de flujo laminar de la zona de producción. A continuación, se centrifugaba a 900g durante 30 minutos y con los sobrenadantes se conseguía el pool que se congelaba a -20°C. Del pool obtenido se tomaba una alícuota para control microbiológico. Una vez comprobada la esterilidad del lote de lisado plaquetario, se consideraba apto para su uso en el medio de cultivo. A continuación se tomaba una alícuota de 10 µL de la suspensión celular para recuento celular en cámara hemocitométrica de Neubauer. Las células obtenidas se cultivaron a una densidad de 1.6×10^5 células/cm² en frascos de cultivo de 175 cm², correctamente identificados, con el mismo medio de cultivaba. Se incubaba a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y cada 3-4 días el medio era reemplazado.

1.4.- PROTOCOLO DE EXPANSIÓN DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.

El primer pase de cultivo fue realizado a los 10-15 días. Tras alcanzar el 60-80% de confluencia, las colonias de células se despegaron con Triple Select® (Gibco®, Life Technologies Ltd®, Reino Unido), resuspendiéndose en medio de cultivo completo (ya sin antibiótico) y tomando muestras para: controles microbiológicos, viabilidad y recuento celular. Las células se subcultivaron a razón de 1000 células/cm² en las mismas condiciones de CO₂ y temperatura.

El segundo pase y sucesivos se hicieron cada 7-10 días, cuando se alcanzaba el 60-80% de confluencia. A partir del segundo pase, se subcultivaban a razón de 3000 células/cm². Se repitió el mismo procedimiento que en paso anterior, y además se tomaron muestras para cariotipo. Cuando el número de células obtenidas (idealmente entre el 3º y 4º pase) estaba dentro del rango de la dosis a alcanzar se subcultivaban una vez más y se programaba la fucosilación y la infusión de las células a los ratones.

2.- TIPIFICACIÓN DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA. ETAPA PRE-FUCOSILACIÓN.

Para confirmar nuestra capacidad de producir células madre mesenquimales cumpliendo los criterios establecidos por el Comité de Células Madre de Tejidos y Mesenquimales de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT).

Detallamos a continuación los métodos empleados:

2.1.- ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

Morfológicamente, las células troncales mesenquimales se caracterizan por presentar una morfología alargada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo oblongo, central, que contiene de dos a tres nucléolos (330). Se realizó un registro escrito y fotográfico del aspecto de las células los días de cambio de medio hasta pase 1 y posteriormente antes de cada pase hasta el último, previo a la infusión de los animales.

2.2.- ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO.

Analizamos por citometría de flujo la expresión de los marcadores inmunofenotípicos característicos de las células mesenquimales según la ISCT, con positividad para CD90, CD73, CD105 y negatividad para CD45, CD34, CD14 y HLA-DR. El análisis se realizó a partir de una muestra de 3×10^5 células en pase 2-3 mediante citometría de flujo multiparamétrica (FACS modelo Beckman Coulter Navios, Becton-Dickinson [BD], San Jose, CA), midiendo la expresión de: CD14, CD20, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-DR. Los fluorocromos y anticuerpos monoclonales empleados fueron: CD90-APC (aloficocianina), CD105-FITC (isotiocianato de fluoresceína), CD73-PE (ficoeritrina), CD45-FITC, CD34-PE, CD14-PE-Cy7, HLA-DR-APC, CD20-PerCP (proteína clorofila peridina)-Cy5.5. Se analizó la expresión de CD105, el CD73 y el CD90 poniendo como criterio de selección la expresión en más de un 95% de las células. Además, estas células debían expresar CD166, CD44, CD29, CD13 y CD49d ($\alpha 4$ -integrina) y ser negativas o positivas en una proporción menor o igual al 2% para los antígenos CD45, CD34, CD14 o CD11b, o CD20 o HLA DR. La viabilidad fue determinada por medio de Anexina-V.

2.3.- ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA, ADIPOGÉNICA Y CONDROGÉNICA.

2.3.1.- DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.

La diferenciación osteogénica se evaluó tras 3 semanas en cultivo. Las células se sembraron por cuadruplicado en DMEM estándar en placas de cultivo de 6 pocillos (Greiner Bio-One®, Alemania) a una densidad de 1000 células/cm² manteniéndose a 37°C, 5% CO₂, y 95% de humedad. A los tres días se realizaba el cambio de medio en dos de los pocillos por el de diferenciación osteogénica NH Osteodiff Médium® (Miltenyi®, Bistec, Alemania). Este medio estaba compuesto por β -glicerol fosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona y suero bovino fetal. Los otros dos pocillos se mantenían con el mismo DMEM utilizado en la siembra inicial. Estos cultivos se mantuvieron durante 4 semanas. El recambio de medio se realizaba cada 3-4 días. Trascurrido este tiempo, se seleccionaban dos pocillos (uno control y otro con medio de diferenciación) para la evaluación de la diferenciación osteogénica a través de la coloración de la actividad de fosfatasa alcalina con el sustrato NBT (SIGMA FAST BCIP/NBT)® (Sigma Aldrich®, Estados Unidos) y otros dos para la investigación de los depósitos de calcio utilizando el colorante Alizarin Red® (Sigma Aldrich®, Estados Unidos).

Para la coloración de la actividad de fosfatasa alcalina, se retiraba el medio de cultivo y se lavaban los cultivos con DPBS, fijándose con metanol frío al 70% (Química Clínica aplicada®, España®) durante 5 minutos. Para comprobar la diferenciación se analizaba la actividad fosfatasa alcalina mediante tinción con la solución NBT/BCIP® (Nitroblue tetrazolium chloride 5 bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Roche®, Basel, Suiza) durante 20-30 minutos. De existir fosfatasa alcalina, ésta procesaba el sustrato y las células se teñían de color púrpura oscuro. Para la coloración con el Alizarín Red, se realizaba el mismo procedimiento de lavado y fijación con metanol, incubándose 30 minutos con el colorante a temperatura ambiente. Los depósitos de calcio se colorearían de color naranja con el Alizarin Red.

En cada técnica de evaluación de diferenciación osteogénica fue incluido un control negativo sin CSM.

2.3.2.- DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA.

La diferenciación adipogénica se evaluó tras 3 semanas en cultivo. Las células se sembraban por duplicado en DMEM estándar en a una densidad de 1000 cél/cm² manteniéndose a 37°C, 5% de CO₂ y una humedad del 95%. Se reemplazaba el medio cada tres días hasta que las células alcanzaban el 70-80% de confluencia. En este momento una de las muestras continuaba con DMEM (control negativo) y a la otra se le sustituía por el medio de diferenciación NH Adipodiff Médium® (Miltenyi Biotec®, Alemania). Para comprobar la existencia de acúmulos lipídicos citoplasmáticos se utilizó la tinción con Rojo al aceite-O (Oil-Red_O solution, Certistain® Merck KgaA, Darmstadt, Alemania). Para ello se retiraba el medio de cultivo de las placas, se lavaba dos veces con DPBS fijándose con metanol durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiraba el metanol y se lavaba con agua destilada añadiéndose 2 ml de Oil Red® (Sigma Aldrich®, Estados Unidos) a cada pocillo, manteniéndose en agitación lenta durante 1 hora a temperatura ambiente. La diferenciación adipogénica se evidenciaba por la presencia de vacuolas citoplasmáticas cargadas de grasas neutras coloreadas de rojo-naranja. En cada técnica de evaluación de diferenciación adipogénica volvió a incluirse un control negativo sin CSM.

2.3.3.- DIFERENCIACIÓN CONDROGÉNICA.

La diferenciación condrogénica se evaluó tras 4 semanas en cultivo. Se realizó en cultivos de micro-masa utilizando el medio de inducción NH ChondroDiff® (Miltenyi Biotec MACS® Media, Bergisch Gladbach, Alemania), estandarizado para la diferenciación condrogénica in vitro de las CSM de médula ósea. Las células se preparaban a una concentración final de 2.5×10^5 células/mL de medio estándar, se resuspendían y se colocaban en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml. Los tubos se centrifugaban a 150 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se les retiraba el DMEM y las células se resuspendían en 1 ml del medio NH ChondroDiff® (Miltenyi Biotec MACS® Media, Bergisch Gladbach, Alemania) pre-calentado a 37°C. De nuevo se centrifugaban a la misma velocidad, tiempo y temperatura, tras lo cual se incubaban en posición vertical en estufa a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% y humedad de 95%. El medio se reemplazaba cada tres días. Como control se cultivaron células en DMEM estándar con 10% de SBF. A los 24 días se procedió a la preparación de la muestra para evaluar la diferenciación condrogénica a través de la detección de colágeno II por coloración de los proteoglicanos por citoquímica. Para ello, se retiraba completamente el NH ChondroDiff®, se lavaba el pellet celular con DPBS y se fijaba en formaldehído al 4% en DPBS durante toda la noche. Al día siguiente se incluyeron los nódulos en parafina. Se cortaron secciones de los mismos de 5 micras y se colocaron sobre porta-objetos, secándolos en estufa a 37°C. Para la investigación de los proteoglicanos por citoquímica con la tinción del azul de alciano, los porta-objetos se fijaron con etanol al 95% y se coloreaban con una solución de azul alciano al 1% en ácido acético glacial al 3 %. En cada técnica de evaluación de diferenciación condrogénica fue incluido un control negativo sin CSM.

2.4.- ESTUDIO DE ESTABILIDAD CROMOSÓMICA. CARIOTIPO.

La estabilidad cromosómica de las células mesenquimales cultivadas fue estudiada mediante cariotipo convencional para comprobar la ausencia de alteraciones numéricas y estructurales. Para ello se envió un frasco T175 (Sarstedt®, Alemania) en pase 2 al 60% de confluencia de cada una de las muestras a la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. Se estudiaron 30 metafases y se cariotiparon 4, mediante tinción de bandas G. Mediante cariotipo convencional se comprobó la ausencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales.

3.- FUCOSILACIÓN DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.

Las CSM se recolectaron y lavaron dos veces con PBS. Los pellets celulares se resuspendieron en solución tamponada de Hank's® (Euroclone®, Italia) con 0,1% de Albúmina Sérica Humana (Grifols®, España), 1 mM de GDF-fucosa (Sigma Aldrich®, Estados Unidos) y 10 mM de Hepes (Euroclone®, Italia) a razón de 50×10^6 células/mL. Se añadió la enzima fucosiltransferasa VI (FTVI) a una concentración de 60 mU/mL, incubando posteriormente la mezcla a 37°C durante 1 hora en agitación. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las células a 700 g durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se efectuaron 2 lavados con DPBS y se tomaron muestras para control por citometría para evaluar la expresión de HCELL (mediante el anticuerpo específico HECA452) y de la afinidad in vitro de HCELL por E-selectina utilizando un anticuerpo quimérico recombinante de E-selectina murina/Fc humano. El buffer con calcio permitió distinguir la especificidad del estudio al ser necesario la presencia de este elemento para la unión de la E-selectina.

4.- TIPIFICACIÓN DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA. ETAPA POST-FUCOSILACIÓN.

Para confirmar la ausencia de cambios en las características de las células madre mesenquimales tras el proceso de fucosilación se repitió la tipificación celular empleando las mismas técnicas que antes de la fucosilación. Se volvió a evaluar morfología, características inmunofenotípicas, capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica y se realizó un nuevo estudio de estabilidad cromosómica mediante citogenética convencional.

5.- MODELO ANIMAL.

5.1.- INSTALACIONES FÍSICAS. CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES.

La recepción, aclimatación y observación de los ratones se ha realizado en el Centro de Experimentación e Investigación Biosanitaria (CEIB) localizado en la Calle Campo s/n 30100 El Palmar (Murcia). El sacrificio de los animales se realizó en la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, sito en Ctra. Madrid-Cartagena s/n, 30120 El Palmar (Murcia).

Las instalaciones del animalario del CEIB están construidas con paredes y pisos recubiertos por material de fácil lavado, resistente a la aplicación de desinfectantes; techos lisos, uniformes, fáciles de limpiar y con bordes sanitarios; cierres herméticos en las puertas, pediluvios con desinfectante de una sala a otra sala y barreras antiroedores y antiinsectos. En la instalación se controlan además numerosos factores ambientales (temperatura, humedad, ventilación, presurización) y físico-químicos (iluminación, ruido, sanitizantes, etc.). Se dispone además de ducha de aire y dos pasillos en donde se separan el acceso (estéril) y retorno de la sala, disminuyendo la probabilidad de transmisión de agentes infecciosos que supongan un riesgo en este modelo animal, especialmente vulnerable debido a su inmunodepresión.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a protocolos normalizados de trabajo con respecto al ingreso de personal, uso de materiales así como con lo respectivo a limpieza y desinfección de ambientes y materiales. Todas las tareas relacionadas con el cambio de cubetas, esterilización de cubetas y biberones de agua, manejo de animales y control sanitario fueron realizadas en campana de flujo laminar desinfectada. El material, biberones, cubetas, pienso y viruta fue suministrado en bolsas selladas tras pasar por autoclave y tanto la alimentación de los animales como el cambio de cubetas se realizó en la campana en condiciones de esterilidad.

Los animales del estudio estuvieron alojados en condiciones SPF (Libres de patógenos específicos) en sistemas de Racks ventilados con presión positiva. Los cambios de cubetas se realizaron en la cabina de flujo y seguridad biológica evitando riesgos de contaminación. Los biberones y el agua de bebida eran autoclavados. Las cubetas eran desinfectadas y autoclavadas. Las condiciones ambientales se mantuvieron de forma constante a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, temperatura constante de 20°C y humedad del 48% (331). Las jaulas contaron con acceso ad libitum al agua autoclavada y pienso irradiado, mantenidas en condiciones de esterilidad ya que los ratones del estudio presentaban inmunodepresión severa. La fórmula dietética del pienso fue la siguiente: 22% de proteínas, 5% de grasas, 5% de fibra y 3,5 Kcal/g.

El Comité Ético de Experimentación Animal (CEEa) del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca emitió un dictamen favorable del proyecto presentado (anexo II) tras considerar los informes propuestos y señalando que respeta los principios éticos básicos recogidos en la legislación actual vigente sobre protección de animales utilizados en investigación y otros fines científicos tanto a nivel nacional como europeo (332-334). Todo el personal implicado en este proyecto ha recibido la formación adecuada y obligatoria según Real Decreto 1201/2005 (Categorías B, en el caso de los técnicos y C, en el caso de los investigadores) y todos los procedimientos realizados fueron comunicados a la autoridad competente según la legislación mencionada anteriormente (332-334).

5.2.- CARACTERÍSTICAS DEL MODELO ANIMAL: RATONES NOD/SCID.

El estudio se realizó en un modelo de ratón inmunodeprimido *non-obese diabetic and severe combined immunodeficiency* (NOD/SCID) (Harlan® laboratories Inc, USA). Los ratones NOD/SCID (fotografía 1) son ratones albinos, diabéticos no obesos a los que se ha transferido el gen mutado *Prkdc^{scid}* (NOD.CB17-*Prkdc^{scid}*/NCrHsd) en el cromosoma 16 produciendo la aparición de Inmunodeficiencia Combinada Severa (ICS). La mutación de la ICS fue descubierta por el Dr. M.J. Bosma en el Fox Chase Cancer Center (Philadelphia, PA) en el locus C.B-17/lcr en el año 1980. Los ratones mutantes NOD/SCID fueron recibidos en el *National Cancer Institute* (NCI), Frederick, Maryland, en 2004 y adquiridos por Harlan Laboratories desde el NCI en 2006 (335).

La ICS presenta un patrón de herencia autosómica recesiva y se caracteriza por un deficiente desarrollo y funcionamiento de los linfocitos B y T. Esta mutación también provoca un funcionamiento anómalo en granulocitos, las células *Natural Killer* (NK) y en las células presentadoras de antígeno (CPA). Los ratones NOD/SCID carecen de sistema del complemento circulante. Presentan nódulos linfáticos ausentes o con hipocelularidad manifiesta y alteraciones en pulpa esplénica blanca. La pulpa roja es normal. Con el tiempo en algunos animales se ha observado adquisición espontánea de inmunidad humoral y celular (335;336).

La mediana de supervivencia de los ratones NOD/SCID en condiciones libres de patógenos es de unas 36-38 semanas de vida. Esta corta supervivencia se debe a una elevada susceptibilidad al desarrollo de infecciones oportunistas tanto virales como bacterianas y a una elevada incidencia de linfomas tímicos (con alta frecuencia de metástasis) representando éstos la principal causa de fallecimiento en esta cepa. No desarrollan diabetes autoinmune por la ICS. Debido a estas alteraciones inmunológicas, los ratones NOD/SCID son buenos receptores para la realización de xenotrasplantes de otras especies. Actualmente el modelo murino NOD/SCID está considerado como un modelo adecuado para el estudio del comportamiento de las células stem humanas en modelo animal. Los ratones NOD/SCID empleados suelen tener unas 5-6 semanas de vida en el momento de la recepción, son albinos y tienen un peso medio de 20-30 g (335).

Fotografía 1. Ratón NOD/SCID



6.- DISEÑO DEL ESTUDIO. TAMAÑO MUESTRAL.

Se diseñó un estudio prospectivo analítico de tres brazos con ratones NOD/SCID (ilustración 22). En el primer brazo infundimos 1×10^6 células stem mesenquimales humanas fucosiladas, en el segundo brazo infundimos 1×10^6 células stem mesenquimales sin fucosilar para comparar el anidamiento y formación ósea y en el tercero y último se infundió suero salino fisiológico (SSF) al 0,9% como grupo control para valorar seguridad de la infusión del producto. El cronograma de los estudios a realizar en cada semana, se especifica en las ilustraciones 23, 24, 25.

Ilustración 22. Ensayo preclínico fase I con tres brazos. CSMf (Células Stem Mesenquimales fucosiladas); CSM (Células Stem Mesenquimales); SSF (Suero salino fisiológico)

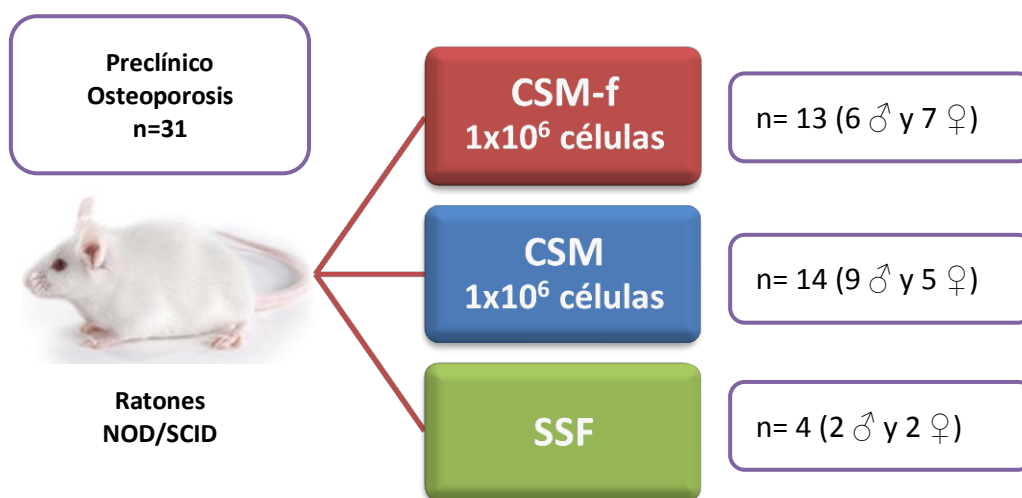


Ilustración 23. Cronograma de estudio preclínico de empleo de Células Stem Mesenquimales fucosiladas en la Osteoporosis (Semanas 1ª a 8ª).

	SEMANA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Obtención de MSC humanas de donantes								
Cultivo de MSC humanas								
Fucosilación de MSC								
Estudio de citometría de flujo (MO inicial y tras cultivo)								
Cultivos de diferenciación								

AcMo: Anticuerpo monoclonal; IHQ: Inmunohistoquímica; MO: Médula ósea.

Ilustración 24. Cronograma de estudio preclínico de empleo de Células Stem Mesenquimales fucosiladas en la Osteoporosis (Semanas 9ª a 16ª).

	SEMANA							
	9	10	11	12	13	14	15	16
Infusión en modelo murino NOD/SCID								
Sacrificio de los ratones								
Análisis qRT-PCR								
Extracción de órganos								
Estudio histológico e IHQ de órganos (osteocalcina humanos con AcMo)								
Estudio de toxicidad aguda								
Estudio de toxicidad crónica								

AcMo: Anticuerpo monoclonal; IHQ: Inmunohistoquímica; qRT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por retrotranscripción.

Ilustración 25. Cronograma de estudio preclínico de empleo de Células Stem Mesenquimales fucosiladas en la Osteoporosis (Semanas 17ª a final).

	SEMANA							
	17	18	19	20	21	22	23	24 → F
Sacrificio de los ratones								
Análisis qRT-PCR								
Extracción de órganos								
Estudio histológico e IHQ de órganos (osteocalcina humanos con AcMo)								
Estudio de toxicidad crónica								

AcMo: Anticuerpo monoclonal; IHQ: Inmunohistoquímica; qRT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por retrotranscripción.

Realizamos el cálculo del tamaño muestral para estudios en investigación con el objetivo de demostrar una eficacia superior en las CSM fucosiladas (CSM-f) cercana al doble en la neoformación ósea con respecto a las células stem mesenquimales sin fucosilar. Para ello consideramos una eficacia en la neoformación ósea de las CSM-f del 90% con respecto a las células mesenquimales sin fucosilar (eficacia del 10%) con un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%. Para identificar el mínimo número de animales a incluir en el estudio se aplicó la siguiente fórmula (337):

$$n = \frac{[Z_{\alpha} (2pq)^{\frac{1}{2}} - Z_{\beta} (p_e - q_e + p_c - q_c)^{\frac{1}{2}}]^2}{(p_e - q_c)^2}$$

Siendo:

n = tamaño muestral. Z_{α} = 1.96 para el 95% de confianza; Z_{β} = -0.84 para un error β del 20% (Potencia = $1 - \beta \rightarrow 80\%$); p_e = frecuencia de respuesta en los expuestos; p_c = frecuencia de respuesta en los no expuestos; $p = (p_e + p_c)/2$; $q = 1 - p$.

Por tanto:

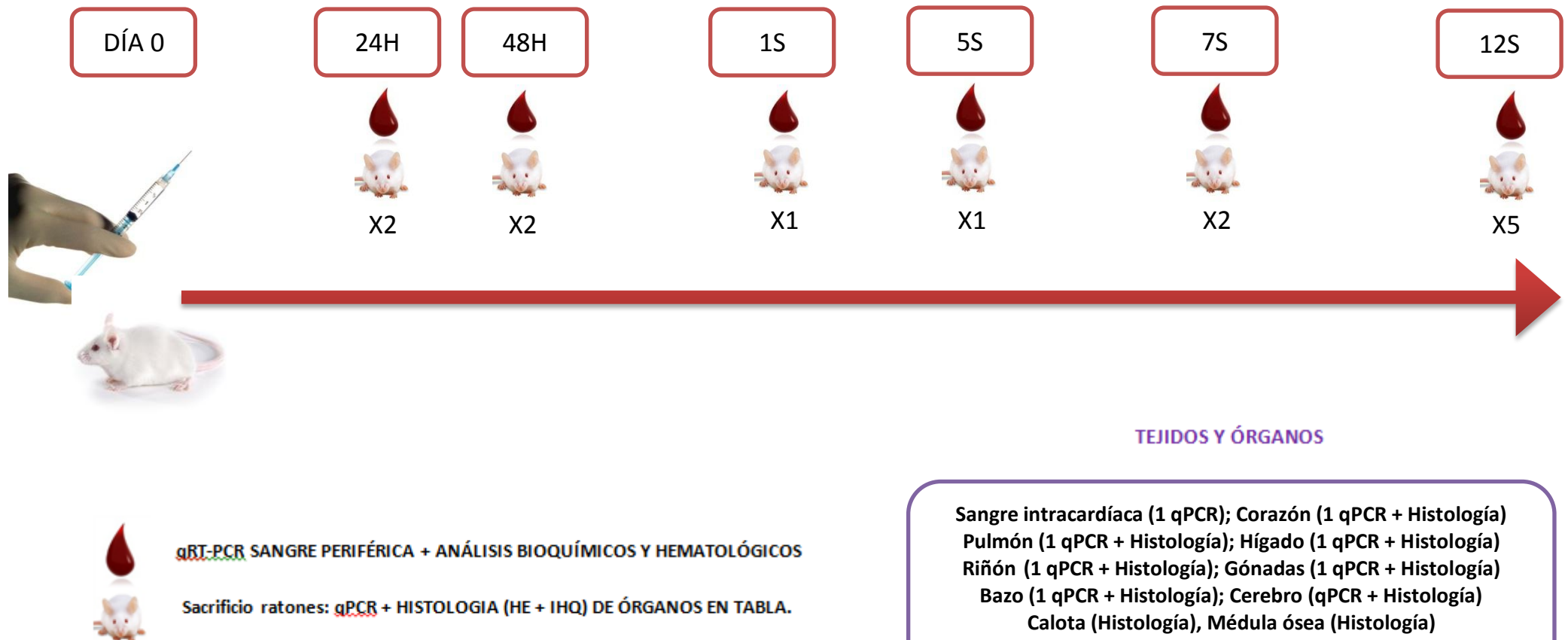
$$n = [1,96 * (2 * 0,5 * 0,5)^{1/2} + 0,84 * (0,9 * 0,1 + 0,1 * 0,9)^{1/2}]^2 / (0,9 - 0,1)^2 = 4,6.$$

Era necesario un mínimo de 5 individuos en cada grupo si el tratamiento con CSM fucosiladas es realmente un 80% más eficaz que las CSM sin fucosilar. El estudio permitirá determinar esta diferencia en el 80% de los casos ($1 - \text{error } \beta$) y si no existen diferencias, existe una probabilidad del 95% de que éstas realmente no se den en el estudio ($1 - \text{error } \alpha$) (341).

En nuestro incluimos un total de 31 ratones NOD/SCID. En 13 ratones NOD/SCID (6 machos y 5 hembras) administramos 1×10^6 células madre mesenquimales fucosiladas en una dosis única intravenosa (día 0) de 0.3 mL, mientras que en 14 (9 machos y 5 hembras) administramos 1×10^6 células madre mesenquimales sin fucosilar y en los otros 4 ratones NOD/SCID (2 machos y 2 hembras) se infundieron 0.3 mL de suero salino fisiológico al 0.9%. Con ello se evaluó el perfil de seguridad del medicamento (toxicidades aguda y crónica, biodistribución y estabilidad cromosómica) y determinaremos su eficacia en la formación de hueso humano en dicha localización.

Se fijaron las fechas de los sacrificios para una correcta evaluación de toxicidades aguda y crónica de las CSM humanas fucosiladas administradas, su biodistribución, el anidamiento o "homing" medular y la hipotética diferenciación osteoblástica (ilustraciones 20, 21, 22 y 23). En este sentido, tras la infusión celular los ratones fueron sacrificados en los siguientes tiempos postinfusión: 1 día, 2 días, 1 semana, 5 semanas, 7 semanas y 12 semanas postinfusión. Los ratones infundidos con suero salino fisiológico, con Células Stem Mesenquimales sin fucosilar y los restantes 7 ratones infundidos Células Stem Mesenquimales fucosiladas se sacrificaron en la 12ª semana, fecha final del estudio para valorar eficacia (ilustración 26).

Ilustración 26. Cronograma de sacrificios para extracción de muestras de Ensayo Preclínico fase I en ratones infundidos con Células Stem Mesenquimales fucosiladas

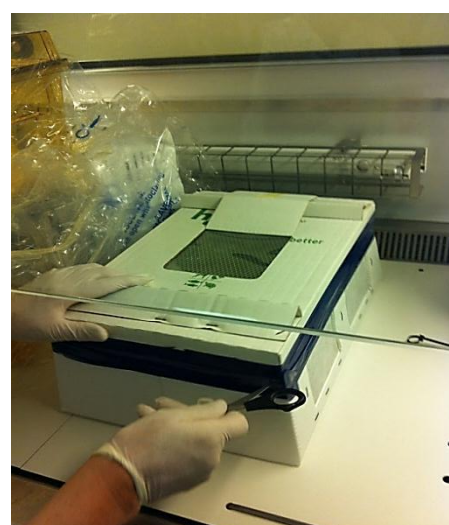


7.- METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.

7.1.- RECEPCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS RATONES NOD/SCID.

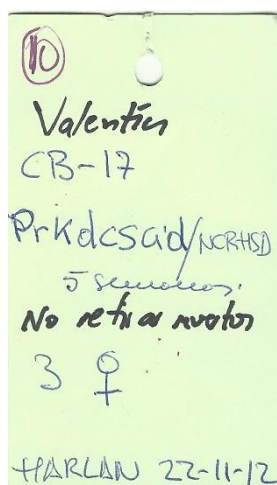
Antes de realizar el estudio se aclimataron los animales durante 2 semanas tras su recepción. Su manejo se realizó en jaulas con 3 animales cada una. A su llegada, en el interior de la cabina de flujo laminar se retiraron de la caja de transporte (Fotografía 2) y se colocaron en jaulas estériles (fotografía 3), portando el operario guantes estériles. Partes del proceso se muestran en las fotografías 4 y 5.

Fotografías 2,3,4 y 5. Envase estéril de transporte de los ratones NOD/SCID el día de recepción en el CEIB (Izquierda). Jaula estéril (Derecha). Cambio de ratones de caja precintada a jaula estéril (inferiores).



Los animales venían distribuidos en cajas en función del sexo. A su llegada se realizó una verificación del sexo observando la distancia anogenital, de menos tamaño en las hembras (331). A continuación seguimos el protocolo normalizado de trabajo para la fase de recepción y acondicionamiento de los ratones al animalario (anexo III). Lo primero fue rotular etiquetas para las jaulas en las que iban a situarse los ratones de forma individual en el que escribíamos el número de jaula, el nombre del investigador responsable, la cepa, el número de animales, la edad del animal en la recepción, la procedencia, la fecha de recepción y la alerta de “No retirar animales fallecidos” (fotografía 6).

Fotografía 6. Etiqueta identificativa de jaula estéril.



La distribución de los ratones se realizó en 12 jaulas, rotuladas de la 1 a la 12, de tal forma que 8 jaulas contenían 3 ratones, 3 jaulas 2 ratones y 1 jaula 1 animal. En cada jaula solo se mezclaron animales del mismo sexo. Los machos se distribuyeron en las seis primeras jaulas (del número 1 al 6) y las hembras en las siguientes (jaulas de la 7 a la 12). Después en el interior de la campana, se procedió a identificar a cada animal de forma independiente. Para ello, se empleó la perforación de la oreja con un microperforador, tal y como se explica a continuación:

Con guantes estériles y sujetándolo de la cola con la mano izquierda, apoyamos el animal en la rejilla y posteriormente lo sujetamos por los omóplatos para inmovilizarlo y girarlo para facilitar la perforación de la oreja. Al ratón que le perforemos la oreja izquierda, se le asignó la letra A en la ficha identificativa. Al que le perforamos la oreja derecha, se le asignó la letra B y al que no se perforó ninguna la letra C.

Con este algoritmo, conseguimos diferenciar a cada animal del estudio. Por ejemplo el ratón 1A es aquel que estaba ubicado en la jaula número 1 y tenía una microperforación en oreja izquierda. La distribución quedó como se muestra en la ilustración 27.

Ilustración 27. Esquema de distribución e identificación de los ratones NOD/SCID en las diferentes jaulas. Color rojo (machos). Color verde (hembras)

1A 1B 1C	2A 2B 2C	3A 3B 3C
4A 4B 4C	5B 5C	6A 6B 6C
7A 7B 7C	8A 8C	9A 9B 9C
10A 10B 10C	11B 11C	12C

7.2.- HOJA EVOLUTIVA DE RATÓN NOD/SCID:

Una vez identificados se le asignaba una hoja de recogida de datos individual previamente diseñada (anexo IV) en la que reflejamos la evolución. Antes del comienzo del estudio, Introdujimos la jaula en la cabina de flujo y procedimos a coger cada ratón NOD/SCID para, de forma independiente en el menor tiempo posible de exposición fuera de la jaula, examinarlos, comprobando una serie de ítems para anotar el score clínico que empleamos para valorar el bienestar y que explicaremos más adelante (338). Una vez comprobado el estado con cada uno de los ítems, calculamos el score y lo anotamos en la ficha identificativa del ratón (ver apartado 7.6.1.). Posteriormente realizamos el pesaje del ratón en balanza de precisión, anotando el peso de igual forma en la ficha identificativa (anexo IV). En esta hoja de recogida de datos del seguimiento (Ilustraciones 28, 29, 30 y 31) se incluyeron los siguientes datos:

a. Datos de recepción:

i. **ID/jaula:** En este ítem se señalaba el número identificativo de cada animal

ii. **Sexo:** macho o hembra.

iii. **Código de CEIB:** se anotaba un código de registro en el CEIB de forma que los cuatro primeros dígitos hacían referencia al día de infusión. A continuación se añadía la letra S y el número de semana en el que iba a ser sacrificado y por último dos dígitos identificativos para diferenciarlo de otros animales, ya que en el mismo día se sacrificarían varios animales. De tal forma que un ratón con el siguiente código: 1204S1204 correspondía a un ratón infundido el 4 de Diciembre de 2012 que fue sacrificado en la semana duodécima y su código identificativo es el 04. Este código se asociará a un código otorgado en el Biobanco (Biobanc Mur) en el momento del sacrificio a cada animal para la identificación y correcta trazabilidad de todas las muestras de un animal y que se colocaba mediante pegatina el día de sacrificio en el dossier de cada animal.

iv. **Peso en el momento de la recepción:** en gramos.

v. **Movilidad.**

vi. **Aspecto externo.**

b. Días de acondicionamiento: Aquí se registraban las evoluciones desde la recepción hasta el momento de la infusión. Se anotaba:

i. **Movilidad.**

ii. **Aspecto externo.**

iii. **Peso previo a infusión.**

iv. **Score previo a infusión.**

c. Infusión:

i. **Producto infundido:** Células Stem Mesenquimales fucosiladas, Células Stem Mesenquimales sin fucosilar o suero salino fisiológico.

ii. **Número de Células Stem Mesenquimales infundidas:** no completado en el caso de los ratones infundidos con SSF.

iii. **Volumen infundido.**

iv. **Punción:** correcta o dificultosa.

v. **Complicaciones relacionadas con la administración intravenosa:** sangrado, extravasación...

Ilustración 28. Hoja de seguimiento ratón NOD/SCID (Parte 1).

RATON NOD/SCID	
A = orificio oreja izq, B= orificio oreja derecha, C:= sin orificio en oreja.	
DATOS DE RECEPCIÓN	
ID/ JAULA	PESO
SEXO	MOVILIDAD
CÓDIGO	ASPECTO EXTERNO
DÍAS DE ACONDICIONAMIENTO	
MOVILIDAD	
ASPECTO EXTERNO	
PESO PREVIO A INFUSIÓN (g)	
SCORE PREVIO A INFUSIÓN ANEXO	
INFUSIÓN	
MSCh-fucosiladas o SSF 0.9%	
Número de MSCh-f infundidas	
VOLUMEN INFUNDIDO	
PUNCIÓN	
COMPLICACIONES	

c. Score de toxicidad aguda:

i. Se registró a los 5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 1 día y 2 días postinfusión.

d. Score de toxicidad crónica:

i. Se registró el score en la 1ª , 2ª, 5ª, 7ª, 9ª y 12ª semana postinfusión en todos los ratones hasta el momento del sacrificio.

e. Peso:

i. Se registró en el 1º y 2º días y también a la 1ª , 2ª, 5ª, 7ª, 9ª y 12ª semana postinfusión en todos los ratones hasta el momento del sacrificio.

g. Sacrificio:

i. Aquí se anotaba el día o semana de sacrificio postinfusión.

Ilustración 29. Hoja de seguimiento ratón NOD/SCID (Parte 2).

SCORE TOXICIDAD AGUDA (ANEXO)	
5 MIN	2 HORAS
10 MIN	3 HORAS
15 MIN	4 HORAS
30 MIN	1 DÍA
1 HORA	2 DÍAS
SCORE TOXICIDAD CRÓNICA (ANEXO)	
1 SEMANA	7 SEMANAS
2 SEMANAS	9 SEMANAS
5 SEMANAS	12 SEMANAS
PESO	
1 DÍA	5 SEMANAS
2 DÍAS	7 SEMANAS
1 SEMANA	9 SEMANAS
2 SEMANAS	12 SEMANAS
SACRIFICIO	
DÍA SACRIFICIO +	

h. Análisis hematológico/bioquímico:

- i. Se anotaban los parámetros analíticos en sangre tras extracción de sangre por punción intracavitaria cardíaca en el momento posterior del sacrificio.
- ii. **Hemograma:** Hemoglobina, plaquetas y leucocitos con fórmula leucocitaria.
- iii. **Bioquímica:** Glucosa, urea, creatinina, GOT, GPT, calcio y fósforo.

i. Muestras obtenidas para qPCR:

- i. Se anotaba en la hoja la correcta recogida de las muestras de cada uno de los órganos para realización de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por método de retrotranscripción (qRT-PCR).

i. Muestras obtenidas para histología:

- i. Se anotaba en la hoja la correcta recogida de las muestras de cada uno de los órganos para realización de histología e inmunohistoquímica con anticuerpo antiostecalcina humana.

k. Resultados de qPCR:

- i. Se anotaba en la hoja los resultados de la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por método de retrotranscripción (qRT-PCR) de cada uno de los órganos.

k. Resultados de histología:

- i. Se anotaba en la hoja los resultados de la histología e inmunohistoquímica con anticuerpo antiostecalcina humana.

Ilustración 30. Hoja de seguimiento ratón NOD/SCID (Parte 3).

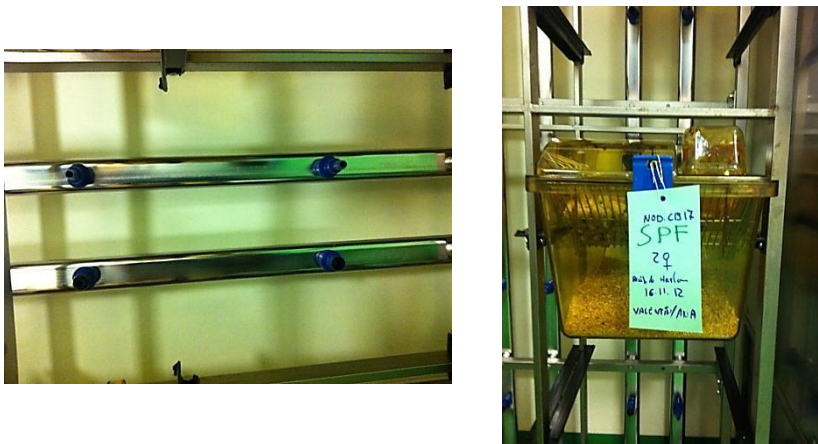
ANÁLISIS BIOQUÍMICO HEMATOLÓGICO	
<i>Glucosa</i>	Hb
<i>Urea</i>	Plaquetas
<i>Creatinina</i>	Leucocitos
<i>GOT</i>	Neutrófilos
<i>GPT</i>	Linfocitos
<i>Calcio</i>	Monocitos
<i>Fósforo</i>	Eosinófilos
<i>FA ósea</i>	Basófilos
<i>C-Tx o Beta Cross</i>	
MUESTRAS OBTENIDAS qPCR	
<i>Sangre intracardíaca (0)</i>	<i>Riñón (5)</i>
<i>Corazón (1)</i>	<i>Gónada (6)</i>
<i>Pulmón (2)</i>	<i>Cerebro (7)</i>
<i>Hígado (3)</i>	<i>Médula ósea (8)</i>
<i>Bazo (4)</i>	<i>Calota (9)</i>
MUESTRAS OBTENIDAS HISTOLOGÍA	
<i>Sangre intracardíaca (0)</i>	<i>Riñón (5)</i>
<i>Corazón (1)</i>	<i>Gónada (6)</i>
<i>Pulmón (2)</i>	<i>Cerebro (7)</i>
<i>Hígado (3)</i>	<i>Médula ósea (8)</i>
<i>Bazo (4)</i>	<i>Calota (9)</i>

Ilustración 31. Hoja de seguimiento ratón NOD/SCID (Parte 4).

RESULTADOS qPCR	
<i>Sangre intracardíaca (0)</i>	<i>Riñón (5)</i>
<i>Corazón (1)</i>	<i>Gónada (6)</i>
<i>Pulmón (2)</i>	<i>Cerebro (7)</i>
<i>Hígado (3)</i>	<i>Médula ósea (8)</i>
<i>Bazo (4)</i>	<i>Calota (9)</i>
RESULTADOS HISTOLOGÍA	
<i>Sangre intracardíaca (0)</i>	<i>Riñón (5)</i>
<i>Corazón (1)</i>	<i>Gónada (6)</i>
<i>Pulmón (2)</i>	<i>Cerebro (7)</i>
<i>Hígado (3)</i>	<i>Médula ósea (8)</i>
<i>Bazo (4)</i>	<i>Calota (9)</i>
Comentarios:	

Al concluir con todos los ratones de una jaula los colocamos en los racks con ventilación independiente para cada jaula (fotografías 7 y 8).

Fotografías 7 y 8. Sistema de ventilación individual para cada jaula en los racks (Izquierda). Jaula colocada en rack correctamente identificada (Derecha).



7.3.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA EN MODELO MURINO NOD/SCID.

En 21 ratones NOD/SCID (10 machos y 11 hembras) administramos 1×10^6 células madre mesenquimales fucosiladas en una dosis única intravenosa (día 1) de 0.3 mL, mientras que en 14 (9 machos y 5 hembras) administramos 1×10^6 células madre mesenquimales sin fucosilar y en los otros 4 ratones NOD/SCID (2 machos y 2 hembras) se infundieron 0.3 mL de suero salino fisiológico al 0.9%.

7.3.1.- DETERMINACIÓN DE DOSIS FINAL DE PRODUCTO A INFUNDIR.

La dosis mencionada se ha elegido teniendo en cuenta tanto el estudio de Horwitz sobre infusión intravenosa de CSM alogénicas en niños afectados de Osteogénesis Imperfecta como otras publicaciones y ensayos clínicos (EECC) en marcha en los que se emplean CSM por vía intravenosa, las dosis utilizadas van desde 0,4 hasta 9×10^6 células/kg del receptor (311-313).

7.3.2.- PREPARACIÓN Y PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA.

El día de la infusión se cogían las fichas identificativas de los ratones y el protocolo normalizado de trabajo para el día de infusión (anexo V) adaptado de las técnicas para la inoculación de muestras del Comité Ético de Experimentación Animal del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (339). Tras la colocación de calzas, bata estéril, guantes y mascarilla se pasaba a la zona del animalario por la ducha de aire. Tras conectar la campana del animalario se esperaba 15 minutos para la ventilación de la misma. Se entregó al operador que se encontraba estéril el material necesario para la infusión:

- a. Paño estéril.
- b. Gasas secas.
- c. Gasas empapadas en alcohol.
- d. Agujas de tamaño 25G.
- e. Aguja de punción lumbar (22-24G).
- f. Jeringas de insulina.
- g. 2 ampollas de 100 mL de SSF al 0.9%.
- h. Cepo desinfectado (fotografía 9).
- i. Lámpara de luz infrarroja (fotografía 10).

Fotografía 9. Cepo

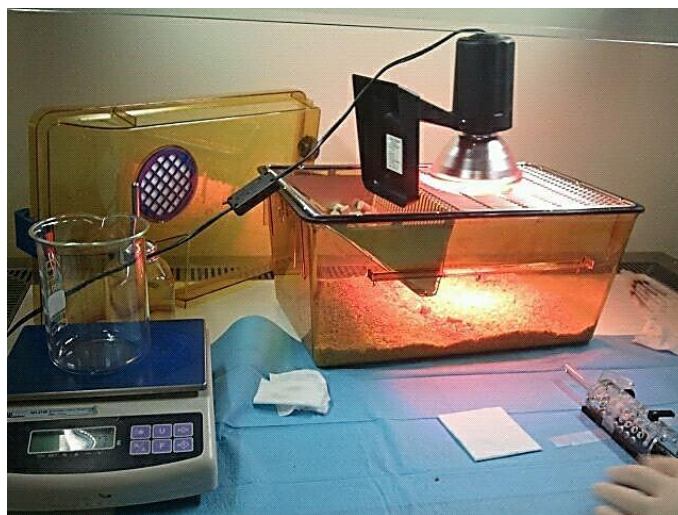


Fotografía 10. Lámpara de luz infrarroja



Con todos los materiales en el interior de la cabina, se introducían las jaulas con los ratones NOD/SCID con ayuda de otro operador. Para facilitar la infusión se aplicó luz infrarroja a cada jaula para dilatación de las venas laterales de la cola de ratón un tiempo de 10-15 minutos previo a la infusión, evitando que incidiera directamente sobre los ojos del animal para evitar quemaduras (fotografía 11). El cepo era fijado con cinta adhesiva sobre paño estéril.

Fotografía 11. Vasodilatación con lámpara de luz infrarroja previa a la infusión



Posteriormente se entregaban al operador las jeringas estériles con el producto a infundir: 1×10^6 CSM humanas fucosiladas o sin fucosilar, resuspendidas en 0,3 mL de SSF estéril o 0,3 mL de SSF sin CSM. El suero salino fisiológico había sido alicuotado previamente y mantenido en condiciones de esterilidad. El volumen circulante del ratón es de 72 mL/kg. El volumen celular infundido por vía endovenosa fue de 200-300 μ L. Decidimos el volumen administrado en base a las recomendaciones del CSIC en la infusión endovenosa en para el modelo murino (200-300 μ L) (339).

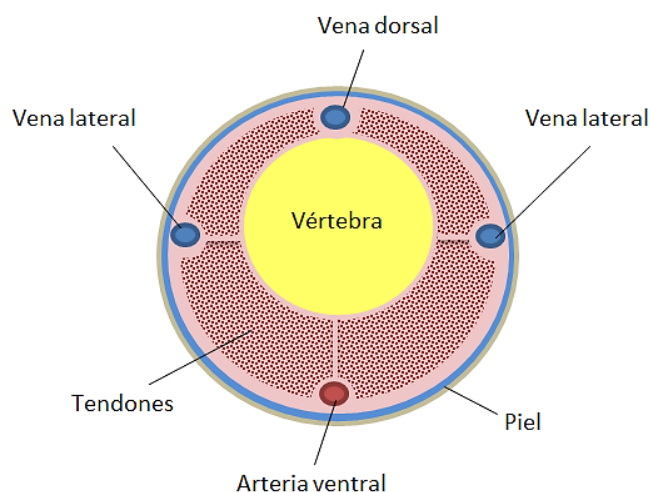
Previamente a la infusión realizamos los siguientes pasos con la jeringa cargada con la aguja se realizó purgado de la jeringa, eliminando todo el aire del contenido de la misma para evitar la entrada de aire (prevención primaria de embolismos gaseosos).

Con la jeringa totalmente preparada y colocada encima del paño estéril se cogía de la jaula a cada ratón sosteniéndolo por el tercio más distal de su cola para el proceso de la infusión.

Se procedía a un nuevo control de identificación de cada ratón en función del número de jaula y la perforación presentada en la oreja (por ejemplo en la jaula 3 y perforación en oreja derecha → Ratón 3B).

Una vez cogido al ratón lo introducimos en el cepo y lo cerramos. Se aplicó en cada ratón un masaje suave en la cola con las gasas empapadas en alcohol para facilitar la dilatación de las venas laterales de la cola. Las venas laterales se localizan a ambos lados de la línea central de la cola y muy superficialmente de manera que la inyección debe hacerse prácticamente paralela a la superficie (Ilustración 32).

Ilustración 32. Sección transversal de cola de ratón.



Sujetando firmemente el extremo distal de la cola del ratón con nuestro pulgar e índice de la mano no dominante, se giraba ésta 90° a izquierda o derecha, identificando las venas laterales (cordón oscuro). A continuación, introducimos la aguja con la mano dominante lo más paralelo a la superficie de la piel de la cola del ratón unos 2-3 mm y lo más distalmente posible (evitando así el colapso de la vena, por si no se conseguía su canalización en un primer intento). En caso de colapso en primer lugar intentar de nuevo el acceso por la misma vena pero más proximalmente y en última instancia otro intento en la vena del otro lado volviendo a iniciar el proceso lo más distal posible. Los signos que nos indican la canalización de la vena son los siguientes: presencia de reflujo sanguíneo en aguja +/- jeringa junto a la ausencia de resistencia a la hora de infundir el producto. En caso de resistencia deberemos retirar la aguja e intentar canalizar en otro plano, ya que en la mayoría de ocasiones se habrá entrado con un ángulo demasiado elevado. Una vez canalizada la vía venosa, se procedió a la infusión del producto en un tiempo de 5 segundos, identificando previamente si se trata de CSM fucosiladas, sin fucosilar o de suero salino (fotografías 12 y 13). Tras la inoculación se realizaba compresión con gasa estéril en el lugar de la punción para asegurar una hemostasia correcta y se devolvía el ratón a su jaula. El cepo era desinfectado tras la infusión de cada animal. Todo el

proceso era registrado en la ficha de identificación del ratón junto al volumen infundido y la hora de administración para el seguimiento estrecho de toxicidad aguda mediante los ítems del score (anexo III).

Fotografías 12 y 13. Canalización de vena lateral de cola de ratón e infusión del producto



7.4.- PROTOCOLO DE SACRIFICIO DE RATONES NOD/SCID.

Los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO_2 . Una concentración de CO_2 >70% induce una rápida pérdida de consciencia con desarrollo de hipoxia en modelo murino (340). Se introdujeron los ratones en cabina de CO_2 con entrada por tubo de gas desde una bombona (fotografía 14). La apertura posterior del gas durante 2 minutos a 2-3 atmósferas de presión. Una vez cerrada la válvula de dicho gas los animales permanecían en la campana, completamente sellada, durante 2-3 minutos más. Una vez sacrificado el animal, se procedió a la necropsia por órganos para la obtención de todas las muestras biológicas necesarias.

Fotografía 14. Bombona de CO_2 y recipiente para sacrificio de los ratones



7.5.- PROTOCOLO DE NECROPSIA REGLADA EN RATONES NOD/SCID.

Los días de sacrificio se cogían las fichas identificativas de los ratones y el protocolo normalizado de trabajo para el día de sacrificio (anexo VI). En primer lugar, se colocaban los cassettes impresos con el código del Biobanco asignado a cada animal para estudio histológico (fotografía 15) y se rotulaban con el mismo código unos criomoldes (fotografía 16) con rotulador permanente, donde depositaríamos los órganos para estudio de qRT-PCR, con el código correspondiente del biobanco. Estos códigos terminaban con un guión y un número del 1 al 10 que hacía referencia a cada uno de los órganos extraídos para estudio, y de esta forma el mismo órgano siempre tenía el mismo número. A continuación detallamos el orden de los órganos tomados:

Fotografías 15 y 16. Cassete para estudio histológico e inmunohistoquímico (Izquierda). Criomoldes para inmersión de órganos en OCT y posterior estudio de qRT-PCR (Derecha).



Tras el sacrificio de los animales con el método de inhalación de CO₂ y previamente a la disección se procedía a la identificación del ratón y colocación de su ficha en la mesa. Se anotaba el código de biobanco en la ficha identificativa de cada ratón (fotografía 17) y se rellenaba la solicitud del biobanco (anexo 7) donde apuntábamos el código de CEIB del animal (fotografía 18).

Fotografías 17 y 18. Hoja identificativa de cada ratón con código de Biobanco en parte superior derecha (Izquierda). Solicitud de Servicio a Biobanc Mur (Derecha).

RATON NOD/ 12N0000102
A = orificio oreja Izq, B = orificio oreja derecha

DATOS DE RECEPCIÓN

ID/ JAULA **9B** PESO **19,8**
SEXO **♀** MOVILIDAD **OK**
CÓDIGO **120451204** ASPECTO EXTERNO **OK**

DÍAS DE ACONDICIONAMIENTO **4/12**

MOVILIDAD **OK** 21/11 23/11 4/12
ASPECTO EXTERNO **OK** 19,8 19,1 20,8
PESO PREVIO A INFUSIÓN (g) **0** 0 0
SCORE PREVIO A INFUSIÓN ANEXO **0** 0 0

INFUSIÓN

MSCh-fucosiladas o SSF 0.9% **Si (H24 F)**
Número de MSCh-f infundidas **1 x 10⁶**
VOLUMEN INFUNDIDO **300 µL**
PUNCIÓN **OK**
COMPLICACIONES **NO**

SCORE TOXICIDAD AGUDA (ANEXO)

5 MIN **0** 2 HORAS **0**
10 MIN **0** 3 HORAS **0**
15 MIN **0** 4 HORAS **0**
30 MIN **0** 1 DÍA **0**
1 HORA **0** 2 DÍAS **0**

SCORE TOXICIDAD CRÓNICA (ANEXO)

1 SEMANA **0** 7 SEMANAS **0**
2 SEMANAS **0** 9 SEMANAS **0**
5 SEMANAS **0** 12 SEMANAS **0**


BIOBANC-MUR (Nodo 1)
 Biobanco en Red de la Región de Murcia

Solicitud de Servicios

Peticionario: VALENTIN CABARAS PERIANES	A rellenar Biobanco	A rellenar Biobanco
	Nº Solicitud	Peticion Servicio
Unidad/Servicio/Departamento: HEMATOLOGÍA		PV
Fecha:	BM	PC
		PCU

Tipo de Muestra: ☐ Derivado Hemático ☐ Tejido ☐ Fresco ☐ Otros

☒ **Técnicas de Biología Molecular**

Obtención de Ácidos Nucleicos	Nº	Control de calidad de Ácidos Nucleicos	Nº	Estudios de Metilación	Nº
☐ ADN		☐ Concentración y Pureza (TECAM)		☐ Tratamiento con Bisulfito	
☐ ARN		☐ Integridad (Electroforesis)		☐ PCR	
☐ ADN complementario		☐ Funcionalidad (PCR)		☐ Pirosecuenciación	
PCR	Nº	Pirosecuenciación	Nº	Otras técnicas	Nº
☐ QPCR		☐ Detección de mutaciones			
☐ PCR a tiempo final		☐ Secuenciación de SNPs			

☒ **Técnicas en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica (HUA)**

Proceso de Tejidos	Nº	Técnicas	Nº	Técnicas	Nº
☐ Inclusión en Parafina		☐ Histoquímica		☐ FISH	
☐ Formación de Bloques		☐ Inmunohistoquímica		☐ Hibridación in situ	
☐ Cortes Histológicos					

* Para más información contactar con Biobanc-Mur Nodo 1

Comentarios

1 CORAZON CASSETTE + CRIOMOLDE	7 CEREBRO CASSETTE + CRIOMOLDE
2 PULMON CASSETTE + CRIOMOLDE	8 MO PELLET EN MICROTUBO 1,5
3 HIGADO CASSETTE + CRIOMOLDE	9 CALOTÁ CASSETTE
4 BAZO CASSETTE + CRIOMOLDE	10 SP TUBO 150 EXTRAER-ARN-cDNA
5 RIÑON CASSETTE + CRIOMOLDE	
6 GONADA CASSETTE + CRIOMOLDE	

Al mismo tiempo se rotularán con el ID del ratón 2 tubos Microvette® CB 300 con EDTA (Sarstedt®, Nümbrecht Alemania) (tapón rojo) y 2 tubos Microvette® CB 300 secos (Sarstedt®, Nümbrecht Alemania) (tapón blanco) para depositar en ellos la sangre intracardiaca para la realización de los análisis hematológicos, bioquímicos y la RT-PCR en sangre (fotografía 19).

Fotografía 19. Microvette seco para análisis bioquímico en parte superior de la imagen. Microvette con EDTA para análisis hematológico y RT-PCR en parte inferior de imagen.



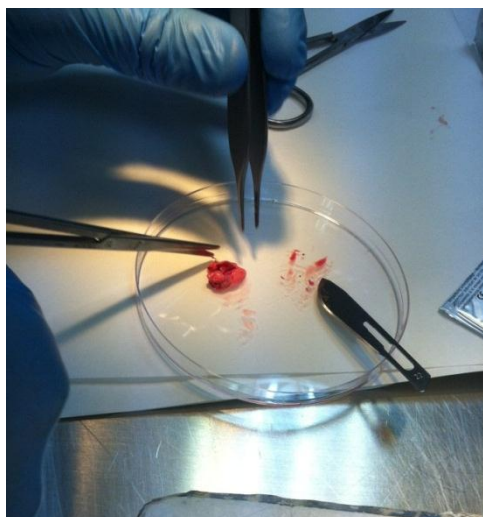
Tras desinfectar con alcohol el animal se iniciaba la necropsia. La disección del animal comenzaba por una apertura de la pared torácica mediante esternotomía media con tijera para acceder a pulmón y corazón (fotografía 20). Acto seguido por punción intracardiaca con aguja de 25G (ventrículo derecho) se realizó extracción de la sangre intracardiaca en cada animal (fotografía 21) para análisis hematológico, bioquímico y qRT-PCR. La sangre recolectada (unos 300 μ L totales de sangre) se iba depositando hasta llenar cada tubo alternando entre un tubo seco y posteriormente un tubo con EDTA.

**Fotografías 20 y 21. Esternotomía media en ratón NOD/SCID (Izquierda).
Punción de ventrículo derecho para obtención de sangre intracardiaca (Derecha).**



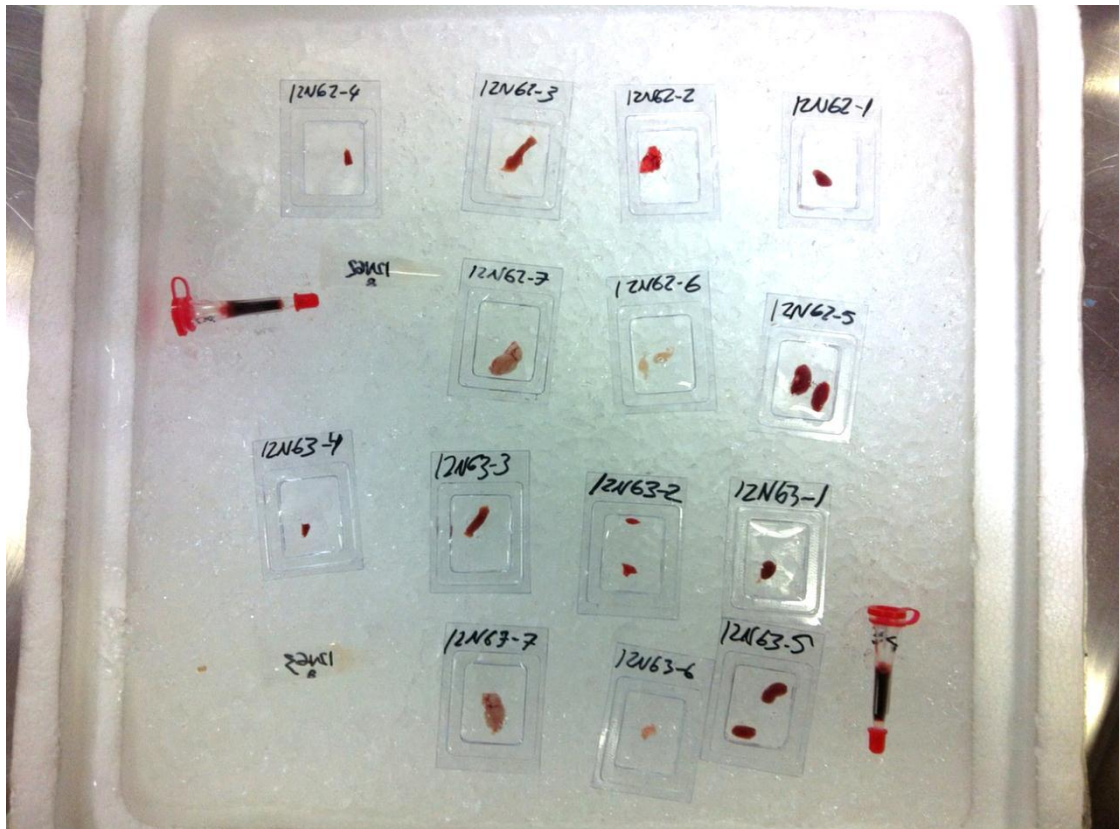
Una vez recolectada la sangre se procedía a la extracción de cada uno de los órganos, realizando una descripción macroscópica de los mismos. Al extraer cada órgano, excepto calota, se colocaba en una placa de Petri y se seccionaba por la mitad (fotografía 22). Una de las mitades se colocaba en el cassette para anatomía patológica (fotografía 23) y se incluía en un matraz con formol. Los órganos extraídos para histología y estudio inmunohistoquímico fueron: corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, gónadas (ovarios y testículos), cerebro, calota (fotografía 24) y médula ósea de una tibia.

Fotografías 22, 23 y 24. Corazón de ratón NOD/SCID en placa de Petri (Imagen superior-izquierda). Secciones de pulmón en cassette (Imagen superior-derecha). Cerebro y calota en placa de Petri (Imagen inferior).



La otra mitad del órgano se depositaba en los criomoldes situados sobre hielo seco, previamente impregnados con una capa de un gel crioprotector a base de resinas y alcoholes denominado OCT® (Sakura®, The Netherlands). Una vez colocado, cubríamos el resto del órgano con OCT® quedando sumergido por completo (fotografía 25). Los criomoldes se sometían a un proceso de congelación ultrarápida al introducirlos en isopentano a -80°C en congelador Bright Clini-RF (Bright Instrument Co Ltd®, Inglaterra) (fotografía 26) adquiriendo el gel una coloración blanquecina. Los criomoldes con los órganos se mantuvieron congelados hasta el procesamiento de las muestras para qRT-PCR. Los órganos y tejidos tomados para estudio de biodistribución por qRT-PCR fueron: corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, gónadas (ovarios y testículos), cerebro, sangre periférica en EDTA y médula ósea de la otra tibia.

Fotografía 25. Muestras de órganos de dos ratones NOD/SCID sacrificados en criomoldes sobre hielo seco para estudio de qRT-PCR

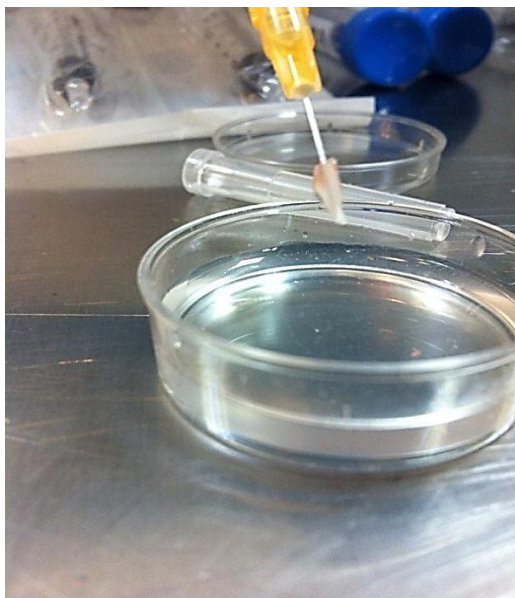


Fotografía 26. Congelador Bright Clini-RF (Bright Instrument Co Ltd®, Inglaterra)



Para realizar el “pellet” de células de médula ósea, colocábamos la tibia extraída sobre placa de Petri con 2-3 mL de PBS diluido (1/10) y la seccionábamos por los dos extremos. Por uno de los fragmentos introducíamos una aguja de 25G conectada a una jeringa con SSF y perfundíamos el hueso, obteniendo la médula ósea por el otro extremo al PBS (fotografía 27). Una vez teníamos la médula ósea en el PBS, resuspendíamos varias veces con la jeringa y tras cargar la mezcla resultante la pasamos a través de un filtro a un tubo eppendorf de 15 mL con el fin de retener todos los segmentos óseos. Tras ese paso, centrifugábamos el tubo a 10.000 rpm 5 minutos a 21°C, lo recolectamos el pellet (imagen) tras decantación del sobrenadante, lo traspasábamos a un eppendorf de 1,5 mL y lo conservábamos sobre el hielo seco. Cada vez que recogíamos una muestra de órgano o tejido se anotaba en la ficha identificativa del ratón.

Fotografía 27. Perfusión de tibia de ratón NOD/SCID con PBS para obtención de médula ósea.



7.6.- EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA.

La toxicidad aguda fue evaluada mediante score clínico de bienestar animal (ver apartado 7.6.1.) a los 5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas. También se realizaron análisis hematológicos y bioquímicos de sangre intracardiaca junto a evaluación mediante histología en los órganos de 4 ratones sacrificados que habían recibido CSM fucosiladas: 1 macho y 1 hembra en el 1º día postinfusión y 1 macho y 1 hembra en el 2º día postinfusión.

7.6.1.- SCORE CLÍNICO.

En condiciones normales, los valores del examen físico de los ratones que incluyen la temperatura, pulso y respiración, son de 37.5 °C, 600 pulsaciones/min y 163 respiraciones/min, respectivamente. Los ratones fueron monitorizados en el momento de la infusión para evaluar efectos adversos relacionados con la administración y las reacciones agudas ocasionadas por el producto infundido (Embolismo pulmonar, edema agudo de pulmón por sobrecarga, etc.), en los días posteriores a la infusión (331;338).

La supervisión de los animales se llevó a cabo analizando signos indicativos del bienestar animal: monitorización del peso corporal, estado de hidratación, apariencia física (piloerección, posición encorvada...), posturas antiálgicas, comportamiento espontáneo y provocado frente a estímulos del investigador. El fin es establecer unos criterios objetivos de punto final donde el sufrimiento del animal en experimentación determine realizar eutanasia. Estos criterios son adaptables a todos los procedimientos y son los investigadores los que basándose en scores clínicos empleados en otros ensayos de experimentación animal deben establecer protocolos donde se determinen los algoritmos de actuación en cuanto a bienestar animal se refiere, fijando de forma precisa los criterios de punto final y cumpliendo de esta forma la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación (338;341).

En nuestros experimentos decidimos emplear el score de Lloyd y Walfenson (338) que analiza cinco características: aspecto externo, estado de hidratación, respiración y los comportamientos espontáneo y provocado. Evalúa de forma específica estas características, otorgándoles un valor numérico en función del ítem que cumpla el animal y que detallamos a continuación:

a. Aspecto externo mediante inspección visual:

- a) Normal (0).
- b) Pérdida de “grooming” (autolavado del animal) (1).
- c) Secreciones nasales, oculares, óticas (2).
- d) Piloerección o pelo encorvado (3).
- e) Ojos medios de cerrados (4).

b. Estado de hidratación:

- a) Normal (0).
- b) Signo del pliegue positivo (5). Al coger de la piel no regresa de manera espontánea a su posición natural quedando una arruga.

c. Signos clínicos respiratorios:

- a) Frecuencia respiratoria (FR) normal (0).
- b) Aumento leve en FR (1).
- c) Taquipnea con respiración abdominal (2).
- d) Bradipnea con respiración abdominal (3).
- e) Importante respiración abdominal y cianosis (4).

d. Comportamiento espontáneo:

- a) Normal (0).
- b) Cambios mínimos (1).
- c) Menor movilidad y aislamiento, pero alerta (2).
- d) Muy quieto, sin alerta de ningún tipo (3).

e. Comportamiento provocado:

- a) Normal (0).
- b) Respuesta algo exagerada o disminuida a la estimulación (1).
- c) Cambios moderados en comportamiento (2). Por ejemplo la no movilidad con la estimulación.
- d) Reacción muy violenta a la provocación, estado precomatoso, debilidad muy manifiesta (3).

Así pues la apariencia o aspecto externo puntúa 0 si es normal y en escala ascendente hasta 4 si tiene los ojos medio cerrados. El parámetro comportamiento espontáneo con 0 si es normal y en escala ascendente hasta 3 (no alerta). El parámetro deshidratación puntúa 5. El parámetro respiratorio puntúa 0 si tiene un patrón y frecuencia respiratoria normal y en escala ascendente hasta 4 (cianosis y respiración abdominal). El parámetro comportamiento provocado es 0 normal y en escala ascendente hasta 3 siendo 3 estado débil y precomatoso (338).

El total del Score va de una puntuación de 0 a 19. Con la suma de cada uno de los ítems obteníamos un score que se correspondía con una actitud a proceder. Aquellos ratones con una puntuación global entre 0-4 se consideraban con un estado de bienestar adecuado. En los que obtenían un puntuación de 5 a 9 se recomendó una vigilancia estrecha considerando según el caso la administración de analgesia. Si el ratón presentaba un puntuación de 10 a 14 se aceptaba que el ratón se encontraba en situación de sufrimiento y había que considerar el sacrificarlo. Un score entre 15 y 19 se asociaba a un dolor intenso y en ese caso había que sacrificar de inmediato al animal. El algoritmo de actuación se resume en la tabla 10.

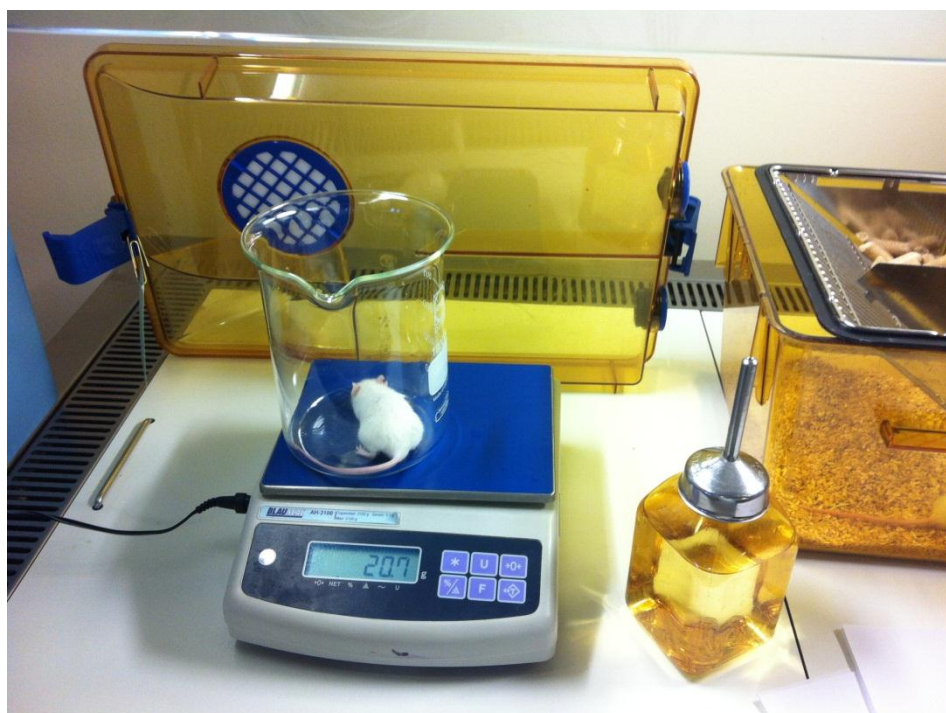
Tabla 10. Medidas de actuación fijadas en función del score clínico obtenido en cada animal

Score	Estado del animal	Actitud a tomar
0-4	Normal	Ninguna
5-9	Afectación leve	Vigilar estrechamente. Valorar analgesia
10-14	Sufrimiento moderado	Considerar sacrificio
15-19	Dolor severo	Sacrificio inmediato

7.6.2.- PESO.

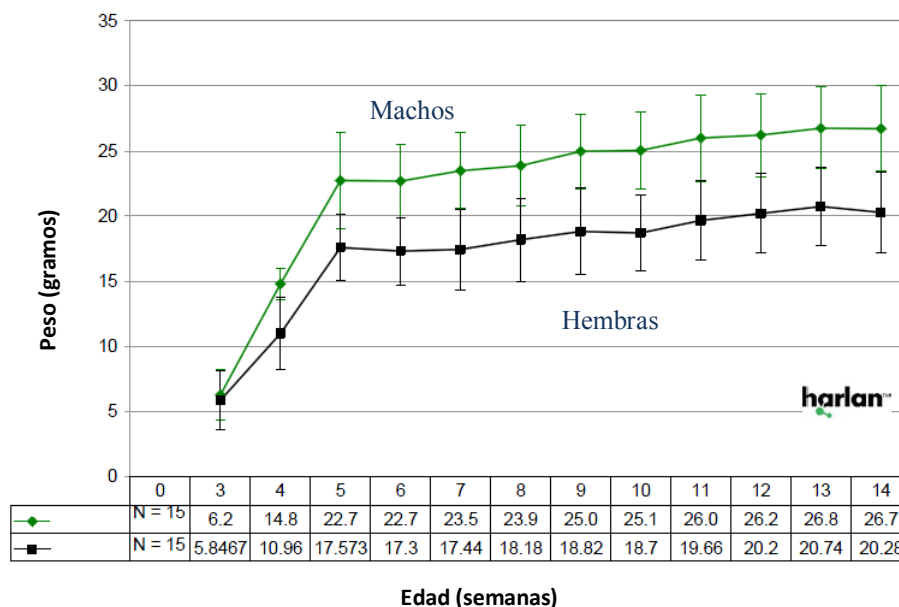
También se monitorizó la ganancia de peso (fotografía 28) 1-2 veces por semana en balanza de precisión BlauScal AH-3100 (BlauScal®, Barcelona) en campana de flujo laminar. La pérdida de peso es uno de los signos más importantes pues refleja un cambio en el consumo de agua y comida implicando un deterioro manifiesto del estado general del animal. La disminución de peso corporal, se considera como asumible si el descenso es del 5-10% , moderada del 10-20% y severa > al 20%, considerando este descenso como criterio de punto final para realizar eutanasia.

Fotografía 28. Pesaje de ratón NOD/SCID con balanza de precisión



La evolución normal del peso en los ratones NOD/SCID en estudio realizado por los laboratorios Harlan® es mostrada en el gráfico 6 (335).

Gráfico 6. Evolución media de peso en cepa NOD/SCID. Modificado de Harlan laboratories (335).



7.6.3.- HEMOGRAMA Y BIOQUÍMICA.

Los análisis bioquímicos/hematológicos se realizaron en todos los animales sacrificados para evaluar tanto toxicidad aguda como crónica. Valoramos cualquier alteración en los parámetros fisiológicos del modelo murino NOD/SCID.

Realizamos hemograma con determinación de hemoglobina (Hb), plaquetas y leucocitos con fórmula leucocitaria. Para ello de los 100 µL recolectados en Microvette CB 300 con EDTA (Sarstedt®, Nümbrecht Alemania) destinados al hemograma y análisis por qRT-PCR, se cogieron 20 µL de sangre y se traspasaban a un vial eppendorf de 1,5 mL, añadiéndole 180 uL de SSF (dilución 1:10) para alcanzar un volumen de 200 µL, que es el mínimo que podía tomar el sistema analizador *Cell Dyn Sapphire* (Abbott®, Illinois) con el que se realizó la hematimetría. Los valores de normalidad en el hemograma de los ratones NOD/SCID de 8 a 16 semanas se pueden observar en la tabla 11 (336).

Tabla 11. Parámetros hemáticos de normalidad en ratones NOD/SCID entre la 8ª y la 16ª semana de vida (336).

Hemoglobina	145-154 g/L
Plaquetas	1037-1300 x 10 ⁹ /L
Leucocitos	0.41-0.78 x 10 ⁹ /L
Neutrófilos	0.2-0.4 x 10 ⁹ /L
Linfocitos	0.14-0.25 x 10 ⁹ /L
Monocitos	0.01-0.03 x 10 ⁹ /L
Eosinófilos	0.05-0.12 x 10 ⁹ /L
Basófilos	0-0 x 10 ⁹ /L

Los dos tubos Microvette CB 300 secos (Sarstedt®, Nümbrecht Alemania) con 100 µL de sangre total cada uno, se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 21°C para la obtención del suero y se almacenaron en cámara de -80° hasta su análisis bioquímico en días posteriores. Se determinaron las concentraciones en suero de glucosa, urea, creatinina, GOT, GPT, calcio y fósforo con el autoanalizador Cobas® 8000 (Roche Diagnostics®, Basilea, Suiza) Los valores bioquímicos en suero de normalidad de los ratones NOD/SCID de 8 a 16 semanas se pueden observar en la tabla 12 (336).

Tabla 12. Parámetros bioquímicos de normalidad en suero de ratones NOD/SCID entre la 8ª y la 16ª semana de vida (336).

Glucosa	175-335 mg/dL
Urea	34-57 mg/dL
Creatinina	< 0.5 mg/dL
GOT	55-251 UI/L
GPT	41-64 UI/L
Calcio	9.9-10.7 mg/dL
Fósforo	8.6-11.2 mg/dL

UI: Unidades internacionales

7.6.4.- HISTOLOGÍA DE ÓRGANOS: TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA.

Se realizó procesamiento de los órganos para tinción de hematoxilina-eosina estándar. Las muestras fueron incluidas en parafina por el método habitual y seccionadas con microtomo, obteniendo bloques de entre 5 y 7 μm de grosor. Tres secciones de cada fragmento de órgano incluido en parafina fueron desparafinadas, rehidratadas e inmersas en hematoxilina (Sigma Aldrich®, Madrid, Spain) durante 3 minutos y en eosina (Sigma Aldrich®, Madrid, Spain) durante 5 minutos, deshidratadas y montadas. Las preparaciones fueron evaluadas al microscopio Zeiss Axio A10® (Carl Zeiss®, Alemania).

7.7.- EVALUACIÓN DE TOXICIDAD CRÓNICA.

La toxicidad crónica fue evaluada mediante los mismos estudios que en fase aguda sacrificando 2 roedores que habían recibido CSM fucosiladas (1 macho y 1 hembra) en la 1ª, 2ª, 5ª, 7ª, 9ª y 12ª postinfusión (ilustraciones 23, 24, 25 y 26). También se realizaron análisis hematológicos y bioquímicos de sangre intracardiaca junto a evaluación mediante histología en los órganos de los ratones sacrificados en ese período. Debido a la inmunodepresión severa que presenta el modelo murino NOD/SCID vigilamos de forma estrecha la aparición de signos infecciosos y el desarrollo de tumores tanto de forma visual como posteriormente con análisis histopatológico.

7.8.- EVALUACIÓN DE EFICACIA. INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ANTI-OSTEOCALCINA HUMANA.

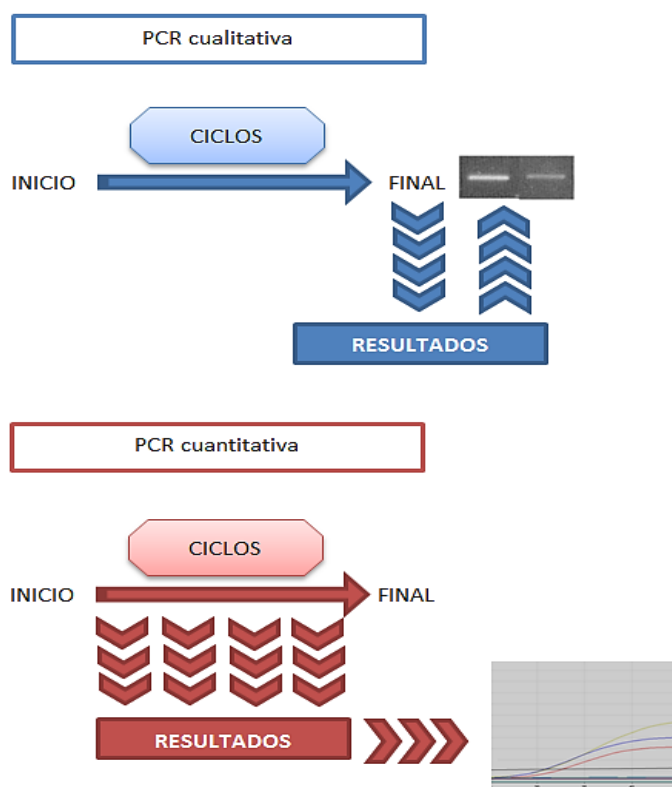
Se realizó mediante estudio inmunohistoquímico, analizando la expresión de osteocalcina humana de calota y tibia de los ratones NOD/SCID. Los cortes óseos de tibia y calota fueron fijados durante 48 horas en formalina al 4% y posteriormente descalcificados durante 7 días en ácido hipoclorhídrico al 10% y formaldehído al 4% (Osteomol®, Laboratorios Merck, Darmstadt, Alemania). 4 secciones del micrómetro de cada muestra fueron obtenidas para realizar la tinción inmunohistoquímica. Empleamos un anticuerpo policlonal isotipo IgG de conejo antiosteocalcina humana LS-C124317 (LsBio®, Seattle, USA). Este anticuerpo reconoce específicamente un epítipo de la región C-terminal de la osteocalcina, conseguido tras sensibilización frente a un péptido sintético originado a partir de la secuencia de la osteocalcina humana y no presenta reactividad cruzada con otras especies. Se empleó kit de tinción automático Dako EnVision Flex® (Dako®, Carpintería, USA) utilizando el anticuerpo a una dilución de 1:2500. Las secciones fueron reveladas con 2,2,5 diaminobencidina, que producía un precipitado marrón oscuro. Las células positivas para osteocalcina fueron identificadas por un precipitado marrón oscuro, evaluando además la morfología celular cuboide compatibles con osteoblastos humanos en fase de activación. En cada muestra de tibia y calota se realizaron análisis tanto cualitativo (presencia de células positivas para osteocalcina o no) como cuantitativo mediante el recuento absoluto de células positivas para osteocalcina humana en 10 campos a gran aumento (400 $\times$) usando un microscopio estándar Zeiss Axio A10® (Carl Zeiss®, Alemania) y así poder realizar comparaciones entre los tres grupos. El examen histopatológico será realizado por el mismo observador para disminuir la variabilidad interobservador.

7.9.- ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA POR RETROTRANSCRIPCIÓN (qRT-PCR).

Para evaluar la biodistribución de las células mesenquimales infundidas empleamos la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (qRT-PCR) con el fin de identificar de forma precisa la expresión de genes humanos en los órganos y tejidos de los ratones NOD/SCID. Diversos estudios han demostrado la utilidad de la qRT-PCR en la cuantificación e identificación de la expresión génica (342;343).

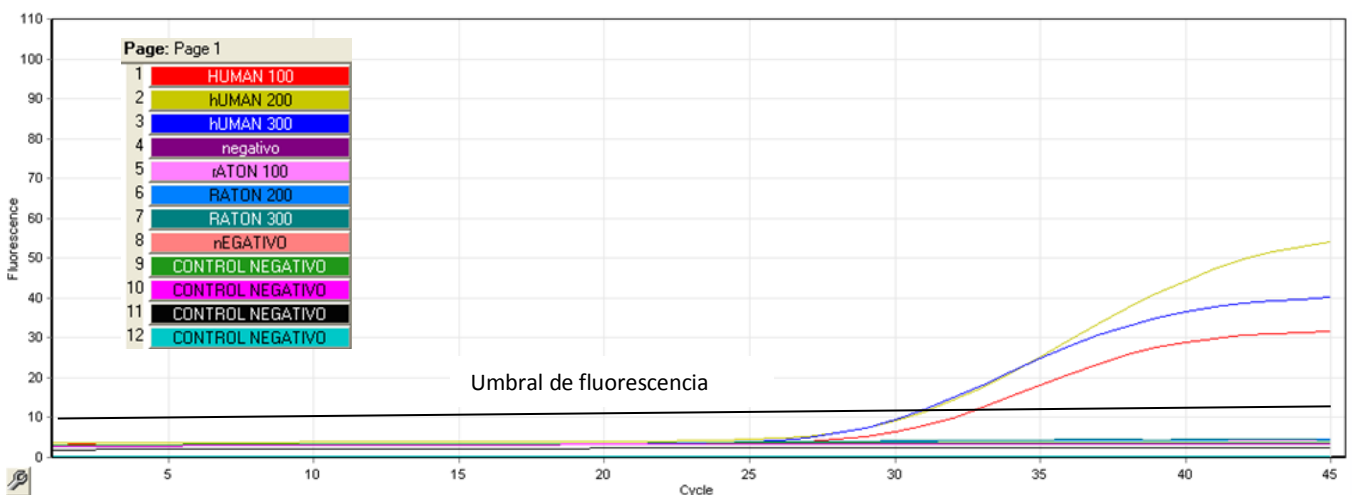
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de secuencias específicas de ADN in vitro, utilizando la actividad de la enzima Taq polimerasa partiendo de una cadena molde y un pequeño oligonucleótido inicial (cebador) en presencia de nucleótidos en exceso y magnesio. La PCR cualitativa permite sólo conocer la expresión de dicha secuencia genética a tiempo final tras un determinado número de ciclos mientras que la PCR cuantitativa a tiempo real nos aporta además la cantidad de expresión génica en un determinado órgano o tejido (Ilustración 33). La fluorescencia emitida ciclo a ciclo (de ahí el nombre a tiempo real) permite establecer una relación con el número inicial de copias (única, doble o triple), siguiendo una curva patrón establecida con ADNc de concentraciones conocidas (344).

Ilustración 33. Esquema de PCR cualitativa y cuantitativa



El fundamento de la qRT-PCR se basa en una adecuada obtención y posterior detección de este ADNc generado por la retrotranscriptasa. Para ello tenemos que disponer de un instrumento para monitorizar la amplificación en tiempo real y de un software que nos permita realizar un correcto procesamiento cuantitativo de los datos. Tras la extracción de ARN de los órganos y tejidos problemas, se obtiene el ADN complementario (ADNc) por medio de una retrotranscriptasa (polimerasa de ADN dependiente de ARN), cebadores, oligonucleótidos y pueden incluir inhibidores de RNAsas (protección de la degradación del ARN por estas enzimas). Tras la obtención del ADNc se añaden las sondas elegida, hibridando ésta con la secuencia específica en caso de encontrarse tras desnaturalizar el ADNc. También se añade la enzima Taq polimerasa que realizará la amplificación. La detección del ADN diana se consigue mediante fluorescencia gracias a la presencia en nuestras sondas seleccionadas de fluoróforos que emiten dicha fluorescencia al hibridar con un secuencia específica de ADN. Esta intensidad de fluorescencia, medida en tiempo real, se relaciona con la cantidad de ADN producido durante la PCR (345;346). Para poder realizar una medición correcta, hay que fijar la intensidad basal o de fondo de fluorescencia emitida que no se corresponde con la amplificación del producto y que debe de ser fijada por el investigador. El número de ciclos a partir del cual el sistema detecta una intensidad de fluorescencia superior al umbral fijado debido a la acumulación del ADNc amplificado se conoce como *crossing threshold (CT)* y por tanto será indicativo directo de la expresión del ARNm en ese tejido u órgano. Cuanto mayor sea la cantidad de ADNc, menos ciclos de amplificación serán necesarios para superar el umbral de fluorescencia basal establecido (menor CT). De esta forma, la qRT-PCR también nos permite obtener la medición cuantitativa de los transcritos amplificados, es decir, no sólo saber si se expresa sino cuanto se expresa, establecer una relación con el número inicial de copias siguiendo una curva patrón establecida con ADNs de concentraciones conocidas y compararlo con otros ARNm problemas o controles (gráfico 7)(345;347).

Gráfico 7. qT-PCR por retrotranscripción de muestra humana detectando amplificación del ADNc correspondiente a la β 2-microglobulina humana



La qRT-PCR permite detectar un número de copias de ARN muy bajo y es debido a esta elevada sensibilidad junto a una alta especificidad y una eficiente detección de la señal con respecto a técnicas más clásicas como la PCR cualitativa la que la convierte en una técnica idónea para analizar la trazabilidad de las CSM infundidas (348). Algunas de las ventajas de la qRT-PCR además de la medición cuantitativa son también: la no necesidad del procesamiento post-PCR, y las pocas variaciones inter-observador ayudando este punto a generar resultados reproducibles y comparables entre los diversos centros (345). No obstante, para asegurar la reproducibilidad de la técnica se han propuesto recomendaciones en la literatura para una correcta interpretación de los datos obtenidos (349). La qRT-PCR también permite la detección y la amplificación de varias secuencias al mismo tiempo (Multiplex) utilizando varias sondas al mismo tiempo lo que implica un ahorro económico y en tiempo del operador.

La qRT-PCR de nuestro estudio fue de dos pasos (paso a ADNc y posterior amplificación) con sondas dúplex (evaluamos dos sondas diferentes por mismo tubo) con el objetivo de un mayor ahorro económico. En nuestro estudio los criomoldes con los órganos congelados, se calentaban de forma muy gradual colocándolos sobre hielo, hasta coger el órgano para posteriormente ser triturados de forma individual con el aparato TissueLyser LT (Qiagen®, Hilden, Alemania) y la extracción de ARN de los órganos y sangre periférica con los kits de extracción de RNA RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemania) y RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemania). Tras obtener el ARN empleamos el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (Qiagen®, Hilden, Alemania), que incorporaba la retrotranscriptasa, los oligonucleótidos, los *random primers* (cebadores al azar) e inhibidores de las enzimas RNAsas para obtener el ADN complementario (ADNc).

Los genes constitutivos (*housekeeping*) para la trazabilidad de las Células Stem Mesenquimales humanas fueron la β 2-microglobulina y la β -actina debido a su especificidad de especie (diferencias en la molécula entre el ratón y el ser humano) con expresión fuera estable y utilizados por otros autores (350-353). De tal forma que seleccionamos sondas heterodúplex que permitían realizar estudio de β 2-microglobulina y β -actina humanas en el mismo y β 2-microglobulina y β -actina murinas en el mismo tubo. Para el control positivo de expresión de β 2-microglobulina y β -actina humanas se utilizaron muestras de ADNc del Biobanco. Como controles negativos empleamos suero salino fisiológico sin ADNc. Todas las qRT-PCR se realizaron por triplicado. Las sondas empleadas fueron β 2-microglobulina murina [Mm_B2m_1_FAM QuantiFast], β 2-microglobulina humana [Hs_B2M_2_FAM QuantiFast], β -actina murina [Mm_ACTB_2_FAM QuantiFast] β -actina humana [Hs_ACTB_2_FAM QuantiFast] (Qiagen®, Hilden, Alemania). Para la amplificación se utilizó el kit QuantiFast-Multiplex-PCR-Kits y el aparato usado fue el RotorGene (Qiagen®, Hilden, Alemania). En el estudio se va a analizar de forma descriptiva la biodistribución en corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, gónadas, sistema nervioso central y sangre periférica.

8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó con el programa informático MedCalc versión 12.4.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Se realizó análisis descriptivo. También se realizó análisis de diferencias entre los tres brazos en los siguientes parámetros: resultados bioquímicos, hematológicos y ganancia de peso. Además se realizó análisis estadístico para valorar la eficacia de la osteoblastogénesis humana en hueso murino entre los brazos. Los test empleados fueron no paramétricos debido a que los valores obtenidos no seguían la distribución normal, lo que puede entenderse por el tamaño muestral estudiado. Empleamos la U de Mann Whitney, test de Kruskal-Wallis, test de Wilcoxon y test de la χ^2 . En aquellos casos con valores que seguían una distribución normal por el test de D'Agostino-Pearson se emplearon test paramétricos (test t de Student para datos independientes, para datos apareados...) El nivel de significación se estableció para valores de $p < 0.05$. Para algunos gráficos fue empleado Microsoft Excel® (Microsoft®,USA).

RESULTADOS

1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS DONANTES

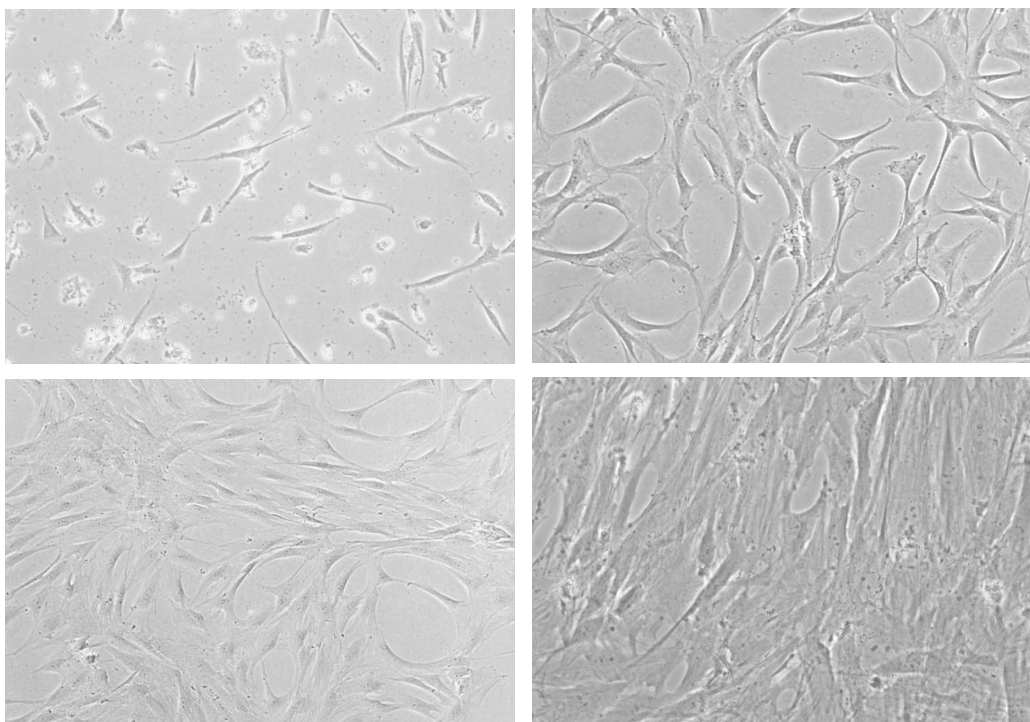
Las muestras fueron obtenidas de 4 donantes voluntarios tras la correspondiente firma del consentimiento informado: 3 mujeres (58,64 y 66 años) y 1 hombre (30 años). Los donantes incluidos fueron intervenidos de patologías no neoplásicas (rotura de menisco, rotura de ligamentos, prótesis de rodilla y osteonecrosis de mandíbula).

2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS STEM MESENQUIMALES de MÉDULA ÓSEA HUMANA.

2.1.- ANÁLISIS MORFOLÓGICO. VIABILIDAD PRE Y POST-FUCOSILACIÓN.

Las Células Stem Mesenquimales de médula ósea humanas mostraron la morfología típica en huso con núcleo central alargado con 2-3 nucléolos. Esta morfología fue constante en el 100% de las muestras pre y post-fucosilación, observándose en todos los casos células con un característico aspecto fibroblástico con largas prolongaciones (fotografías 29, 30, 31 y 32) La viabilidad evaluada con Trypan blue fue mayor del 75% en todas las muestras.

Fotografías 29,30, 31 y 32. Cultivos de Células Stem Mesenquimales (CSM) con microscopio invertido de contraste de fases. Cultivos primarios de CSM (Imagen superior izquierda). Pase 1 (Imagen superior derecha). Pase 2 (Imagen inferior izquierda). Pase 3 (Imagen inferior derecha).



2.2.- CITOMETRÍA DE FLUJO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES (CSM).

2.2.1.- PRE-FUCOSILACIÓN.

Los análisis por citometría realizados sobre 3×10^5 células de las 4 muestras tomadas en el momento prefucosilación mostraron un correcto perfil inmunofenotípico de Células Stem Mesenquimales humanas con una elevada expresión de CD105, CD73 y CD90 con una mediana de 95.8% [83.5-98.2], una viabilidad media de 99.5% [99.5-99.6] y ausencia de expresión de CD45, CD34, D14 y CD20. Los resultados pueden verse en los gráficos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 así como en la tabla 13 que recoge los valores de las 4 muestras antes de la fucosilación.

Gráfico 8. Gráficos de puntos biparamétrico inicial FSC/SSC y representación de la población de Células Stem mesenquimales (Izquierda). Viabilidad de las células con Anexina-V (Derecha) (Muestra 18).

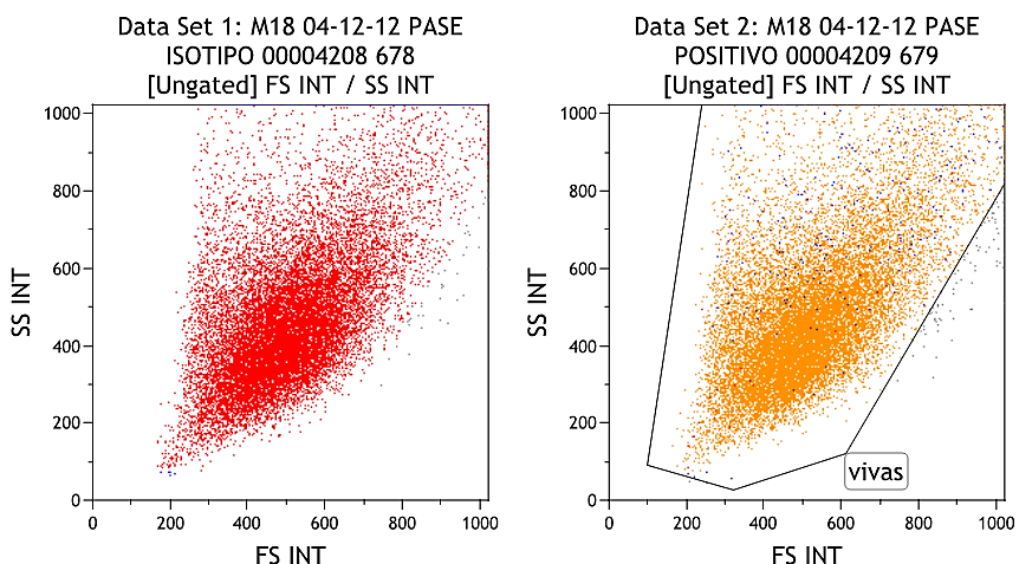


Gráfico 9. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la expresión de CD90 (Izquierda) y la de CD105 (Derecha) (Muestra 18).

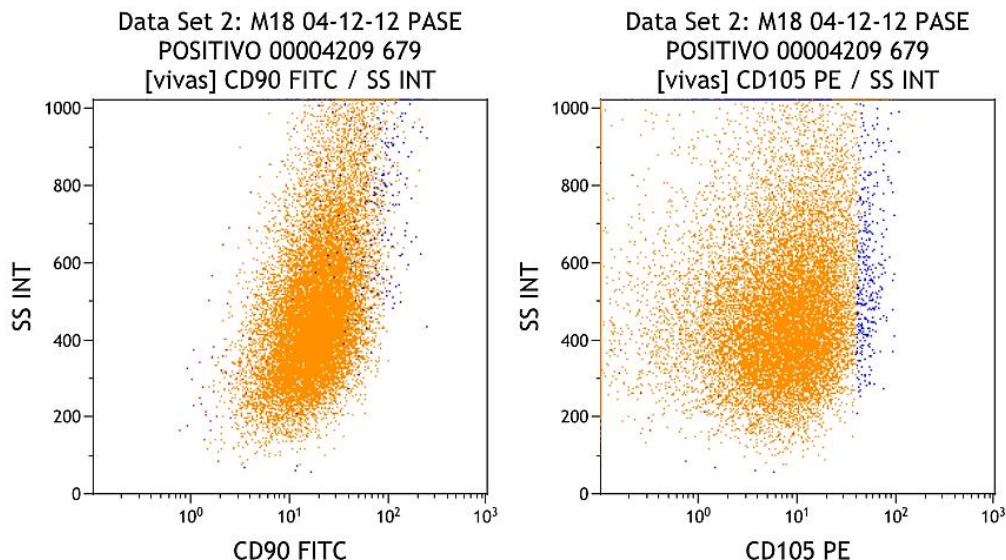


Gráfico 10. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la ausencia de expresión de CD14, CD20, CD34 Y CD45 (Izquierda), la de CD73 (Imagen superior derecha) y la expresión conjunta de CD90 y CD73 para determinar el porcentaje de Células Stem Mesenquimales (Muestra 18).

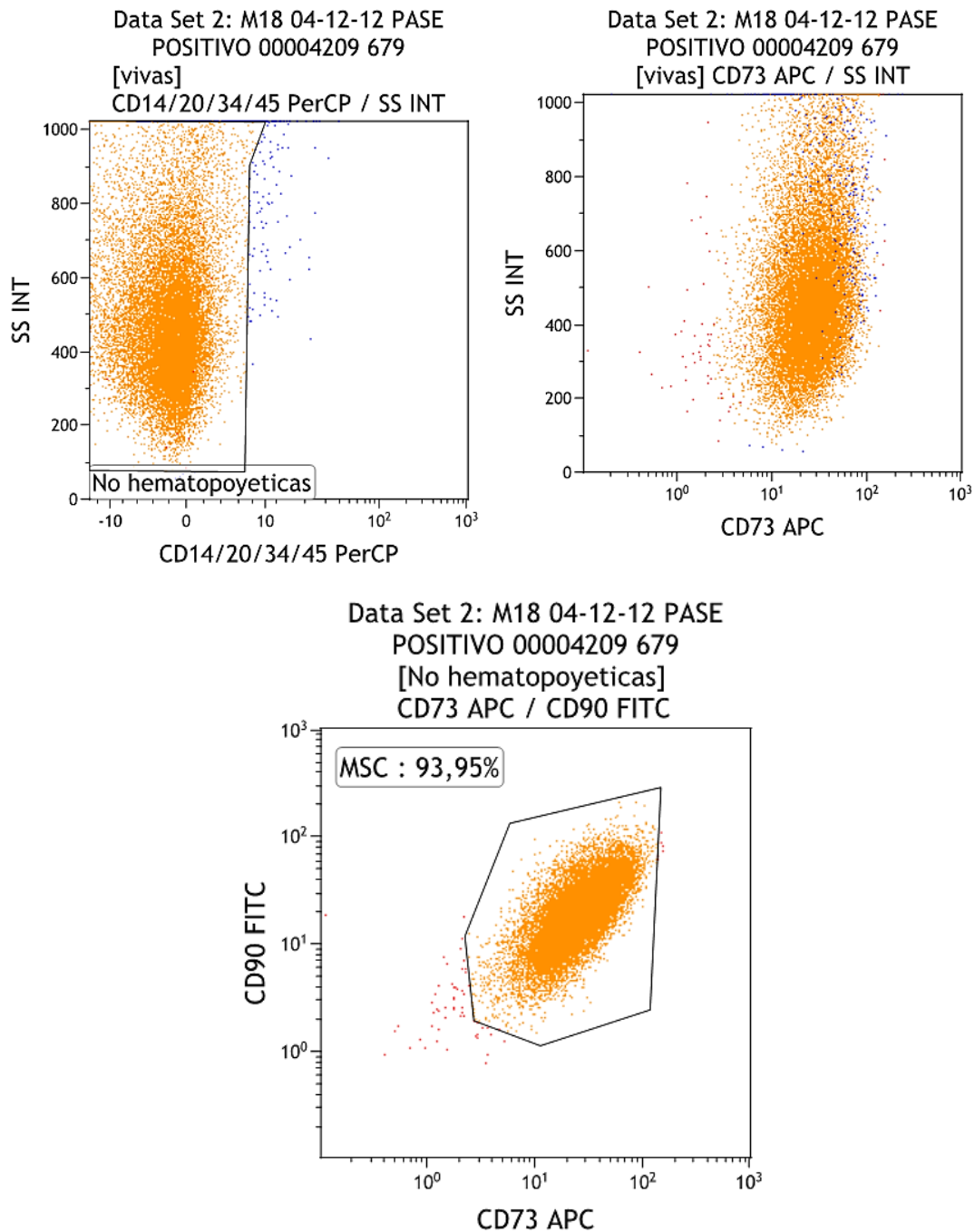


Gráfico 11. Gráficos de puntos biparamétrico inicial FSC/SSC y representación de la población de Células Stem mesenquimales (Izquierda). Viabilidad de las células con Anexina-V (Derecha) (Muestra 22 prefucosilada).

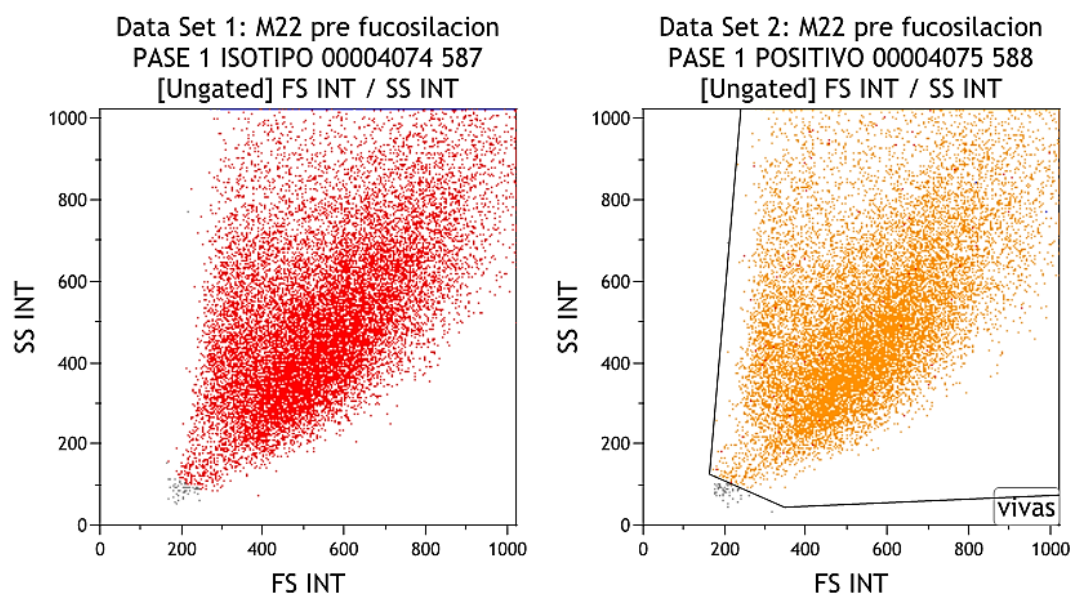


Gráfico 12. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la expresión de CD90 (Izquierda) y la de CD105 (Derecha) (Muestra 22 prefucosilada).

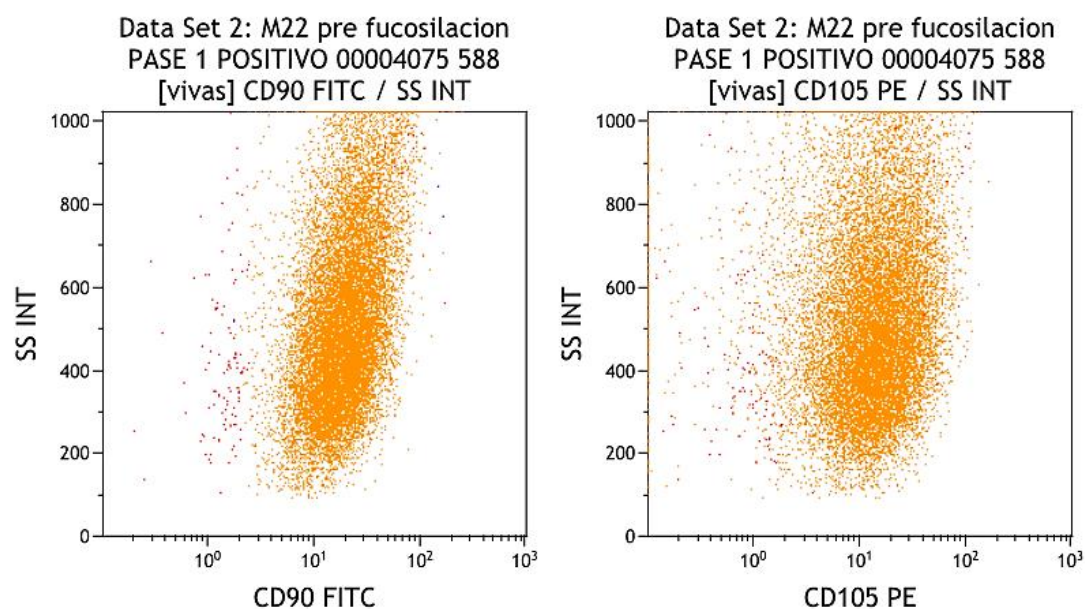


Gráfico 13. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la ausencia de expresión de CD14, CD20, CD34 Y CD45 (Izquierda), la de CD73 (Imagen superior derecha) y la expresión conjunta de CD90 y CD73 para determinar el porcentaje de Células Stem Mesenquimales (Muestra 22 prefucosilada).

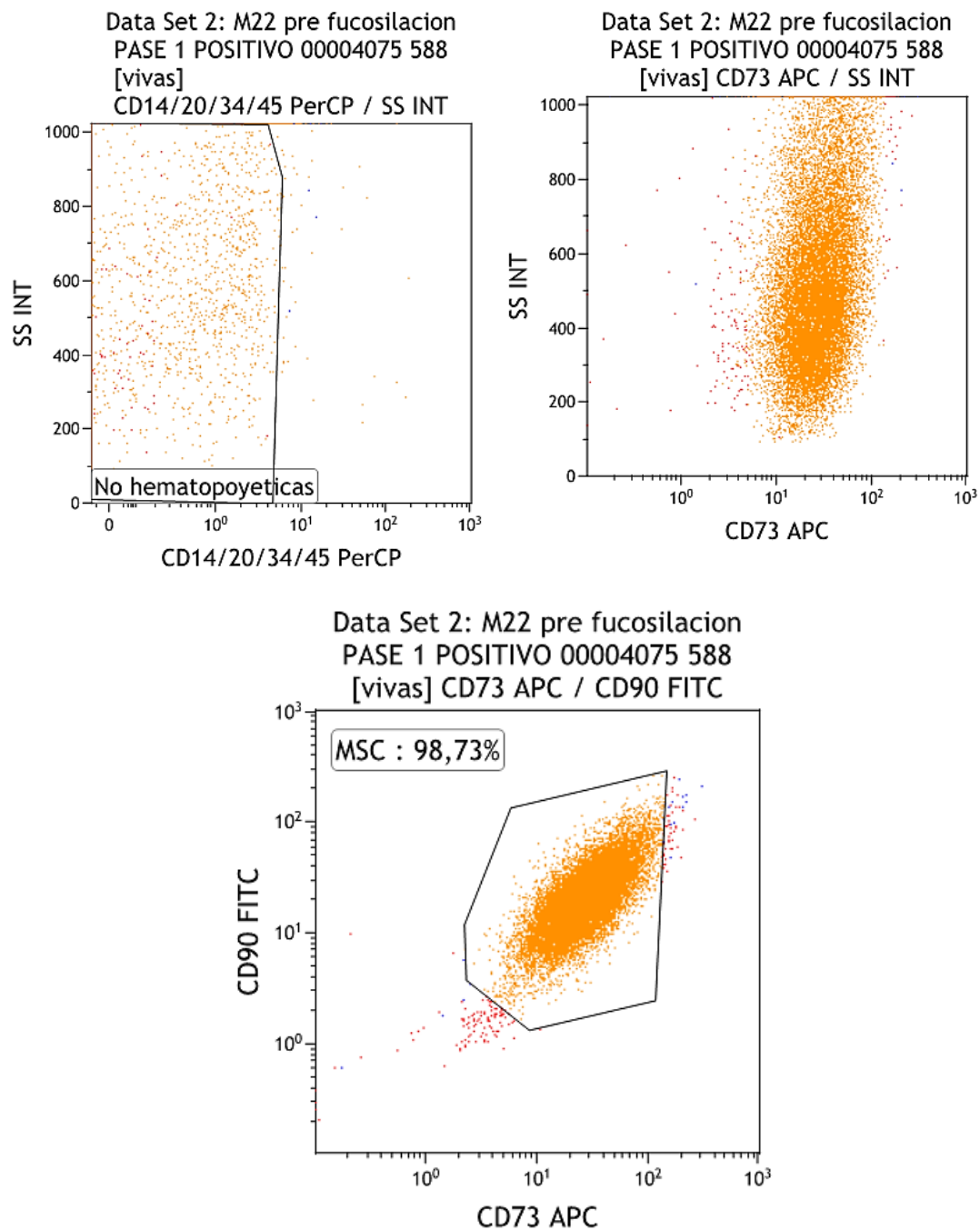


Gráfico 14. Gráficos de puntos biparamétrico inicial FSC/SSC y representación de la población de Células Stem mesenquimales (Izquierda). Viabilidad de las células con Anexina-V (Derecha) (Muestra 23).

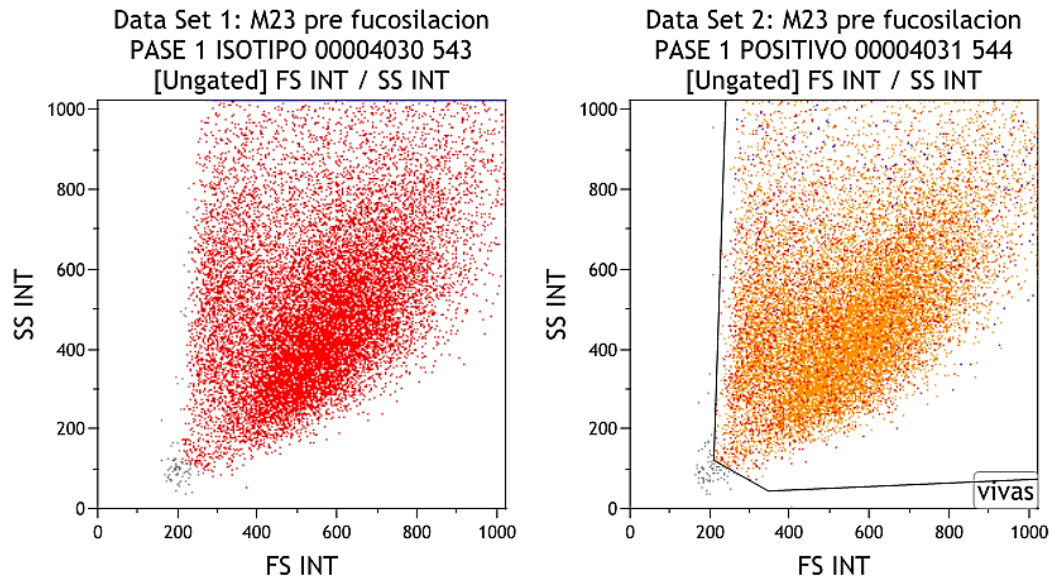


Gráfico 15. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la expresión de CD90 (Izquierda) y la de CD105 (Derecha) (Muestra 23).

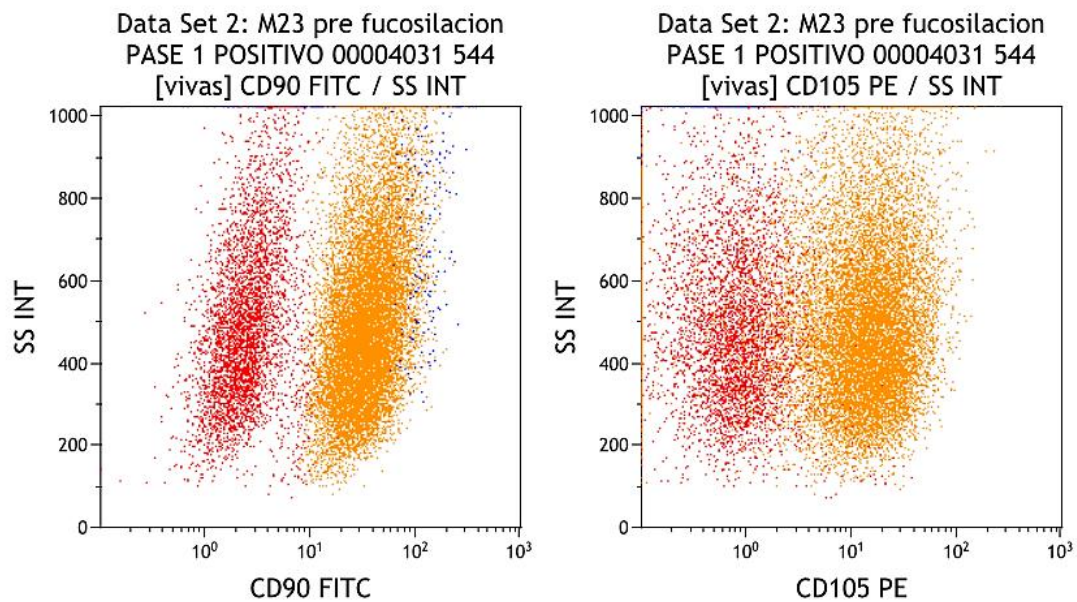


Gráfico 16. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la ausencia de expresión de CD14, CD20, CD34 Y CD45 (izquierda), la de CD73 (Imagen superior derecha) y la expresión conjunta de CD90 y CD73 para determinar el porcentaje de Células Stem Mesenquimales (Muestra 23).

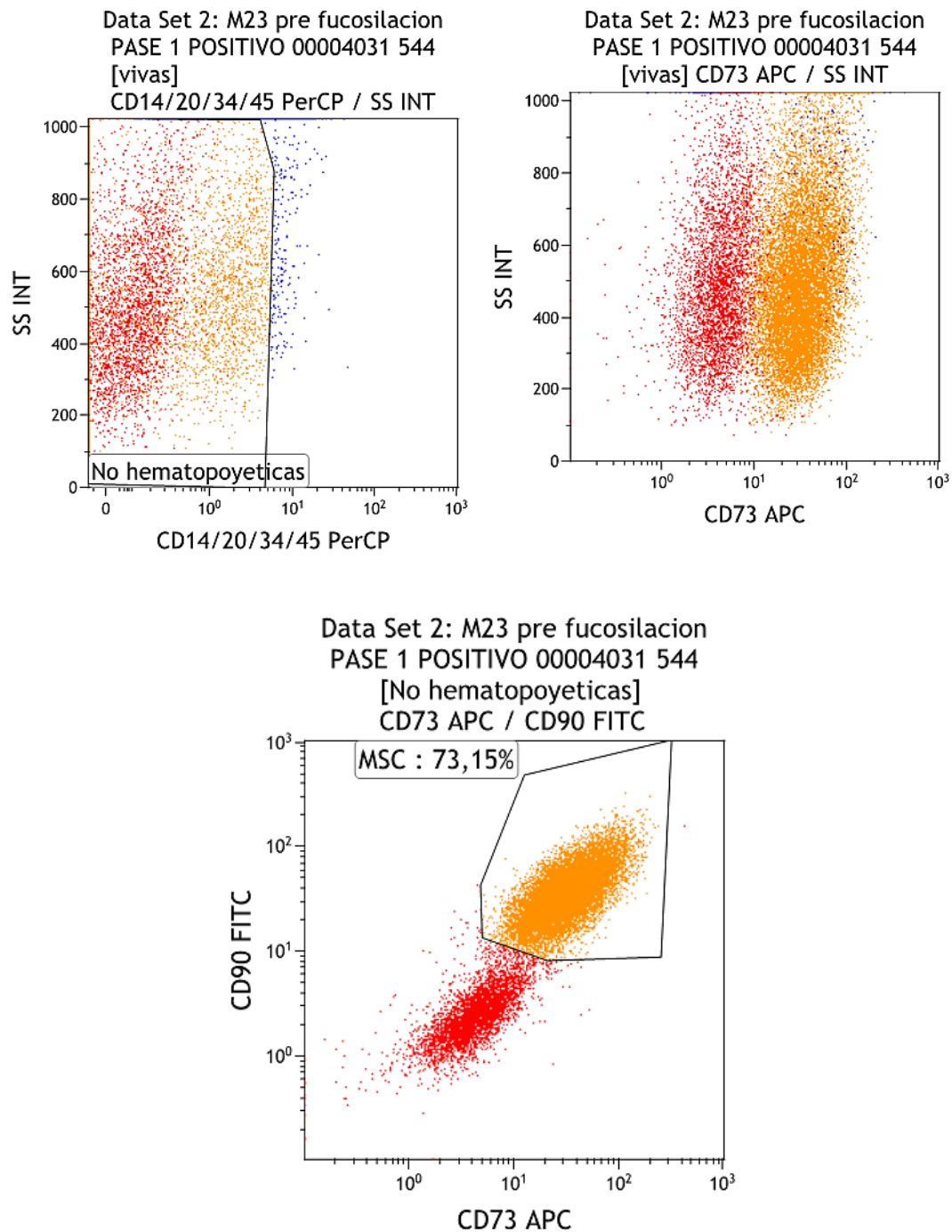


Gráfico 17. Gráficos de puntos biparamétrico inicial FSC/SSC y representación de la población de Células Stem mesenquimales (Izquierda). Viabilidad de las células con Anexina-V (Derecha) (Muestra 24 prefucosilada).

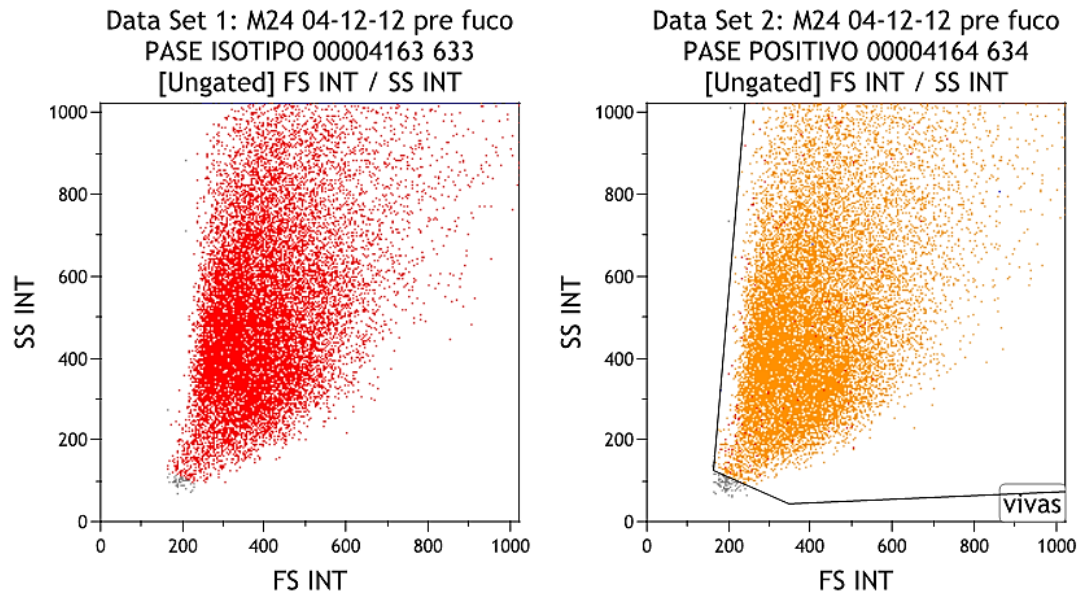


Gráfico 18. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la expresión de CD90 (Izquierda) y la de CD105 (Derecha) (Muestra 24 prefucosilada).

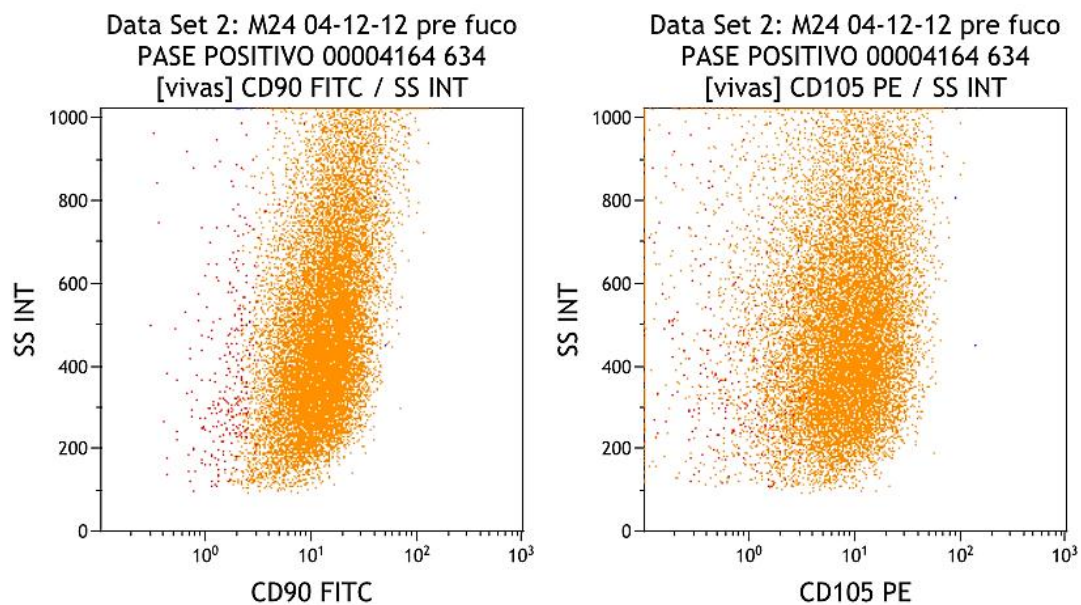


Gráfico 19. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la ausencia de expresión de CD14, CD20, CD34 Y CD45 (Izquierda), la de CD73 (Imagen superior derecha) y la expresión conjunta de CD90 y CD73 para determinar el porcentaje de Células Stem Mesenquimales (Muestra 24 prefucosilada).

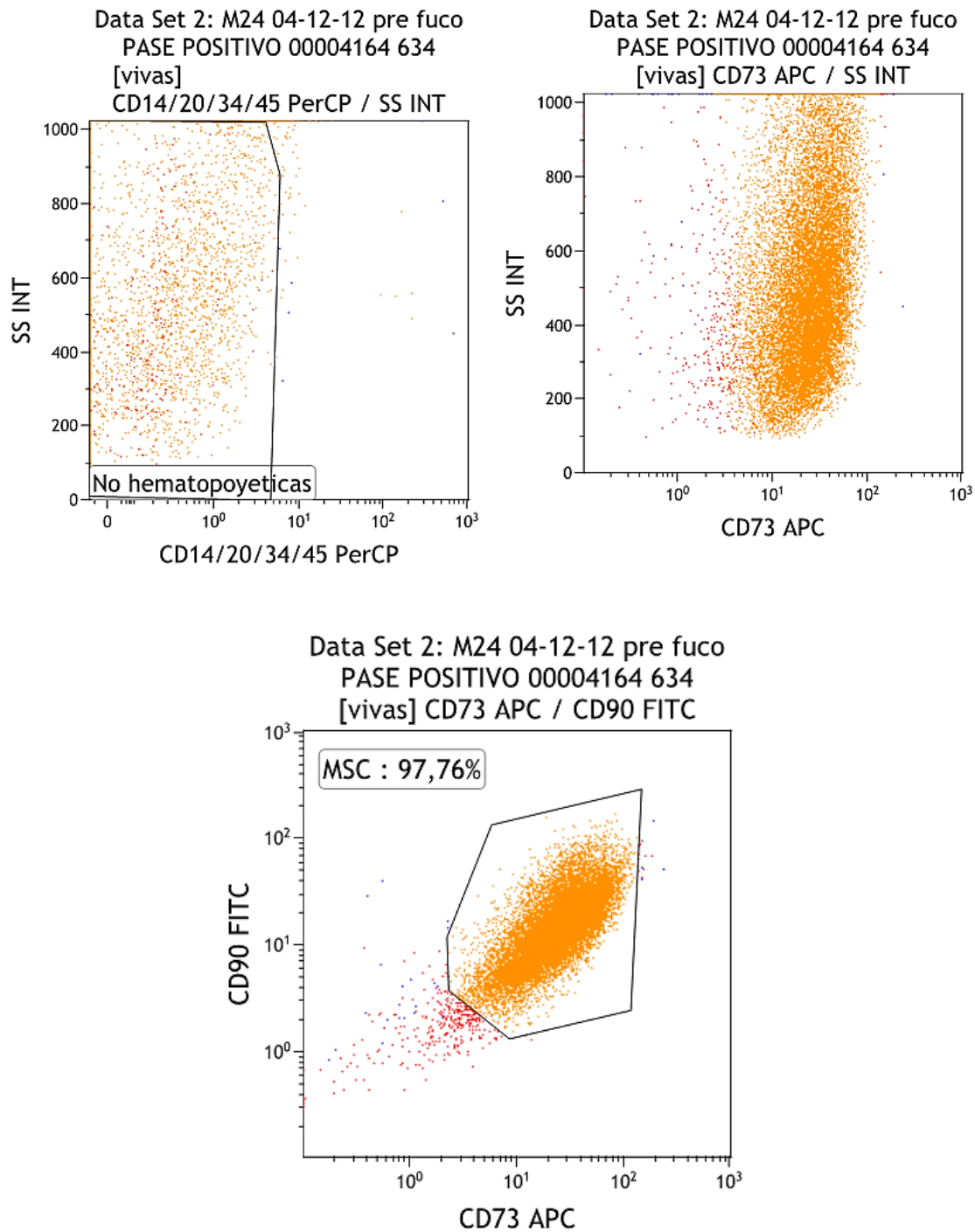


Tabla 13. Porcentaje de inmunofenotipo de Células Stem Mesenquimales (CSM) en muestras antes del período de fucosilación (n=4).

Número de muestra	% CSM	% viabilidad
M18	93.95	99.57
M22	98.73	99.71
M23	73.15	99.51
M24	97.76	99.51

CSM: Células Stem mesenquimales

2.2.2.- POST-FUCOSILACIÓN.

Los análisis por citometría realizados sobre 3×10^5 células de las 2 muestras tomadas tras el proceso de fucosilación. Como puede verse en los gráficos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 las CSM humanas de médula ósea fucosiladas mostraron el perfil inmunofenotípico aceptado por la ISCT para las Células Stem Mesenquimales humanas, es decir elevada expresión de CD105, CD73 y CD90 y ausencia de expresión de CD45, CD34, D14 y CD20- Las CSM que presentaron este perfil fueron el 97.2% [97-97.4] con una viabilidad del 99.4% [99.2-99.6], según se observa en la tabla 14.

Gráfico 20. Gráficos de puntos biparamétrico inicial FSC/SSC y representación de la población de Células Stem mesenquimales (Izquierda). Viabilidad de las células con Anexina-V (Derecha) (Muestra 22 postfucosilada).

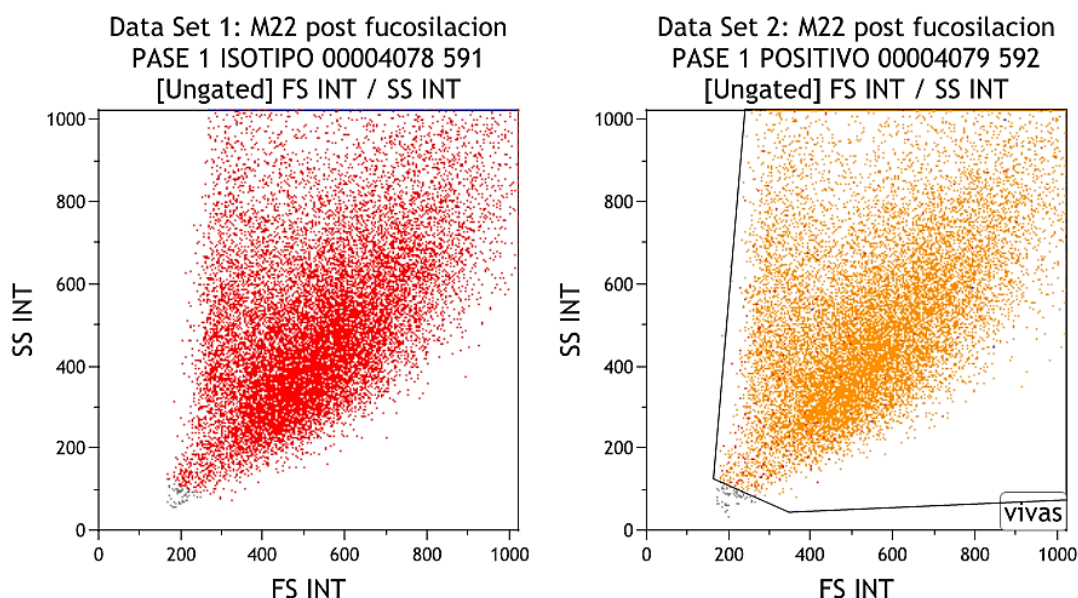


Gráfico 21. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la expresión de CD90 (Izquierda) y la de CD105 (Derecha) (Muestra 22 postfucosilada).

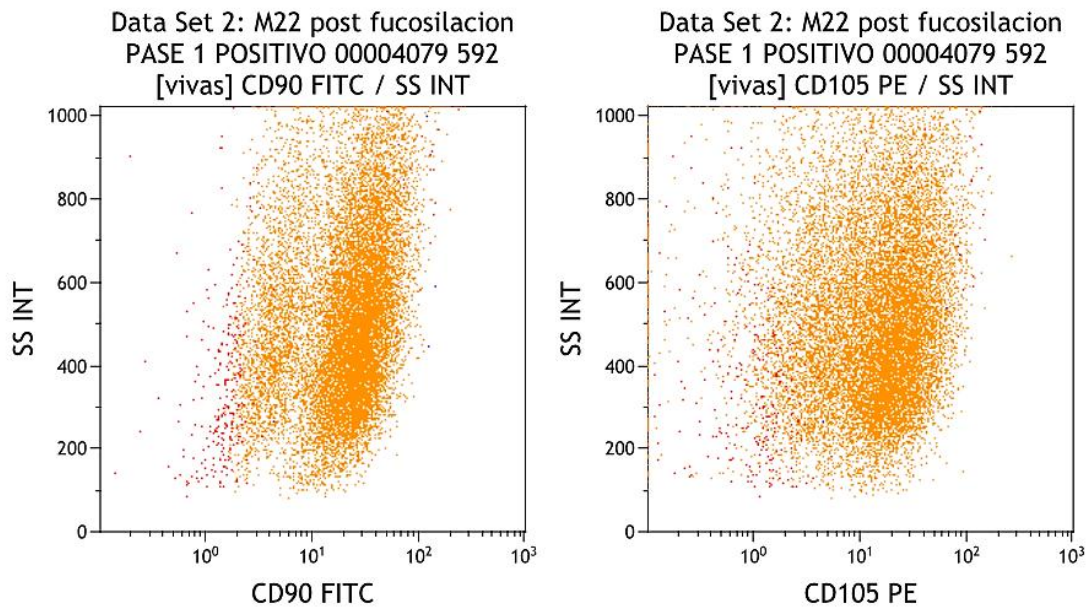


Gráfico 22. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la ausencia de expresión de CD14, CD20, CD34 Y CD45 (Izquierda), la de CD73 (Imagen superior derecha) (Muestra 22 postfucosilada).

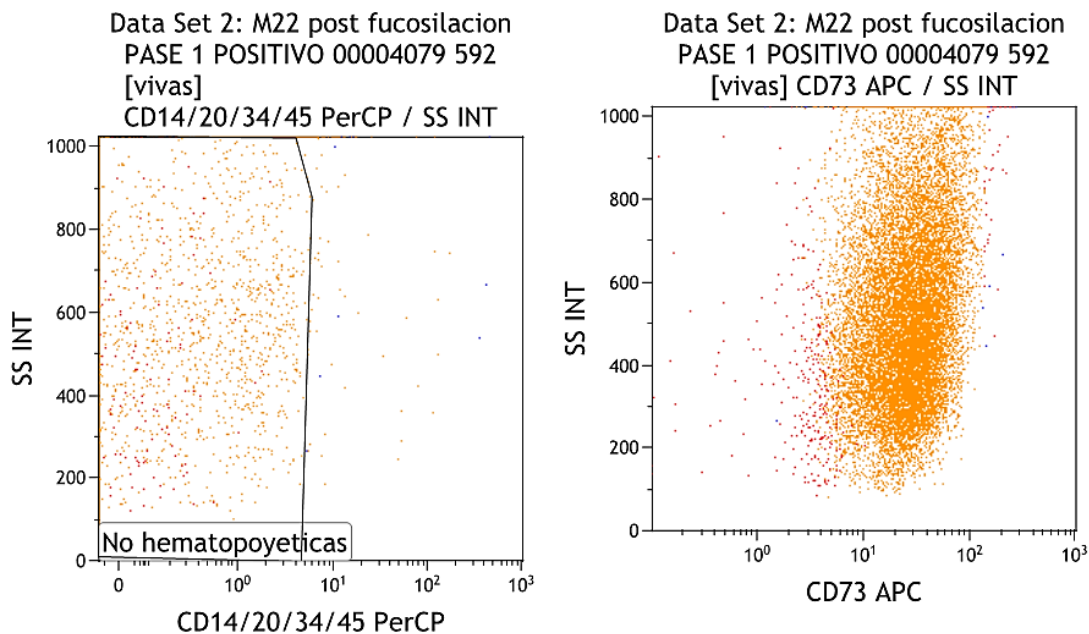


Gráfico 23. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra la expresión conjunta de CD90 y CD73 para determinar el porcentaje de Células Stem Mesenquimales (Muestra 22 postfucosilada).

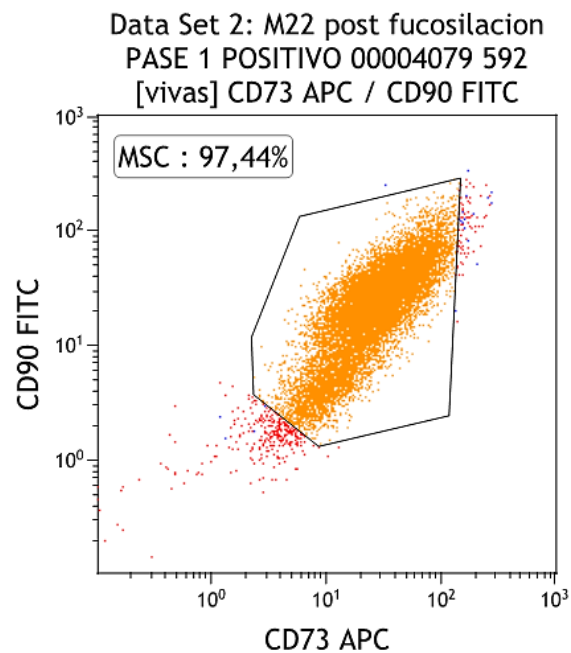


Gráfico 24. Gráficos de puntos biparamétrico inicial FSC/SSC y representación de la población de Células Stem mesenquimales (Izquierda). Viabilidad de las células con Anexina-V (Derecha) (Muestra 22 postfucosilada).

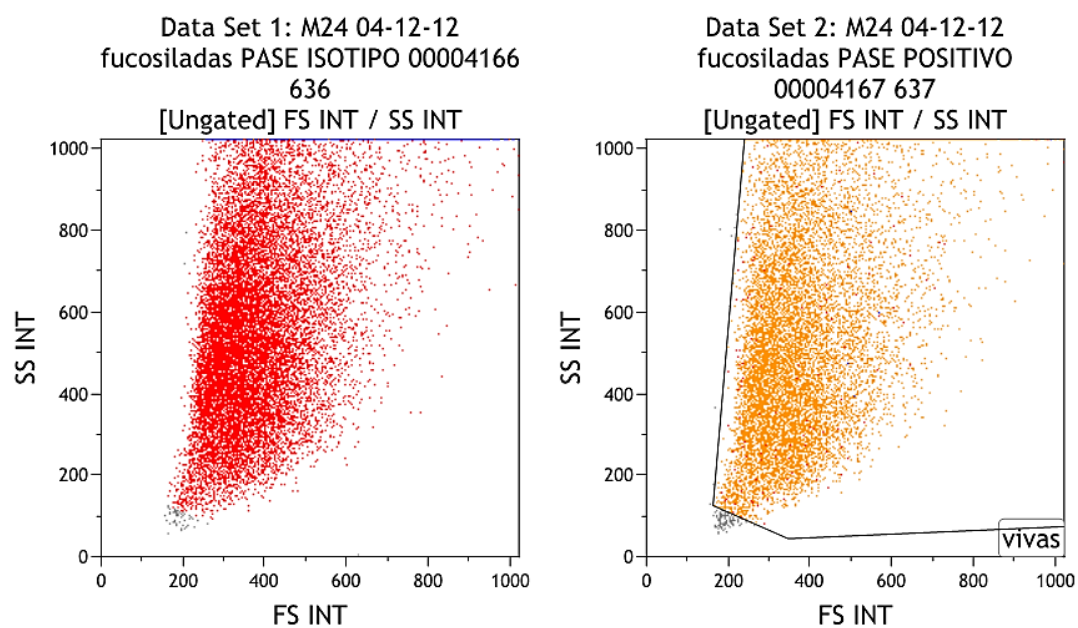


Gráfico 25. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la expresión de CD90 (Izquierda) y la de CD105 (Derecha) (Muestra 24 postfucosilada).

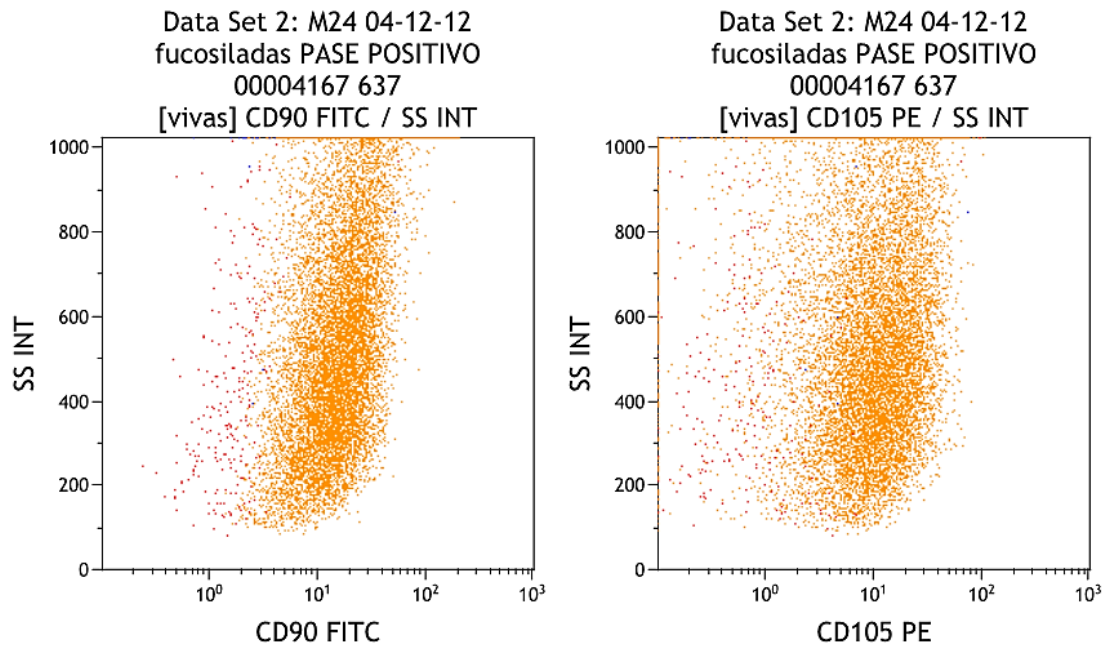


Gráfico 26. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la ausencia de expresión de CD14, CD20, CD34 Y CD45 (Izquierda), la de CD73 (Imagen superior derecha) (Muestra 24 postfucosilada).

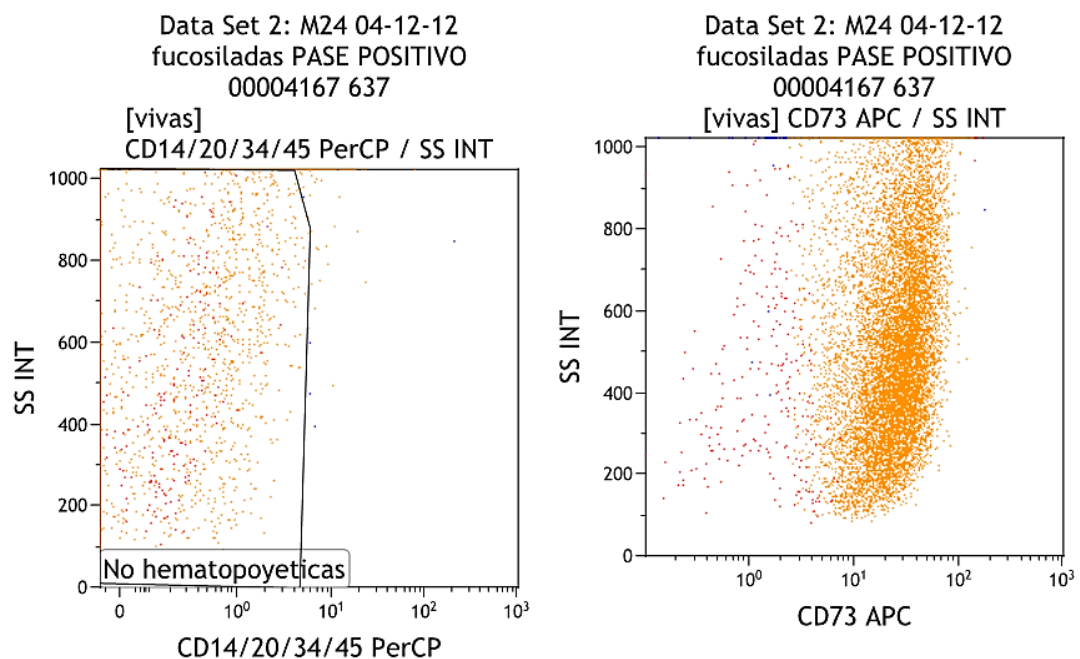


Gráfico 27. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra la expresión conjunta de CD90 y CD73 para determinar el porcentaje de Células Stem Mesenquimales (Muestra 24 postfucosilada).

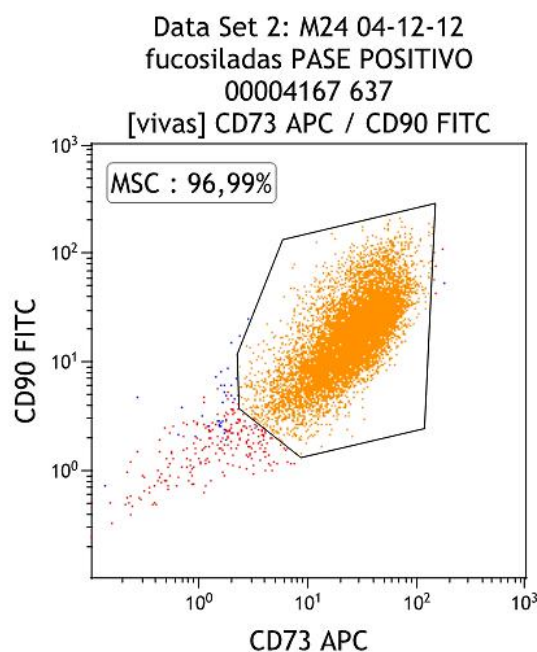


Tabla 14. Porcentaje de inmunofenotipo de Células Stem Mesenquimales (CSM) tras el proceso de fucosilación (n=4).

Número de muestra	% CSM	% viabilidad
M22	97.44	99.62
M24	96.99	99.19

CSM: Células Stem mesenquimales

En este punto incluimos el análisis de la expresión de HCELL utilizando un anticuerpo quimérico recombinante de E-selectina murina/Fc humano con el objetivo de comprobar la eficacia del proceso de fucosilación in vitro en las muestras con células fucosiladas (color rojo en los histogramas) y comparándolos con la muestra control con CSM sin fucosilar (color verde en gráficos). Si aparecía captación en el control con CSM sin fucosilar y en las fucosiladas debido a la superposición de colores se observará en color marrón. Las muestras 22 y 24 presentaron un patrón de fucosilación adecuado con aumento de expresión HCELL (HECA452) y de la quimera E-selectina murina/Fc humano. En las muestras 18 y 23 no observamos este patrón de fucosilación. Ambas muestras mostraron una correcta unión de E-selectina con calcio. Los histogramas con las intensidades de expresión se pueden observar en los gráficos 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36.

Gráfico 28. Gráficos de puntos biparamétrico con los controles: buffer control y buffer control de la fucosilación (Muestra 22 postfucosilada).

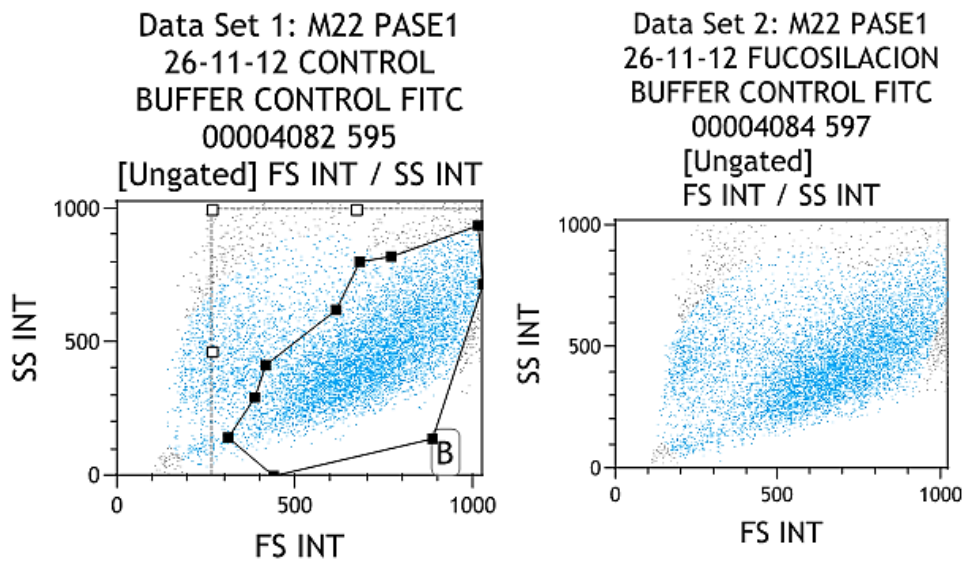
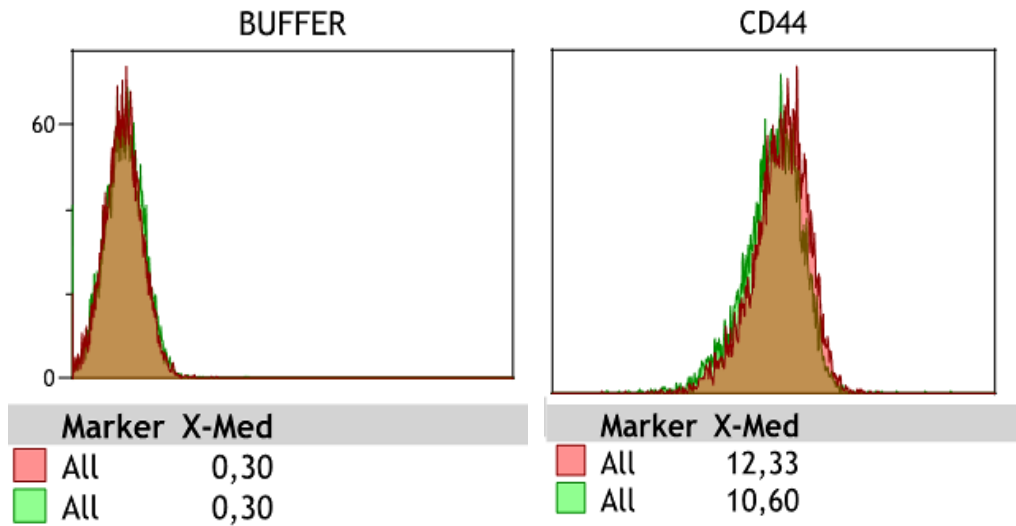


Gráfico 29. Histograma de expresión de marcadores. Ausencia de células en los buffer de ambas muestras (Imagen izquierda). Expresión de CD44 intensa en muestra control con CSM sin fucosilar (color verde) y de la muestra M22 con CSM fucosiladas (color rojo) (Imagen derecha). Superposición de ambas (color marrón).



MUESTRA FUCOSILADA
MUESTRA CONTROL

Gráfico 30. Histograma de expresión de marcadores. Expresión de HECA 452 (Izquierda), KM93 (Centro) y 80H5 (Derecha) en muestra control con CSM sin fucosilar (color verde) y de la muestra M22 con CSM fucosiladas (color rojo). Superposición de ambas (color marrón).

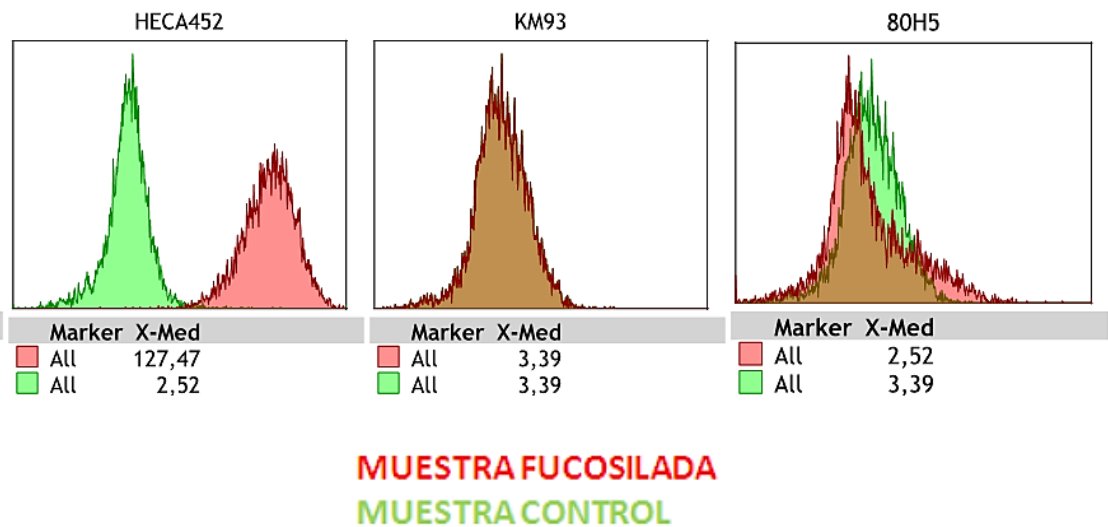


Gráfico 31. Histograma de expresión de marcadores. Expresión de quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (Izquierda y con calcio (Derecha) en muestra control con CSM sin fucosilar (color verde) y de la muestra M22 con CSM fucosiladas (color rojo). Superposición de ambas (color marrón).

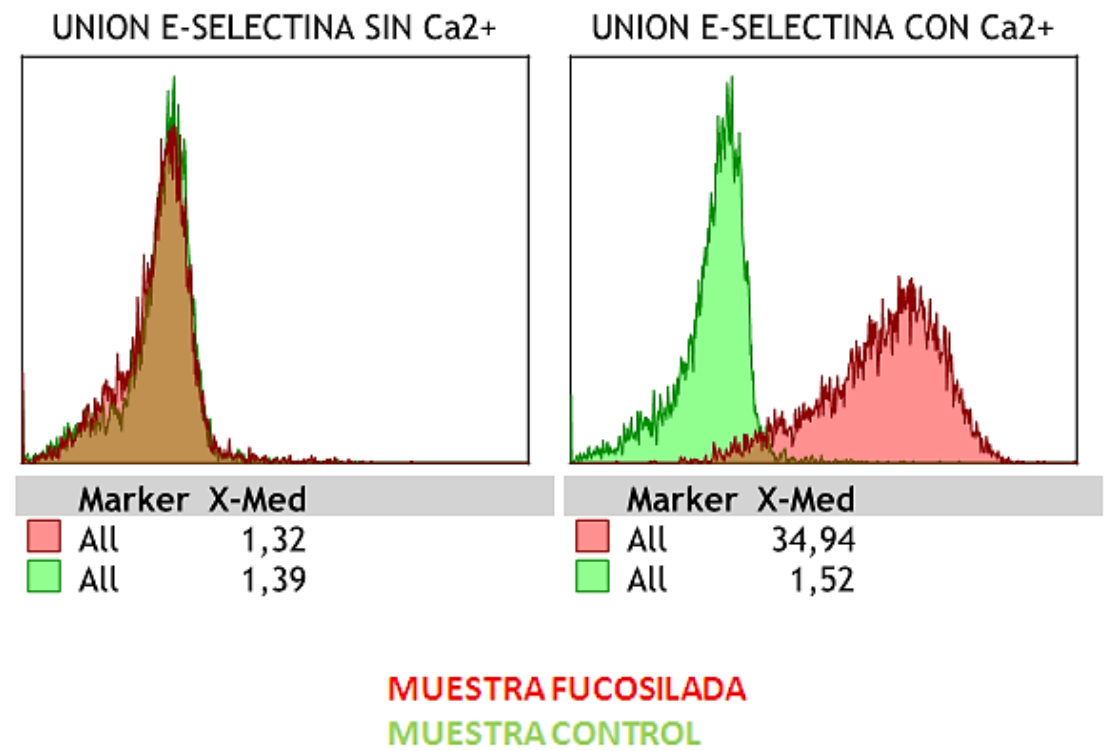


Gráfico 32. Gráficos de puntos biparamétrico con los controles: buffer control y buffer control de la fucosilación (Muestra 24 postfucosilada).

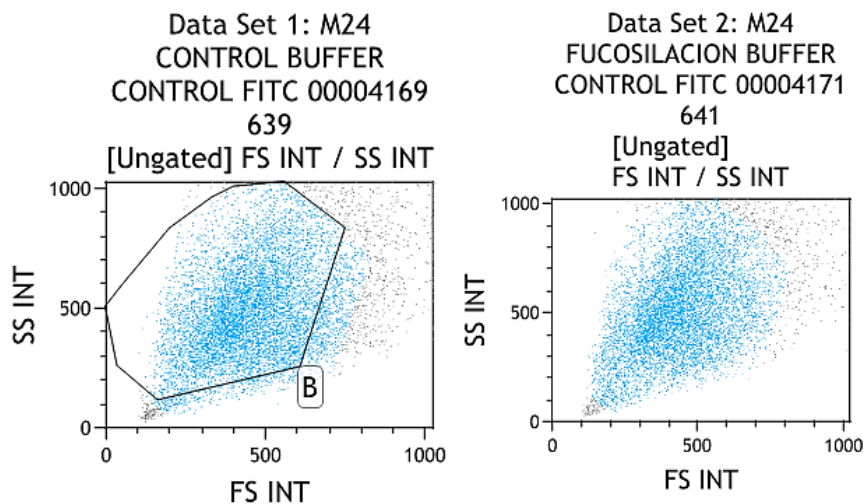


Gráfico 33. Histograma de expresión de marcadores. Ausencia de células en los buffer de ambas muestras (Imagen izquierda). Expresión de CD44 intensa en muestra control con CSM sin fucosilar (color verde) y de la muestra M24 con CSM fucosiladas (color rojo) (Imagen derecha). Superposición de ambas (color marrón).

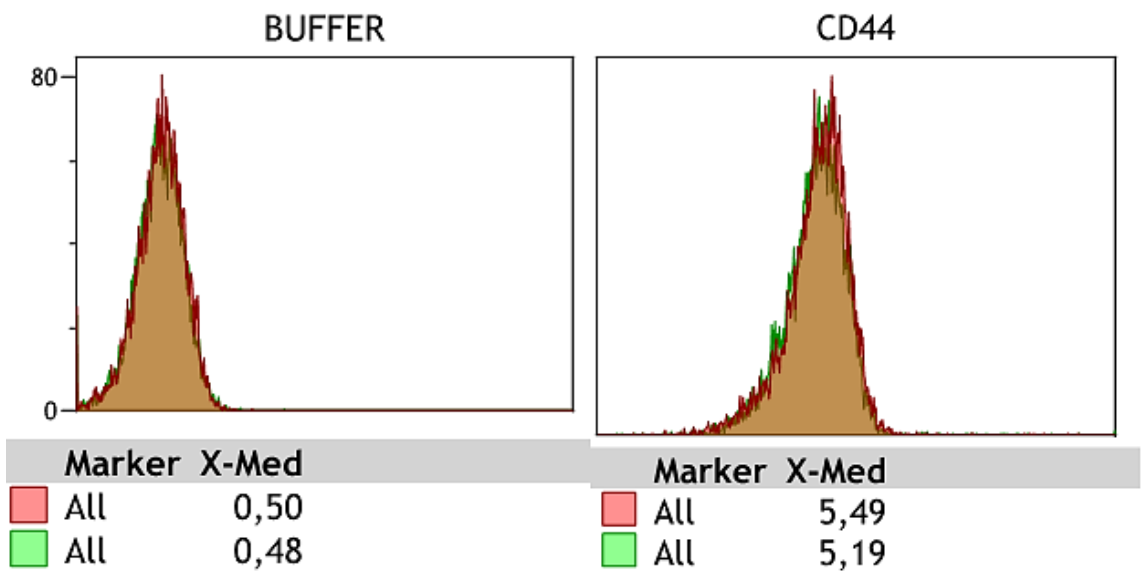


Gráfico 34. Histograma de expresión de marcadores. Expresión de HECA 452 (Izquierda), KM93 (Centro) y 80H5 (Derecha) en muestra control con CSM sin fucosilar (color verde) y de la muestra M24 con CSM fucosiladas (color rojo). Superposición de ambas (color marrón).

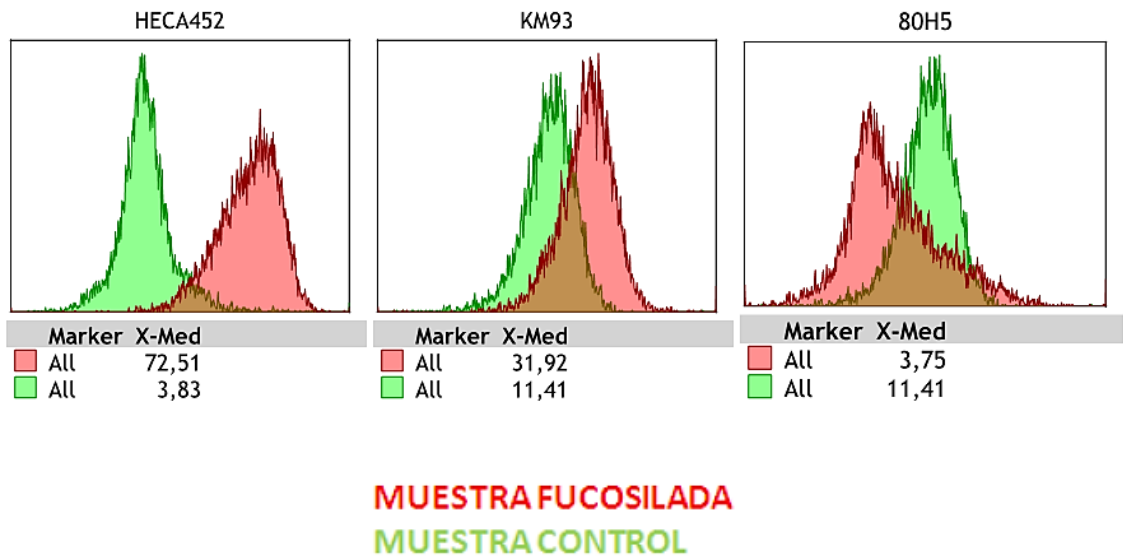


Gráfico 35. Histograma de expresión de marcadores. Expresión de quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (Izquierda) y con calcio (Derecha) en muestra control con CSM sin fucosilar (color verde) y de la muestra M24 con CSM fucosiladas (color rojo). Superposición de ambas (color marrón).

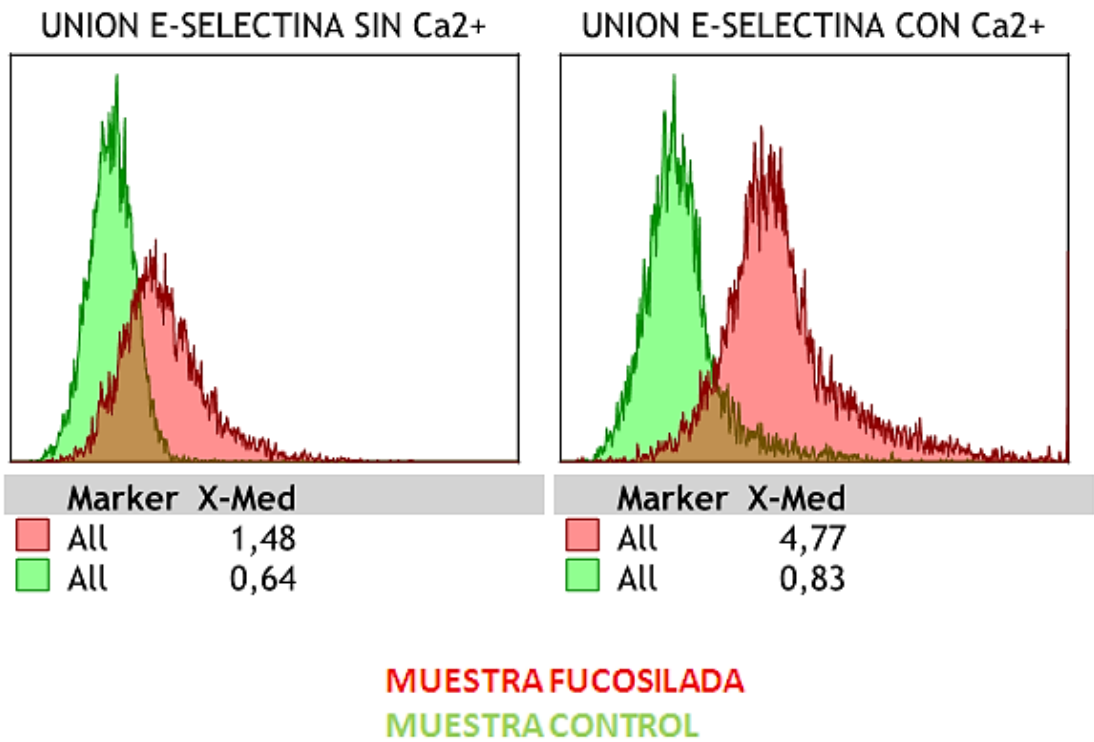
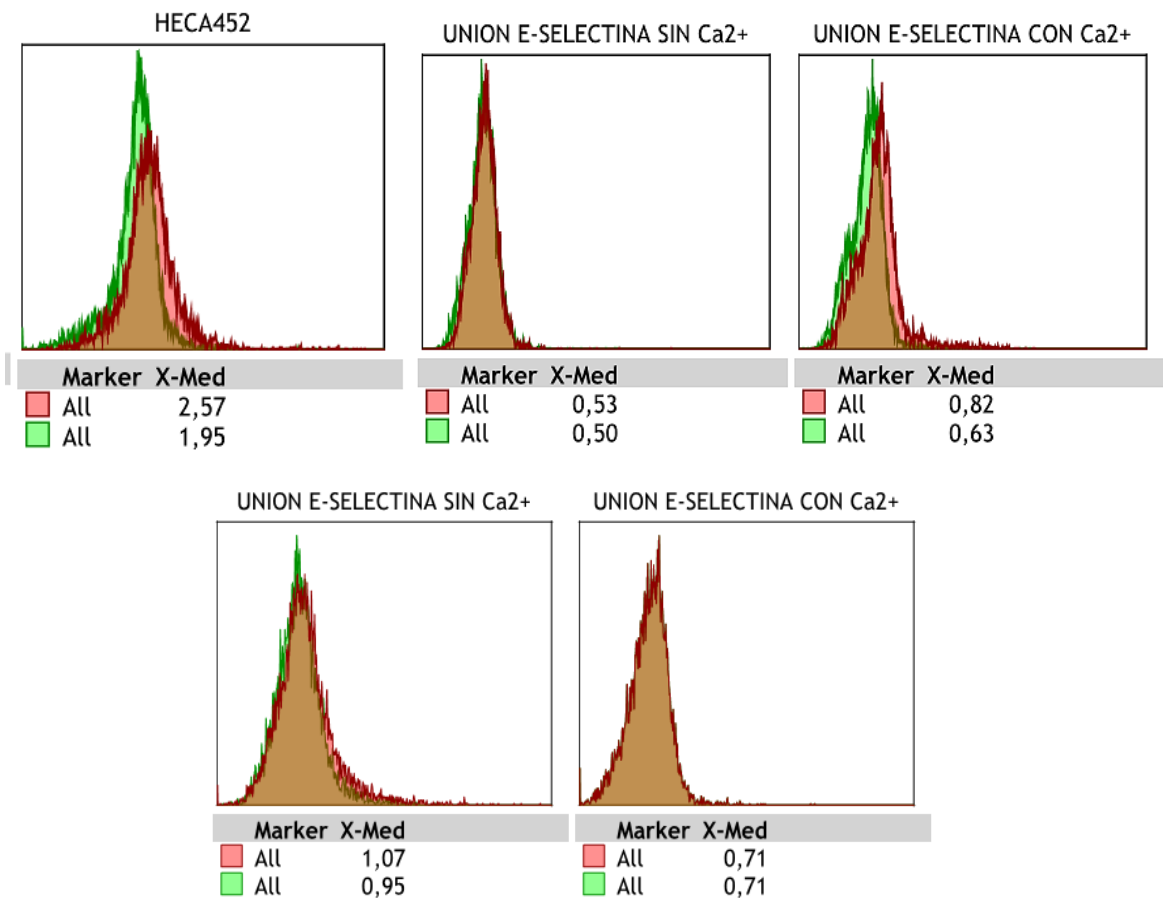


Gráfico 36. Histograma de expresión de marcadores. Expresión de HECA 452 (Izquierda) quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (Centro) y con calcio (Derecha) en muestra control con CSM sin fucosilar (color verde) y de la muestra M18 con CSM no sometidas a fucosilación (color rojo). La expresión de HECA 452 (Izquierda) quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (Centro) y con calcio (Derecha) en muestra control con CSM sin fucosilar (color verde) y de la muestra M22 con CSM no sometidas a fucosilación (color rojo) se muestran los dos histogramas inferiores. Superposición de ambas (color marrón).

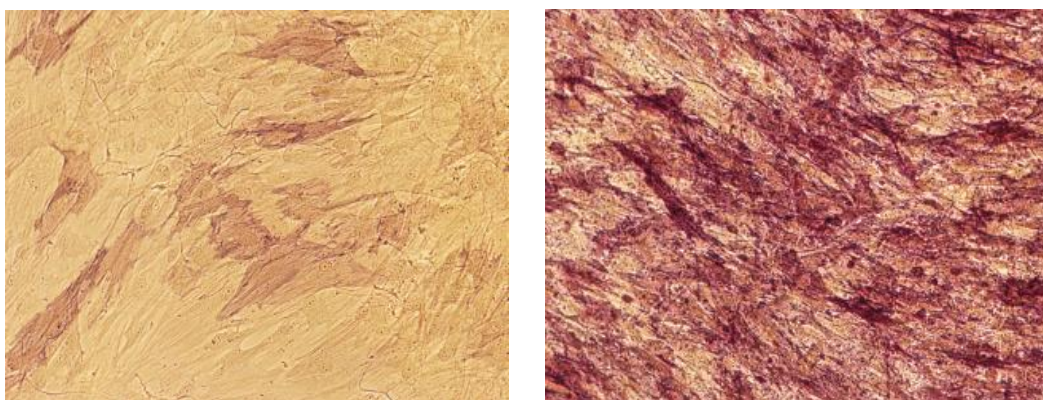


2.3.- RESULTADOS DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA, ADIPOGÉNICA Y CONDRÓGENICA PRE Y POST-FUCOSILACIÓN.

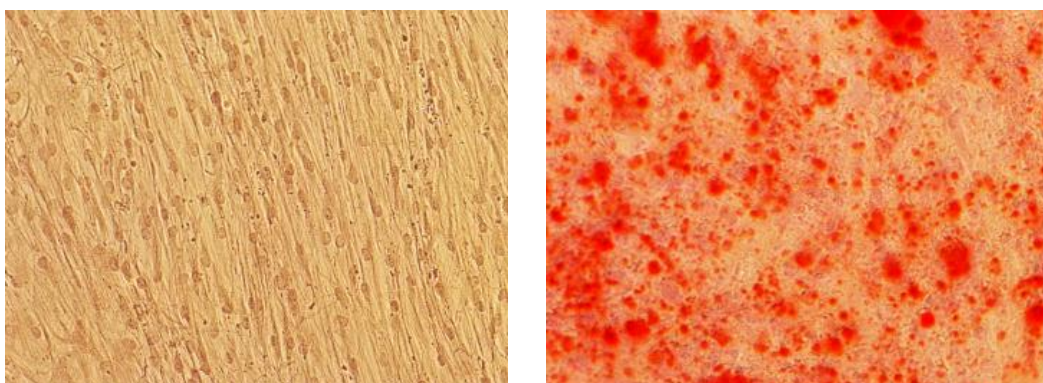
El 100% de los cultivos de las CSM de médula ósea obtenidas de los donantes mostró una correcta diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica previas a la fucosilación.

El 100% de los cultivos de CSM en medio NH Osteodiff Médium® que habían sido sometidas al proceso de fucosilación mostraron expresión de fosfatasa alcalina. En la fotografía 34 se muestra un ejemplo representativo de células de color púrpura oscuro tras aplicar solución NBT/BCIP® (Nitroblue tetrazolium chloride 5 bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate). También se observaron depósitos de calcio de color naranja tras añadir Alizarín Red® (fotografía 36). En los controles negativos no se observó expresión de fosfatasa alcalina (fotografía 33) ni depósitos de calcio (fotografía 35).

Fotografías 33 y 34. Evaluación de diferenciación osteogénica en CSM tras aplicar solución NBT/BCIP®. Control negativo (Imagen izquierda). CSM con expresión positiva de fosfatasa alcalina (Imagen derecha).

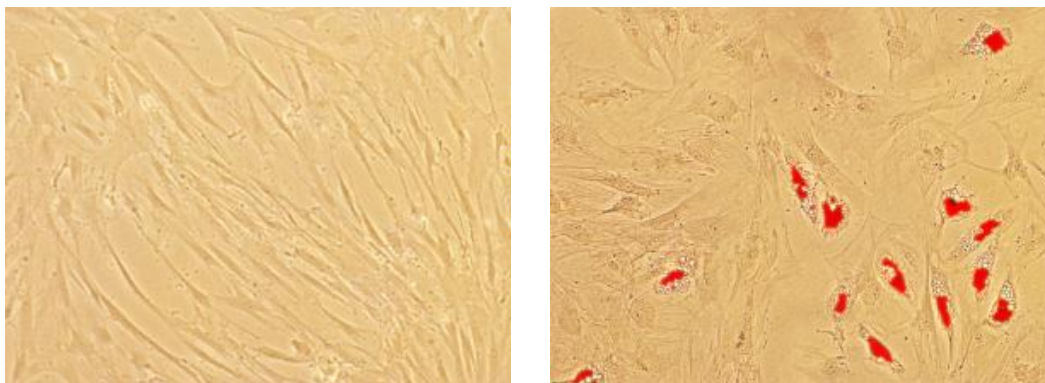


Fotografías 35 y 36. Evaluación de diferenciación osteogénica en CSM tras aplicar Alizarín Red®. Control negativo (Imagen izquierda). CSM con expresión positiva de calcio (Imagen derecha).



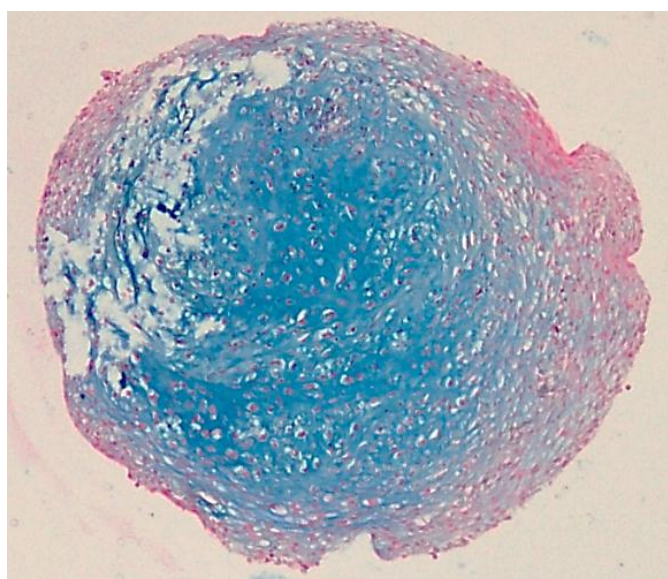
Un 100% de las CSM humanas fucosiladas sometidas a cultivos de diferenciación en medio NH Adipodiff Médium® mostraron vacuolas lipídicas citoplasmáticas tras añadir Oil Red® (color rojo-anaranjado) lo que confirma una capacidad de diferenciación adipogénica indemne tras el proceso de fucosilación. En los controles negativos no se observaron vacuolas de grasas en el citoplasma (fotografías 37 y 38).

Fotografías 37 y 38. Evaluación de diferenciación adipogénica en CSM con Oil Red®. Control negativo (Imagen izquierda). CSM con presencia de vacuolas lipídicas citoplasmáticas de color rojo anaranjado (Imagen derecha).



El 100% de los cultivos de CSM en medio NH ChondroDiff® que habían sido sometidas al proceso de fucosilación mostraron una correcta diferenciación condrogénica identificándose condrocitos con la tinción Azul de toluidina (fotografía 39). En los controles negativos no se observó diferenciación condrogénica.

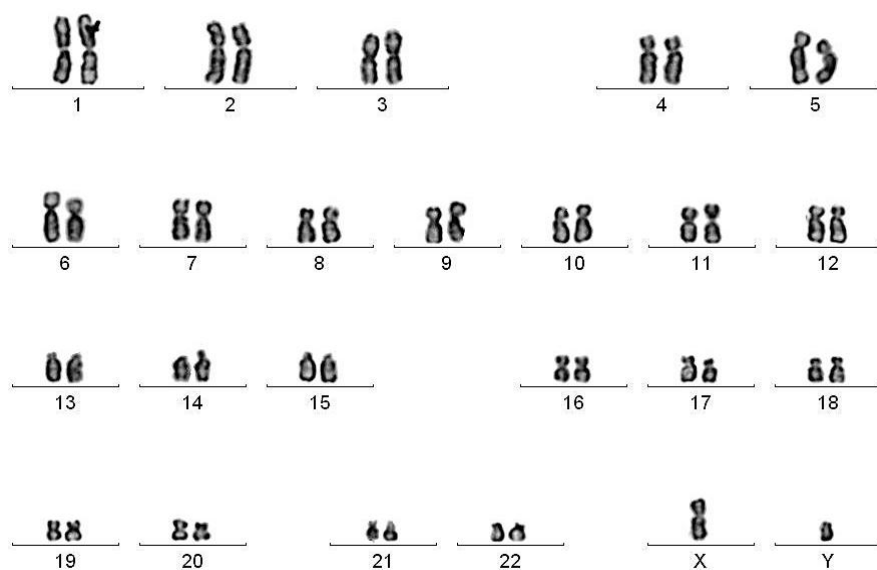
Fotografía 39. Condrocitos tras cultivo de CSM en medio NH Chondrodiff® (Azul de toluidina).



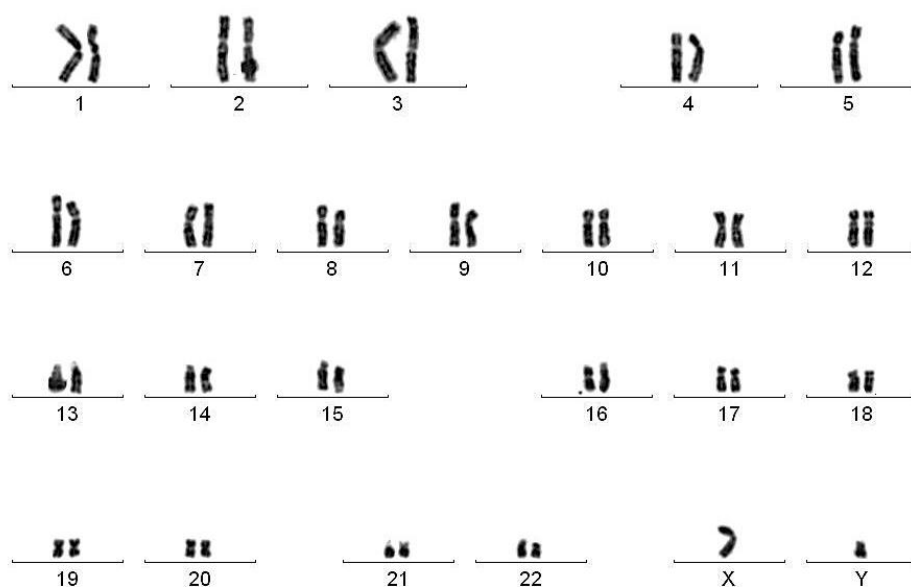
2.4.- ESTUDIO DE ESTABILIDAD CROMOSÓMICA. CARIOTIPO.

Las 4 muestras estudiadas presentaron un cariotipo normal en fase 2 antes y después de la fucosilación enzimática. En las fotografías 40 y 41 se expone un ejemplo representativo del cariotipo de la muestra 18 pre y post-fucosilación.

Fotografía 40. Cariotipo normal de muestra M18 antes de la fucosilación en fase 2.



Fotografía 41. Cariotipo normal de muestra M18 tras el proceso de fucosilación.



3.- ASIGNACIÓN DE RAMA A RATONES NOD/SCID

Los 31 ratones NOD/SCID (17 machos y 14 hembras) fueron asignados por el investigador a cada una de las ramas de tratamiento. 13 ratones (6 machos y 7 hembras) fueron infundidos con células madre mesenquimales fucosiladas, 14 (9 machos y 5 hembra) recibieron células madre mesenquimales sin fucosilar y los 4 ratones NOD/SCID restantes (2 machos y 2 hembras) fueron infundidos con suero salino fisiológico. Los datos registrados de los ratones NOD/SCID en función del número de identificación y la rama de tratamiento se exponen en la tabla 15.

Tabla 15. Registro de datos de ratones NOD/SCID en el que figura número de identificación (ID) con códigos numéricos asignados, género, fecha de infusión y rama del estudio.

ID RATÓN	GÉNERO	CÓD. LABORAT	CÓD. BIOBANCO	FECHA INFUSIÓN	PRODUCTO INFUSIÓN
1A	MACHO	1126S1202	12N94	26-nov	CSM
1B	MACHO	1126S1203	12N95	26-nov	CSM
1C	MACHO	1126S1204	12N96	26-nov	CSM
2A	MACHO	1126S1205	12N88	26-nov	SSF 0.9%
2B	MACHO	1126S1206	12N97	26-nov	CSM
2C	MACHO	1126S1207	12N98	26-nov	CSM
3A	MACHO	1204S102	12N70	04-dic	CSM FUCO
3B	MACHO	1204S702	12N82	04-dic	CSM FUCO
3C	MACHO	1126S1208	12N89	26-nov	SSF 0.9%
4A	MACHO	1126D102	12N60	26-nov	CSM FUCO
4B	MACHO	1126D202	12N62	26-nov	CSM FUCO
4C	MACHO	1126S1201	12N90	26-nov	CSM FUCO
5B	MACHO	1204S202	12N73	04-dic	CSM
5C	MACHO	1204S502	12N79	04-dic	CSM
6A	MACHO	1204S1201	12N99	04-dic	CSM
6B	MACHO	1204S902	12N86	04-dic	CSM
6C	MACHO	1204S1202	12N100	04-dic	CSM FUCO
7A	HEMBRA	1126S1209	12N92	26-nov	SSF 0.9%
7B	HEMBRA	1126S1210	12N93	26-nov	CSM
7C	HEMBRA	1126S1211	12N91	26-nov	SSF 0.9%
8A	HEMBRA	1204S101	12N71	04-dic	CSM
8C	HEMBRA	1126D101	12N61	26-nov	CSM FUCO
9A	HEMBRA	1204S1203	12N101	04-dic	CSM FUCO
9B	HEMBRA	1204S1204	12N102	04-dic	CSM FUCO
9C	HEMBRA	1204S1205	12N103	04-dic	CSM FUCO
10A	HEMBRA	1204S901	12N87	04-dic	CSM
10B	HEMBRA	1204S1206	12N104	04-dic	CSM
10C	HEMBRA	1204S201	12N72	04-dic	CSM
11B	HEMBRA	1126D201	12N63	26-nov	CSM FUCO
11C	HEMBRA	1204S501	12N78	04-dic	CSM FUCO
12C	HEMBRA	1204S701	12N83	04-dic	CSM FUCO

CSM: Células Stem Mesenquimales; CSM fuco: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; ID: Identificación; Cód: código; SSF: suero salino fisiológico.

4.- EVALUACIÓN CLÍNICA PRE-FUCOSILACIÓN.

4.1.- SCORE DE BIENESTAR ANIMAL.

El 100% de los ratones NOD/SCID presentó un score de bienestar animal de 0 tanto en la recepción como en el momento previo a la fucosilación.

4.2. PESO.

También se analizó el peso previo a la infusión en todos los ratones NOD/SCID antes de realizar la infusión. La mediana de peso de los ratones NOD/SCID el día previo a la infusión fue de 21.1 g [20.1-22.2]. Los ratones NOD/SCID machos tuvieron una mediana de peso de 21.3 [20.8-22.1] mientras que las hembras tenían un peso de 20.9 [19-22.4] (gráfico 37). No se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo ($p=0.45$). No se observaron diferencias significativas en las medianas de los pesos previos a la infusión de los ratones NOD/SCID en función de la rama asignada de tratamiento ($p=0.97$) (tabla 16).

Gráfico 37. Peso de los ratones NOD/SCID en función del sexo (n=31)
(*t de Student datos independientes*).

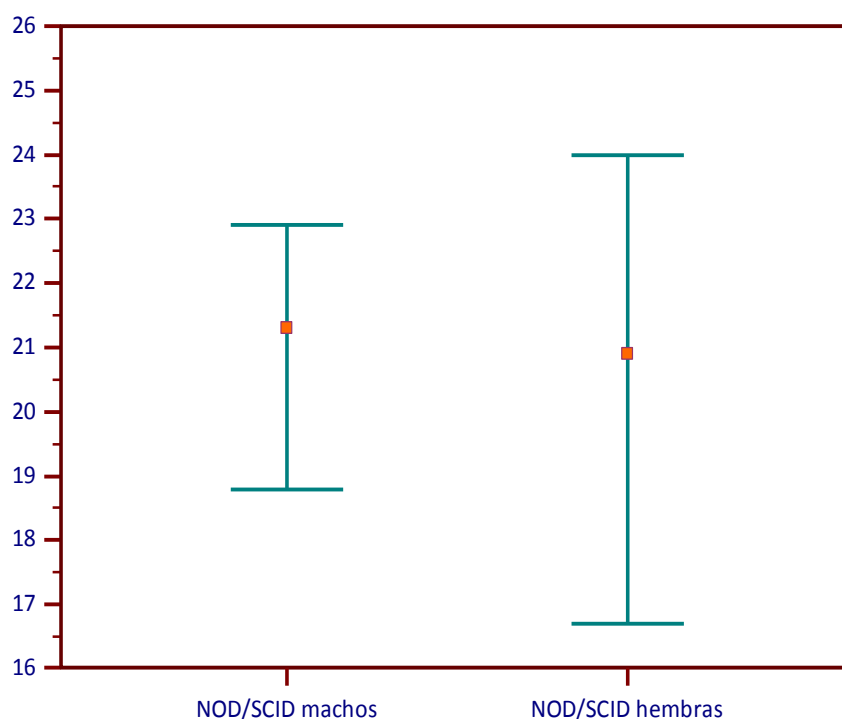


Tabla 16. Peso de los ratones NOD/SCID previos a la infusión en función de la rama de tratamiento (n=31) (Test Kruskal-Wallis).

	Mediana (g)	Rango intercuartílico	p
Ratones NOD/SCID en brazo de CSM fucosiladas	21.3	19.2-22.3	0.97
Ratones NOD/SCID en brazo de CSM	21.1	20.9-21.5	
Ratones NOD/SCID en brazo de SSF	21.4	19.7-22.4	

5.- INFUSIÓN DE PRODUCTO.

Todos los ratones NOD/SCID fueron infundidos en dos días diferentes, siendo asignado el día de la infusión como el día 0 del inicio del seguimiento. A todos los ratones NOD/SCID del grupo de fucosilación les fueron infundidas 1×10^6 de CSM fucosiladas en un volumen de 0.3 mL de SSF estéril y a los ratones del grupo de células stem mesenquimales sin fucosilar se les administró un total de 1×10^6 células en 0.3 mL de SSF. A los ratones del grupo de salino se les inyectó solamente 0.3 mL de SSF estéril alicuotado. No se registró ninguna incidencia relacionada con la exposición a luz infrarroja. Se observaron 2 pequeñas equimosis en la zona de punción de dos ratones (1 macho y 1 hembra) infundidos con CSM fucosiladas.

6.- EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA.

No se registró ningún fallecimiento espontáneo en el período de evaluación de toxicidad aguda.

6.1.- SCORE DE BIENESTAR ANIMAL.

El 100% de los ratones de todos los grupos presentó un score 0 a los 5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 1º día post-infusión. Al 2º día postinfusión, una hembra en el brazo de SSF, presentó un score de 1 (agitación intensa a la estimulación) mientras que en los otros grupos el score fue 0 en el 100% de los casos.

6.2.- PESO.

La mediana de peso de los ratones NOD/SCID en el 1º y 2º día post-infusión fueron 21.7 g [20.2-22.6] y 21.6 g [20.6-22.4] respectivamente. No se observaron diferencias entre el peso previo a la infusión y el peso de los animales en el 1º día post-infusión ($p=0.61$) ni en el 2º día ($p=0.25$). Tampoco objetivamos diferencias entre el 1º y 2º día ($p=0.21$).

Tampoco observamos diferencias significativas al comparar la variación ponderal entre la recepción y los días 1º postinfusión y entre el 1º y 2º día ($p=0.74$) (tabla 17).

Tabla 17. Incremento medio ponderal de ratones NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión (n=31) (Test de Wilcoxon).

Intervalo	Media Δ ponderal (gramos)	p
Recepción-1º día	-0.1 [(-0.4)-(+0.8)]	0.74
1º día – 2º día	0.1 [(-0.2)-(+0.6)]	

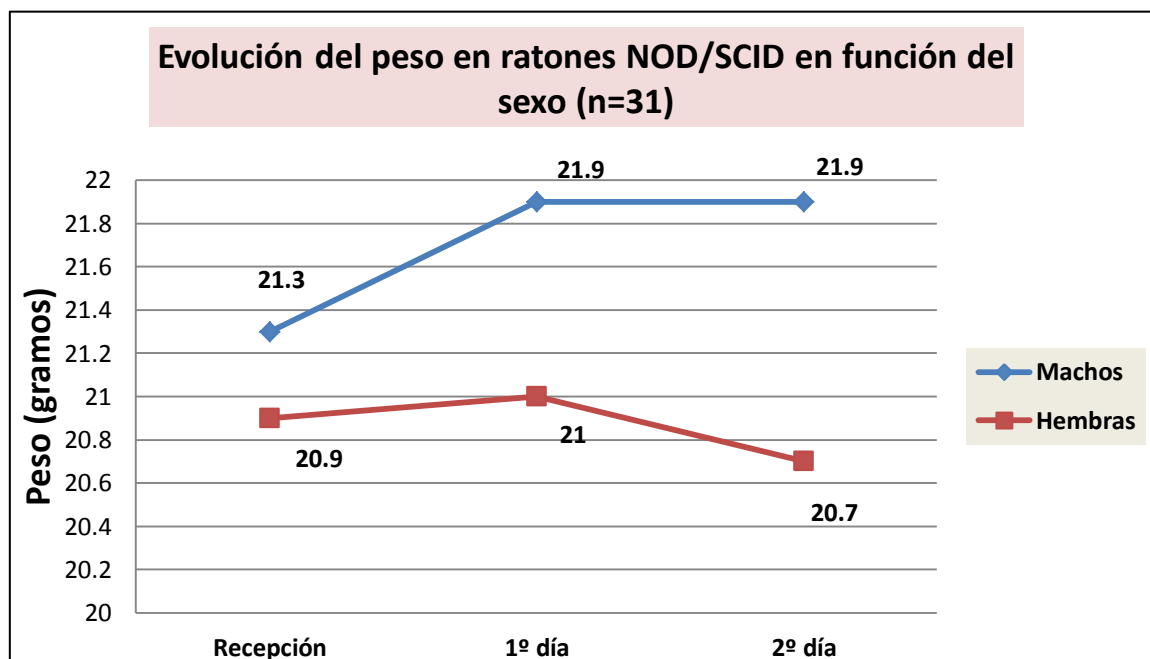
La evolución de las medianas de peso estratificadas por sexo de los ratones NOD/SCID en los días 1º y 2º post-infusión se puede observar en el gráfico 38. No observamos diferencias en los pesos entre los machos y las hembras en los 1º y 2º día postinfusión (tabla 18).

Tabla 18. Peso de ratones NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión en función del sexo (n=31) (U de Mann Whitney).

Día	Peso NOD/SCID machos	Peso NOD/SCID hembras	p
	Mediana [RIC]	Mediana [RIC]	
Previo a la infusión	21.3 [20.8-22.1]	20.9 [19-22.4]	0.45
1º día	21.9 [20.8-22.7]	21 [18.7-21.8]	0.07
2º día	21.9 [21.1-22.5]	20.7 [18.2-22.4]	0.14

RIC: Rango intercuartílico.

Gráfico 38. Evolución de la mediana de pesos de los ratones NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión estratificadas por sexo.



Sin embargo al evaluar la ganancia ponderal estratificada por sexo observamos una ganancia de peso significativa en el 1º día post-infusión en los machos 0.3 g [0.1-0.8] con respecto a las hembras -0.3 g [(-0.7)-(-0.1)] ($p=0.01$). Al 2º día post-infusión esta diferencia en la ganancia de peso en los machos se mantenía 0.4 g [0-1.1] con respecto a las hembras -0.1 g [(-0.7)-(+0.2)] ($p=0.02$). No existían variaciones entre los sexos con respecto al incremento ponderal entre los días 1º y 2º post-infusión ($p=0.93$) (tabla 19).

Tabla 19. Incremento medio ponderal de ratones NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión (estratificado por sexo (n=31) (*U de Mann Whitney*).

Período	Δ ponderal NOD/SCID machos (g)	Δ ponderal NOD/SCID hembras (g)	p
	Medianas [RIC]	Medianas [RIC]	
Previo a la infusión vs 1º día	0.3 [0.1-0.8]	-0.3 [(-0.7)-(-0.1)]	0.01
1º día vs 2º día	-0.1 [(-0.2)-(+0.6)]	0 [(-0.3)-(+0.7)]	0.93
Previo a la infusión vs 2º día	0.4 [0-1.1]	-0.1 [(-0.7)-(+0.2)]	0.02

RIC: Rango intercuartílico.

Estos ratones machos pesaban más en el 1º día postinfusión con respecto a su peso previo ($p=0.039$) persistiendo al comparar pasados 2 días postinfusión ($p=0.025$). No existía diferencia sin embargo entre los pesos del 1º y 2º día ($p=0.4$) (tabla 20).

Tabla 20. Peso de ratones macho NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión (n=17) (Test de Wilcoxon).

Día	Peso NOD/SCID machos	p
Medianas [RIC]		
Previo a la infusión vs 1º día	21.3 [20.8-22.1] vs 21.9 [20.8-22.7]	0.039
1º día vs 2º día	21.9 [20.8-22.7] vs 21.9 [21.1-22.5]	0.4
Previo a la infusión vs 2º día	21.3 [20.8-22.1] vs 21.9 [21.1-22.5]	0.025

RIC: Rango intercuartílico.

Al estratificar los machos por el producto recibido, podemos objetivar que no existen diferencias en el incremento de peso en el 1º día ($p=0.51$) ni en la curva ponderal del 1º al 2º día ($p=0.32$). Tampoco se constataron diferencias en la curva ponderal desde la infusión hasta el 2º día dependiendo del producto infundido ($p=0.18$) (tabla 21).

Tabla 21. Incremento medio ponderal de ratones macho NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión estratificados por rama de tratamiento (n=17) (Test de Kruskal-Wallis).

NOD/SCID machos día post-infusión	Peso NOD/SCID CSM fuco (n=6)	Peso NOD/SCID CSM (n=9)	Peso NOD/SCID SSF (n=2)	
	Mediana [RIC]	Mediana [RIC]	Mediana [RIC]	p
Incremento desde peso previo al 1º día	0.2 [(-0.1)-(+1.5)]	0.3 [(-0.4)-(+0.8)]	0.9 [0.6-1.3]	0.51
Incremento desde 1º al 2º día	-0.1 [(-0.2)-(+0.1)]	-0.1 [(-0.2)-(+0.7)]	0.4 [0.3-0.6]	0.32
Incremento desde peso previo al 2º día	-0.1 [(-0.2)-(+0.8)]	0.3 [0.1-0.9]	1.4 [1.2-1.6]	0.18

RIC: Rango intercuartílico.

No observamos incrementos o disminuciones ponderales en las hembras en los dos primeros días con respecto al peso previo (tabla 22).

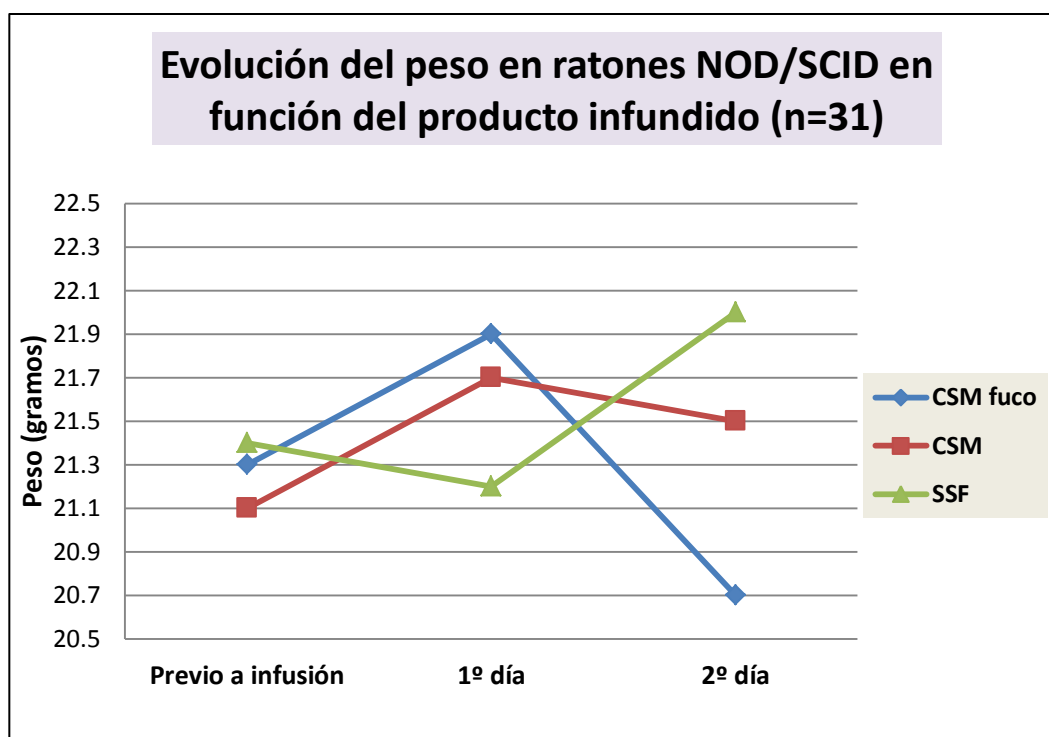
Tabla 22. Peso de ratones hembras NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión (n=14) (Test de Wilcoxon).

Día	Peso NOD/SCID hembras	p
Medianas [RIC]		
Previo a la infusión vs 1º día	20.9 [19-22.4] vs 21 [18.7-21.8]	0.067
1º día vs 2º día	21 [18.7-21.8] vs 20.7 [18.2-22.4]	0.41
Previo a la infusión vs 2º día	20.9 [19-22.4] vs 20.7 [18.2-22.4]	0.3

RIC: Rango intercuartílico.

La evolución de las medianas de peso de los ratones NOD/SCID en función del producto infundido en los primeros dos días tras la administración del producto se pueden observar en el gráfico 39. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en los pesos de los ratones NOD/SCID en función del producto administrado de forma intravenosa en los dos primeros días post-infusión (los datos se exponen en la tabla 19) ni en las variaciones ponderales observadas en el 2º día con respecto al peso inicial ($p=0.16$) (tablas 23, 24, 25 y 26).

Gráfico 39. Evolución de las medianas de peso en ratones NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión estratificado por rama de tratamiento (n=31).



CSM fuco: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: suero salino fisiológico.

Tabla 23. Peso de ratones NOD/SCID en los primeros dos días postinfusión estratificado por rama de tratamiento (n=31) (Test de Kruskal-Wallis).

Día post-infusión	Peso NOD/SCID CSM fuco (n=13)	Peso NOD/SCID CSM (n=14)	Peso NOD/SCID SSF (n=4)	
	Mediana [RIC]	Mediana [RIC]	Mediana [RIC]	p
Previo a la infusión	21.3 [19.2-22.3]	21.1 [20.9-21.5]	21.4 [19.6-22.4]	0.96
1º día	21.9 [19.1-22.7]	21.7 [20.6-22.5]	21.2 [20.6-21.5]	0.81
2º día	20.7 [18.6-22.5]	21.5 [20.7-22.4]	22 [21-22.5]	0.73

RIC: Rango intercuartílico.

Tabla 24. Incremento medio ponderal de ratones NOD/SCID en el primer día postinfusión estratificados por rama de tratamiento (n=31) (Test de Kruskal-Wallis).

Producto infundido	Δ ponderal medio g [RIC] Infusión-1º día	p
CSM FUCO	- 0.1 [(-0.2)-(+0.4)]	0.97
CSM	0.3 [(-0.4)-(+0.7)]	
SSF	0 [(-0.9)-(+0.9)]	

RIC: Rango intercuartílico.

Tabla 25. Incremento medio ponderal de ratones NOD/SCID del 1º al 2º día postinfusión estratificados por rama de tratamiento (n=31) (Test de Kruskal-Wallis).

Producto infundido	Δ ponderal medio g [RIC] 1º-2º día	p
CSM FUCO	0 [(-0.3)-(+0.2)]	0.06
CSM	-0.1 [(-0.2)-(+0.6)]	
SSF	0.7 [0.4-0.9]	

RIC: Rango intercuartílico.

Tabla 26. Incremento medio ponderal de ratones NOD/SCID a los dos días postinfusión estratificados por rama de tratamiento (n=31) (Test de Kruskal-Wallis).

Producto infundido	Δ ponderal medio g [RIC] Infusión-2º día	p
CSM FUCO	- 0.1 [(-0.4)-(+0.1)]	0.16
CSM	0.3 [0-0.7]	
SSF	0.7 [0-1.4]	

RIC: Rango intercuartílico.

6.3.- PARÁMETROS HEMÁTICOS.

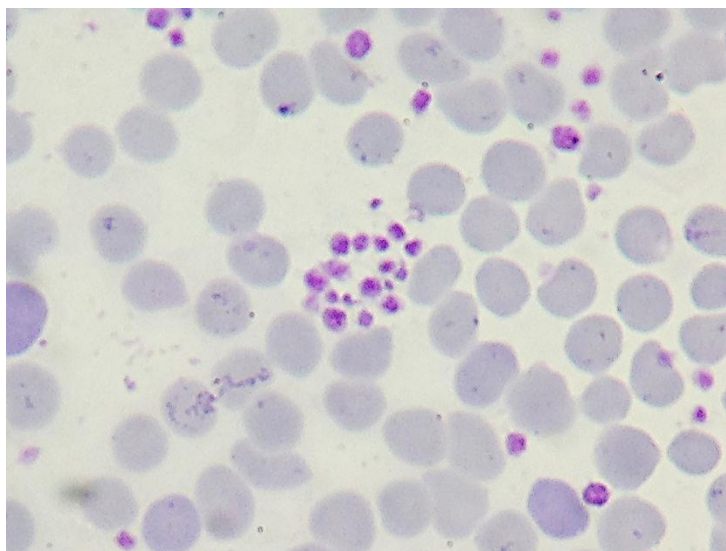
Los 4 ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosilados presentaron los siguientes parámetros en el hemograma se pueden observar en la tabla 27.

Tabla 27. Parámetros hemáticos en ratones NOD/SCID sacrificados en período de evaluación de toxicidad aguda (n=4).

	Mediana [Rango intercuartílico]
Hemoglobina	141 g/L [116-162]
Plaquetas	314 x 10 ⁹ /L [90-502]
Leucocitos	0.59 x 10 ⁹ /L [0.37-1.34]
Neutrófilos	0.35 x 10 ⁹ /L [0.21-0.81]
Linfocitos	0.23 x 10 ⁹ /L [0.11-0.51]
Monocitos	0.01 x 10 ⁹ /L [0-0.03]
Eosinófilos	0.03 x 10 ⁹ /L [0.01-0.04]
Basófilos	0 x 10 ⁹ /L [0-0]

Debido a la trombopenia objetivada en los hemogramas, decidimos evaluar la morfología plaquetar murina en sangre periférica a estas muestras con el fin de comprobar la trombopenia. En los frotis observamos numerosos agregados plaquetarios (fotografía 42).

Fotografía 3. Frotis de sangre periférica de ratón NOD/SCID infundido con CSM fucosiladas. Presencia de agregados plaquetarios. Pseudotrombopenia.



6.4.- PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.

Los 4 ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosilados presentaron los siguientes parámetros bioquímicos en suero se pueden observar en la tabla 28.

Tabla 28. Parámetros bioquímicos de normalidad en suero de ratones NOD/SCID sacrificados en período de evaluación de toxicidad aguda (n=4).

	Mediana [Rango intercuartílico]
Glucosa	360 mg/dL [350-365]
Urea	40 mg/dL [40-40]
Creatinina	< 0.2 mg/dL (todos los casos)
GOT	220 UI/L [175-250]
GPT	40 UI/L [40-55]
Calcio	10 mg/dL [9-10.5]
Fósforo	10.5 mg/dL [9-10.5]

UI: Unidades internacionales

6.5.- HISTOLOGÍA EN RATONES NOD/SCID INFUNDIDOS CON CSM-FUCOSILADAS SACRIFICADOS EN EL 1º Y 2º DÍA POSTINFUSIÓN.

No se objetivaron alteraciones histológicas en corazón, pulmón, hígado, riñón, gónadas (ovarios y testículos), cerebro, calota y médula ósea en los 2 ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas sacrificados en el 1º día postinfusión. En el ratón macho sacrificado en el 1º día se observó hiperplasia de pulpa roja esplénica y ausencia de vaina linfoide. El análisis microscópico del bazo de la hembra sacrificada fue completamente normal. No se objetivaron alteraciones histológicas en ningún órgano de los 2 ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas sacrificados en el 2º día postinfusión.

7.- EVALUACIÓN DE TOXICIDAD CRÓNICA.

No se registró ningún fallecimiento espontáneo en los 27 ratones NOD/SCID restantes durante el período de evaluación de toxicidad crónica.

7.1.- SCORE DE BIENESTAR ANIMAL.

Los datos de los scores de bienestar registrados en los ratones durante el período de evaluación de toxicidad crónica se exponen en la tabla 29. El 100% de los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas presentó un score de 0 durante todo el período de seguimiento de toxicidad crónica. Un ratón NOD/SCID macho infundido con CSM sin fucosilar presentó en la 1ª semana postinfusión una exagerada respuesta en la evaluación del comportamiento provocado (score 1) sin volver a presentarlo. El resto de animales infundidos con CSM sin fucosilar (92.8%) presentaron un score de 0 durante todo el seguimiento. Un ratón macho en la rama de SSF presentó en la 1ª semana postinfusión también una respuesta agitada tras estimulación (score 1), presentando scores normales hasta la 9ª semana donde se observó el pelo encorvado junto a un área de alopecia (fotografía 43) y reaparición de la agitación en la evaluación del comportamiento provocado (score total 4), persistiendo dichos hallazgos hasta la 12ª semana. Los otros 3 ratones infundidos con salino (75%) mantuvieron un score de 0 durante todo el seguimiento. No se observaron diferencias significativas entre los tres brazos al comparar entre ellos los scores alterados (≥ 1) ($p=0.28$). Tampoco encontramos diferencias significativas al comparar la alteración en el score (≥ 1) en ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas con respecto a los infundidos con CSM sin fucosilar ($p=0.82$) al igual que tampoco las observamos al compararlos con la rama de salino ($p=0.66$).

Tabla 29. Score de bienestar animal en período de evaluación de toxicidad crónica (n=27).

CÓDIGO RATÓN	PRODUCTO INFUSIÓN	SEXO	STC 1S	STC 2S	STC 5S	STC 7S	STC 9S	STC 12S
12N70	CSM FUCO	MACHO	0	*	*	*	*	*
12N78	CSM FUCO	HEMBRA	0	0	0	*	*	*
12N82	CSM FUCO	MACHO	0	0	0	0	*	*
12N83	CSM FUCO	HEMBRA	0	0	0	0	*	*
12N90	CSM FUCO	MACHO	0	0	0	0	0	0
12N100	CSM FUCO	MACHO	0	0	0	0	0	0
12N101	CSM FUCO	HEMBRA	0	0	0	0	0	0
12N102	CSM FUCO	HEMBRA	0	0	0	0	0	0
12N103	CSM FUCO	HEMBRA	0	0	0	0	0	0
12N104	CSM	HEMBRA	0	0	0	0	0	0
12N71	CSM	HEMBRA	0	*	*	*	*	*
12N72	CSM	HEMBRA	0	0	*	*	*	*
12N87	CSM	HEMBRA	0	0	0	0	0	*
12N93	CSM	HEMBRA	0	0	0	0	0	0
12N73	CSM	MACHO	0	0	*	*	*	*
12N79	CSM	MACHO	0	0	0	*	*	*
12N86	CSM	MACHO	0	0	0	0	0	*
12N94	CSM	MACHO	1	0	0	0	0	0
12N95	CSM	MACHO	0	0	0	0	0	0
12N96	CSM	MACHO	0	0	0	0	0	0
12N97	CSM	MACHO	0	0	0	0	0	0
12N98	CSM	MACHO	0	0	0	0	0	0
12N99	CSM	MACHO	0	0	0	0	0	0
12N88	SSF 0.9%	MACHO	0	0	0	0	0	0
12N89	SSF 0.9%	MACHO	1	0	0	0	4	4
12N92	SSF 0.9%	HEMBRA	0	0	0	0	0	0
12N91	SSF 0.9%	HEMBRA	0	0	0	0	0	0

CSM FUCO: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; CSM: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; SSF 0.9%: Suero salino fisiológico al 0.9%; STC: Score de toxicidad crónica; * (No realizado el score por censura debido a sacrificio); 1s: 1 semana; 2s: 2 semanas; 5s: 5 semanas; 7s: 7 semanas; 9s: 9 semanas; 12s: 12 semanas;

Fotografía 43. Ratón NOD/SCID infundido con SSF (código 12N89) con pelo encorvado y área de alopecia.



7.2.- PESO

La evolución de la mediana [RIC] del peso de todos los ratones NOD/SCID por semanas durante todo el seguimiento de la toxicidad crónica fue la siguiente: 1ª semana 21.5 g [20.5-22.9] 2ª semana 22.3 g [20.7-23.4], 5ª semana 23.6 g [21.8-25.4], 7ª semana 25.1 g [22.6-27.1], 9ª semana 25.9 g [23.3-27] y 12ª semana 26.2 g [23.6-28.3] (gráfico 40). Como se observa en la tabla 24 existió una ganancia ponderal significativa desde cada punto de evaluación al siguiente y desde la recepción hasta el momento final del estudio (21.1 vs 26.2) ($p < 0.0001$). Las significaciones en cada punto de evaluación se muestran en la tabla 30.

Gráfico 40. Evolución del peso en ratones NOD/SCID por semana (n=27)

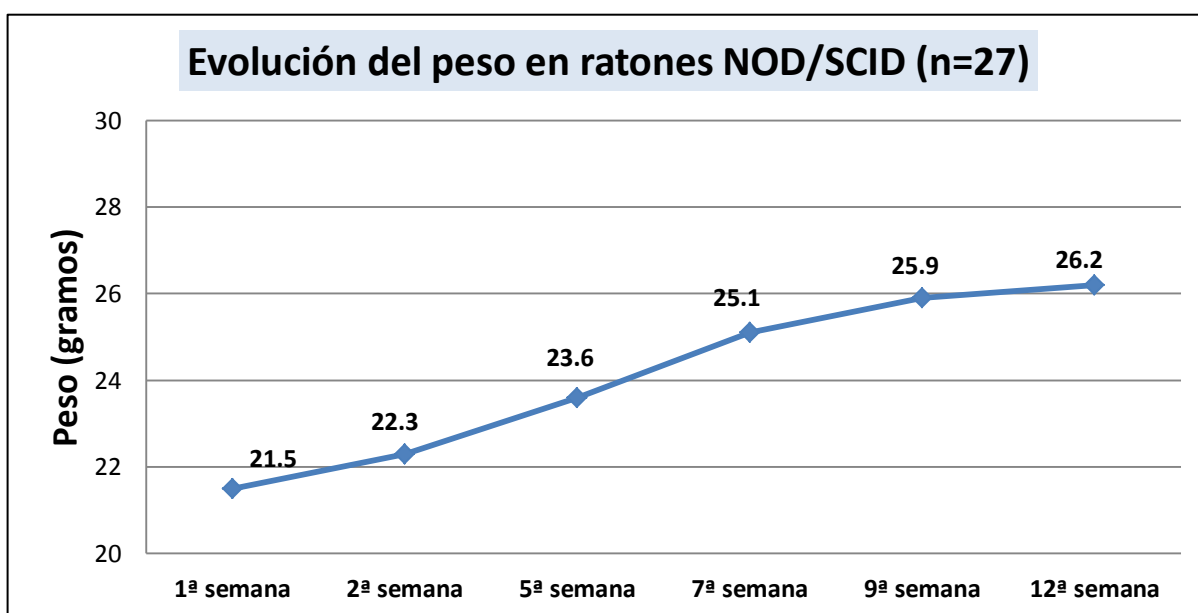


Tabla 30. Valores de significación estadística en las medianas de peso de ratones NOD/SCID en los distintos períodos del estudio (n=27) (Test de Wilcoxon).

Evolución temporal	p
1ª-2ª semana	0.001
2ª-5ª semana	< 0.0001
5ª-7ª semana	0.0002
7ª-9ª semana	0.0007
9ª-12ª semana	0.0002
Recepción -12ª semana	< 0.0001

La evolución de las medianas de peso de los ratones NOD/SCID machos y hembras por semanas durante todo el tiempo de seguimiento se pueden observar en el gráfico 41. Se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los ratones NOD/SCID machos y hembras en la 1ª semana postinfusión y a partir de la 3ª semana de forma constante (tabla 31).

Gráfico 41. Evolución de las medianas de peso en ratones NOD/SCID estratificado por sexo durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=27).

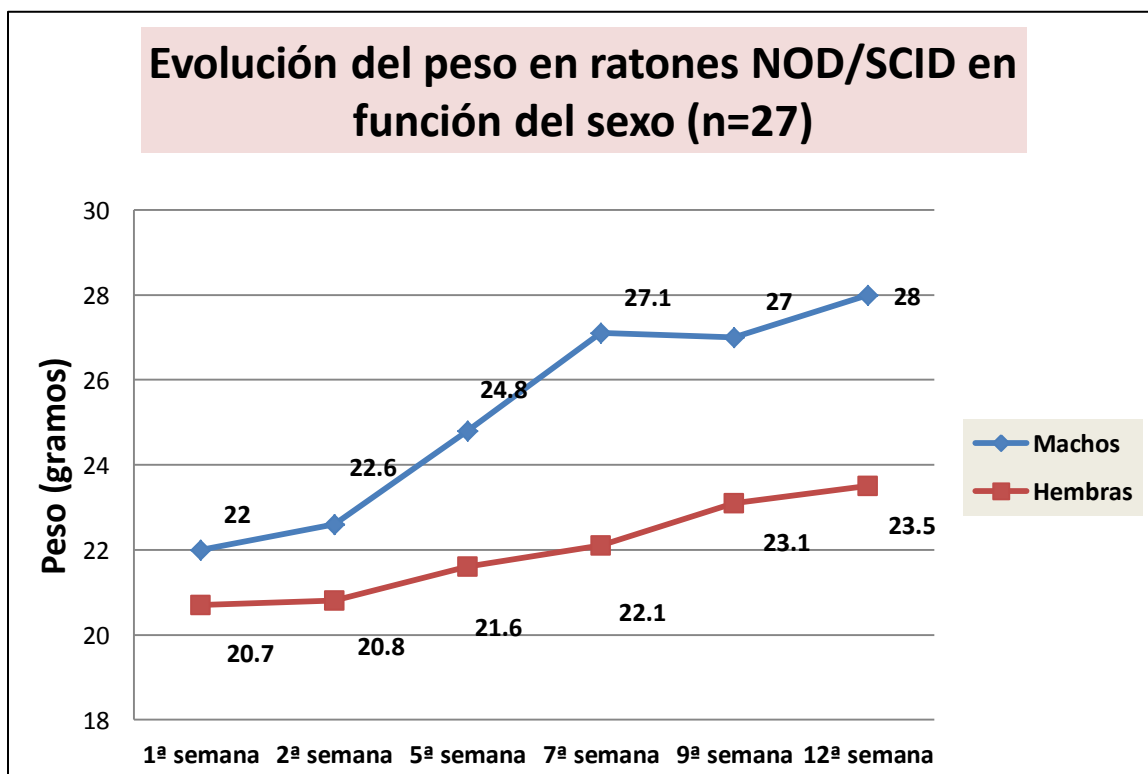


Tabla 31. Peso de ratones NOD/SCID en función del sexo durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=27) (U de Mann Whitney).

Semana post-infusión	Peso NOD/SCID machos	Peso NOD/SCID hembras	p
	Mediana [RIC]	Mediana [RIC]	
1ª semana	22 [21.5-23.5]	20.7 [19.4-21.4]	0.016
2ª semana	22.6 [21.9-23.8]	20.8 [19.7-22.5]	0.052
5ª semana	24.8 [23.5-26.2]	21.6 [20.7-23.4]	0.0013
7ª semana	27.1 [25.6-27.9]	22.1 [21.7-24]	0.0006
9ª semana	27 [25.8-27.9]	23.1 [22.3-24.8]	0.0022
12ª semana	28 [26.2-29.1]	23.5 [22.2-25.6]	0.004

RIC: Rango intercuartílico.

La evolución de las medianas de peso de los ratones NOD/SCID en función del producto infundido por semanas durante todo el tiempo de seguimiento de evaluación de toxicidad crónica se pueden observar en el gráfico 42. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas de evaluación entre los pesos de los ratones NOD/SCID en función del producto administrado de forma intravenosa en ninguna semana de evaluación (tabla 32). Tampoco se evidenciaron diferencias significativas en la mediana del incremento ponderal en cada uno de los grupos ($p=0.33$) (tabla 33).

Gráfico 42. Evolución de las medianas de peso en ratones NOD/SCID estratificado por rama de tratamiento durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=27).

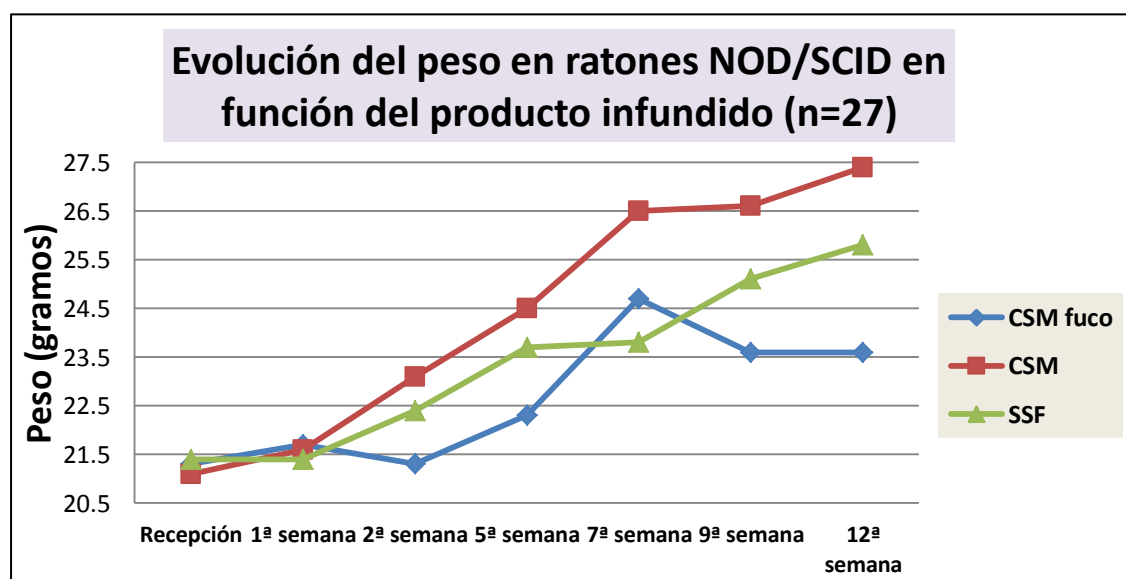


Tabla 32. Peso de ratones NOD/SCID estratificados por rama de tratamiento durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=27) (Test de Kruskal-Wallis).

Semana post-infusión	Peso NOD/SCID CSMf (n=9)	Peso NOD/SCID CSM (n=14)	Peso NOD/SCID SSF (n=4)	
	Mediana [RIC]	Mediana [RIC]	Mediana [RIC]	p
Previo a infusión	21.3 [19.2-22.3]	21.1 [20.9-21.5]	21.4 [19.6-22.4]	0.96
1ª semana	21.7 [19.4-23.4]	21.6 [20.5-23]	21.4 [21.2-21.5]	0.94
2ª semana	21.3 [20.1-22.8]	23.1 [20.7-24.3]	22.4 [20.6-23.9]	0.51
5ª semana	22.3 [21.2-24.1]	24.5 [22.3-26]	23.7 [22.9-24.3]	0.34
7ª semana	24.7 [21.9-26.1]	26.5 [23.4-27.9]	23.8 [22.7-25.5]	0.43
9ª semana	23.6 [22.7-27]	26.6 [24.5-27.9]	25.1 [23.5-26.8]	0.56
12ª semana	23.6 [23.1-27.7]	27.4 [25.7-29.4]	25.8 [24.3-27.5]	0.32

CSM: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; CSM; Células Stem Mesenquimales; SSF: salino.

Tabla 33. Incremento ponderal desde infusión hasta la 12ª semana de ratones NOD/SCID estratificados por rama de tratamiento (n=27) (Test de Kruskal-Wallis).

Producto infundido	Δ ponderal medio g [RIC] Infusión-12ª semana	p
CSM FUCO	4.6 [3.2-5.9]	0.33
CSM	5.2 [4.8-8.3]	
SSF	5.2 [2.3-7.4]	

7.3.- PARÁMETROS HEMÁTICOS.

La mediana y RIC de los parámetros hemáticos de los ratones sacrificados de los tres brazos durante el período de evaluación de toxicidad crónica se pueden observar en la tabla 34. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en el nivel de hemoglobina entre los tres grupos ($p=0.02$), objetivando en el análisis post-hoc que la cifra de Hb de los ratones infundidos con salino era inferior a la de los ratones de los brazos infundidos con CSM fucosiladas o no ($p<0.05$). No se observaron diferencias en la cifra de plaquetas entre los tres grupos ($p=0.54$). Tampoco se objetivaron diferencias significativas en el recuento absoluto de leucocitos entre los tres grupos ($p=0.1$). Sí se observaron diferencias en el número de neutrófilos entre las tres ramas ($p=0.016$), detectando que en el análisis post-hoc que eran los ratones infundidos con CSM fucosiladas los que presentaban mayores cifras con respecto a los infundidos con SSF ($p<0.05$). No se observaron diferencias entre los tres grupos con respecto al recuento absoluto de linfocitos ($p=0.74$), monocitos ($p=0.09$), eosinófilos ($p=0.28$). No se detectaron basófilos en ninguna determinación y el test no pudo ser aplicado.

Tabla 34. Parámetros hemáticos de sangre intracardiaca en ratones NOD/SCID estratificados por rama de tratamiento (n=27).

	CSM FUCO (n=9)	CSM (n=14)	SSF (n=4)	p
Hb (g/L)	161 [149-188]	150 [132-163]	109 [105-125]	0.02
Plaquetas ($\times 10^9$ /L)	934 [797-1292]	1120 [896-1610]	886 [660-1885]	0.54
Leucocitos ($\times 10^9$ /L)	1.38 [1.14-3.87]	1.26 [0.99-2]	0.89 [0.7-1.1]	0.1
Neutrófilos ($\times 10^9$ /L)	0.83 [0.56-2.63]	0.48 [0.25-1.53]	0.2 [0.12-0.3]	0.016
Linfocitos ($\times 10^9$ /L)	0.65 [0.51-1.14]	0.58 [0.43-0.84]	0.53 [0.42-0.81]	0.74
Monocitos ($\times 10^9$ /L)	0.02 [0-0.07]	0.02 [0.02-0.03]	0 [0-0.01]	0.09
Eosinófilos ($\times 10^9$ /L)	0.02 [0.01-0.1]	0.03 [0.02-0.07]	0.07 [0.06-0.09]	0.28
Basófilos ($\times 10^9$ /L)	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	NA

CSM FUCO: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; CSM: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; SSF 0.9%: Suero salino fisiológico al 0.9%; p (valor p).

7.4.- PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.

La mediana y RIC de los parámetros bioquímicos en suero, incluyendo función hepática y metabolismo de calcio y fósforo de los ratones sacrificados de los tres brazos durante el período de evaluación de toxicidad crónica se pueden observar en la tabla 35. No se observaron diferencias entre los tres grupos con respecto a los niveles en suero de glucosa ($p=0.99$), urea ($p=0.71$), creatinina ($p=1$), calcio ($p=0.99$) ni fósforo ($p=0.85$). Si observamos una diferencia significativa en los niveles de GOT entre los tres grupos ($p=0.03$). En el análisis post-hoc se comprobó que los ratones infundidos con CSM fucosiladas presentaba una mayor cifra de GOT con respecto a los infundidos con células sin fucosilar pero no con respecto a salino. No se observaron diferencias en los niveles de GPT entre los tres grupos pero con un valor de p cercano a la significación ($p=0.06$). No observamos diferencias significativas al estratificar el Índice de hemólisis de los sueros en función de la rama de tratamiento administrado ($p=0.08$), pero obteniendo un valor próximo a la significación. Por medio del coeficiente de correlación de Pearson comprobamos que los valores de los índices de hemólisis tenían una correlación fuerte positiva con los valores de GOT ($r=0.88$, $p<0.0001$), estableciendo la siguiente ecuación de regresión: $y = 2.3525 + 32.1637 x$ con significación estadística ($p<0.001$) (gráfico 43). De igual forma los valores de GPT presentaban una correlación fuerte positiva con los índices de hemólisis ($r=0.86$, $p<0.0001$), estableciendo la siguiente ecuación de regresión: $y = x$ ($p < 0.0001$) con significación estadística ($p<0.0001$) (gráfico 44). No existió correlación entre los valores de hemólisis en los sueros y el resto de parámetros bioquímicos: glucosa ($p=0.79$), urea ($p=0.36$), calcio ($p=0.16$) y fósforo (0.6).

Tabla 35. Parámetros bioquímicos de sangre intracardíaca en ratones NOD/SCID estratificados por rama de tratamiento (n=27).

	CSM FUCO (n=9)	CSM (n=14)	SSF (n=4)	p
Glucosa (mg/dL)	340 [260-417]	335 [280-380]	340 [315-345]	0.99
Urea (mg/dL)	40 [40-42]	40 [40-50]	45 [40-50]	0.71
Creatinina (mg/dL)	< 0.2	< 0.2	< 0.2	1
GOT (UI/L)	560 [160-835]	125 [100-170]	220 [135-305]	0.03
GPT (UI/L)	70 [40-135]	30 [20-60]	50 [45-85]	0.06
Calcio (mg/dL)	9 [8.7-10]	9 [8-11]	9.5 [8.5-10]	0.99
Fósforo (mg/dL)	12 [11-13]	11 [9-13]	11.5 [8-15.5]	0.85
Índice de Hemólisis	16 [4-31.2]	6.5 [3-11]	2.5 [1.5-5.5]	0.08

CSM FUCO: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; CSM: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; SSF 0.9%: Suero salino fisiológico al 0.9%; p (valor p)

Gráfico 43. Análisis de regresión. Correlación entre valores de GOT (UI/L) e índices de hemólisis en los sueros (n=27).

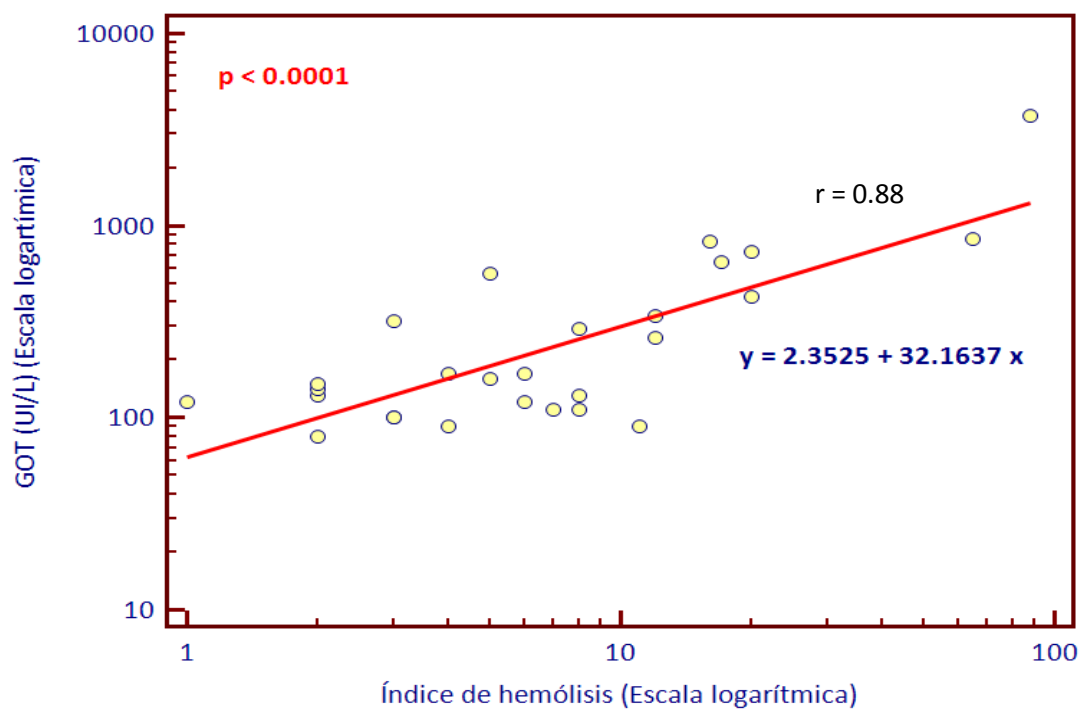
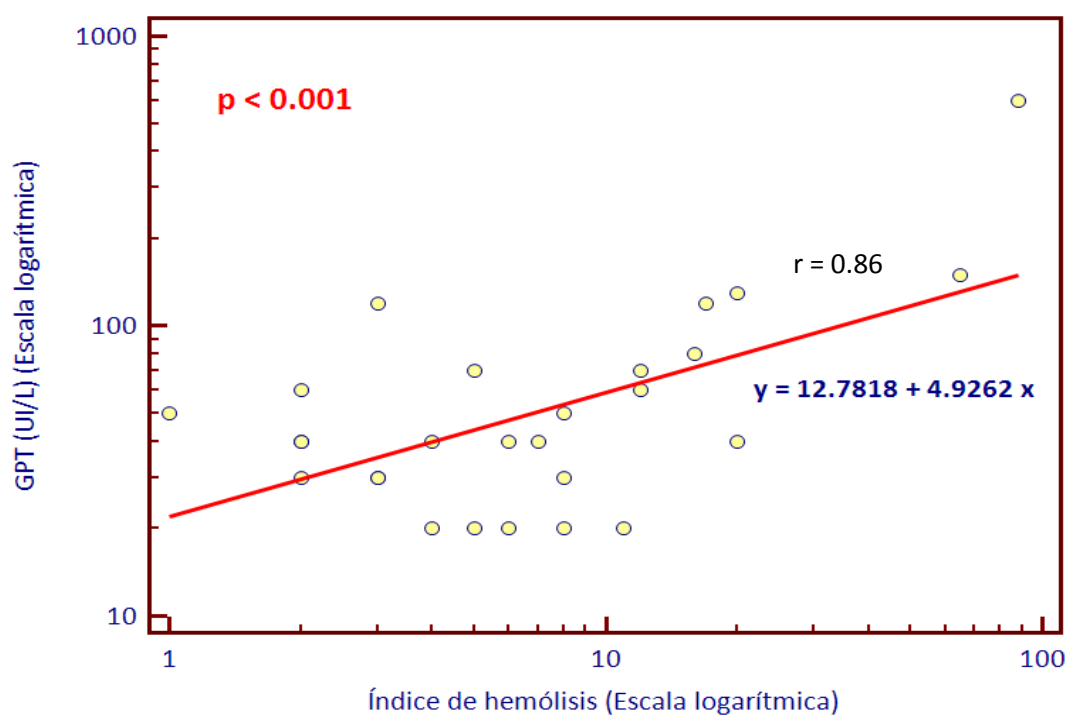


Gráfico 44. Análisis de regresión. Correlación entre valores de GPT (UI/L) e índices de hemólisis en los sueros (n=27).



7.5.- HISTOLOGÍA.

Fueron obtenidos el 100% de los órganos planteados en el 100% de los ratones NOD/SCID del estudio para evaluación histológica. Se observó algún tipo de alteración histológica (cambios no relacionados con los propios de la cepa NOD/SCID), considerando todos los órganos, en 2 de los 13 ratones NOD/SCID infundidos con Células Stem Mesenquimales fucosiladas (15.4%), en 6 de los 14 del brazo de CSM sin fucosilar (42.8%) y también en 1 de los 4 animales infundidos con SSF (25%) (tabla 36). Los ratones NOD/SCID no presentaron un mayor número de alteraciones histológicas en función del sexo ($p=0.44$) con independencia del producto infundido. En el 100% de los casos la alteración histológica observada en cada uno de los grupos se localizó en parénquima pulmonar y consistió en áreas muy localizadas de patrón intersticial pulmonar. No se constató un aumento estadísticamente significativo de reacciones adversas por histología en ninguna de las tres ramas del estudio ($p=0.28$) (tabla 37). Tampoco se objetivó un aumento significativo de reacciones adversas en los ratones que recibieron CSM fucosiladas o no con respecto a salino ($p=0.69$) (tabla 38). Comparando de forma independiente la rama de fucosilación no mostró una mayor incidencia de alteraciones histológicas que la rama de CSM sin fucosilar ($p=0.36$) y la de SSF ($p=1$). Esta diferencia tampoco se observó en la estratificación por sexo (tabla 38).

Tabla 36. Frecuencias de alteraciones histológicas detectadas en las ramas del estudio (n=31).

	Alteraciones por histología	
	NO	SÍ
CSM fucosiladas (n=13)	11	2
CSM (n=14)	8	6
SSF (n=4)	3	1

Tabla 37. Frecuencias de alteraciones histológicas detectadas estratificadas por rama del estudio y sexo (Test χ^2 y Test Exacto de Fisher). CSM: Células Stem Mesenquimales.

Producto infundido	Alteraciones por histología	p	Sexo	Alteraciones por histología	p
CSM fucosiladas (n=13)	2 (15.4%)	0.28	Machos (n=6)	0	0.46
			Hembras (n=7)	2	
CSM (n=14)	6 (42.8%)		Machos (n=9)	3	0.58
			Hembras (n=5)	3	
SSF (n=4)	1 (25%)		Machos (n=2)	1	1.0
			Hembras (n=2)	0	

Tabla 38. Frecuencias de alteraciones histológicas detectadas en las ramas del estudio (n=31).

	Nº de ratones con alteraciones histológicas (Hematoxilina-Eosina)	
	No	Sí
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas o no (n=27)	19	8
NOD/SCID infundidos con SSF (n=4)	3	1

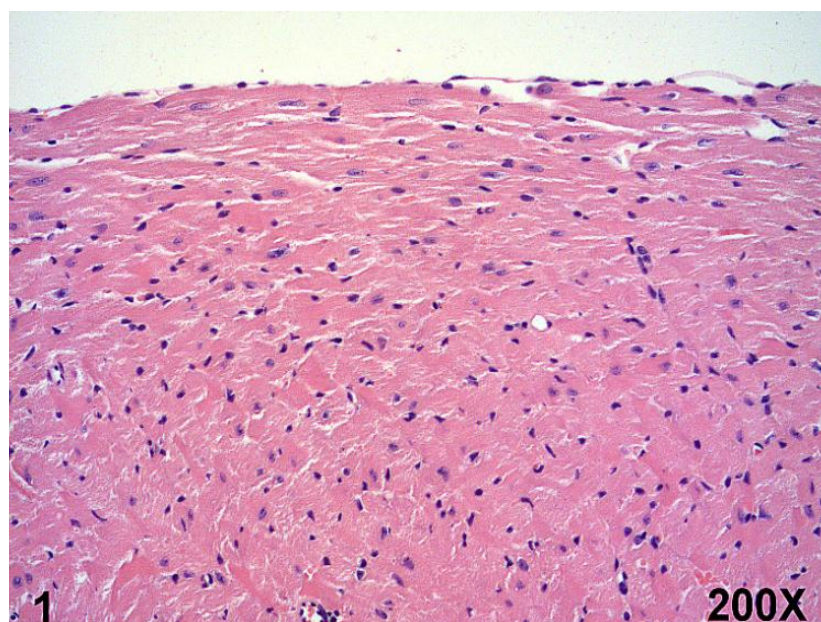
p = 0.69

En los siguientes apartados detallamos los hallazgos detectados en cada órgano y por rama de estudio.

7.5.1.- CORAZÓN.

No se observó ninguna alteración macro ni microscópica en ninguna de las ramas (fotografía 44).

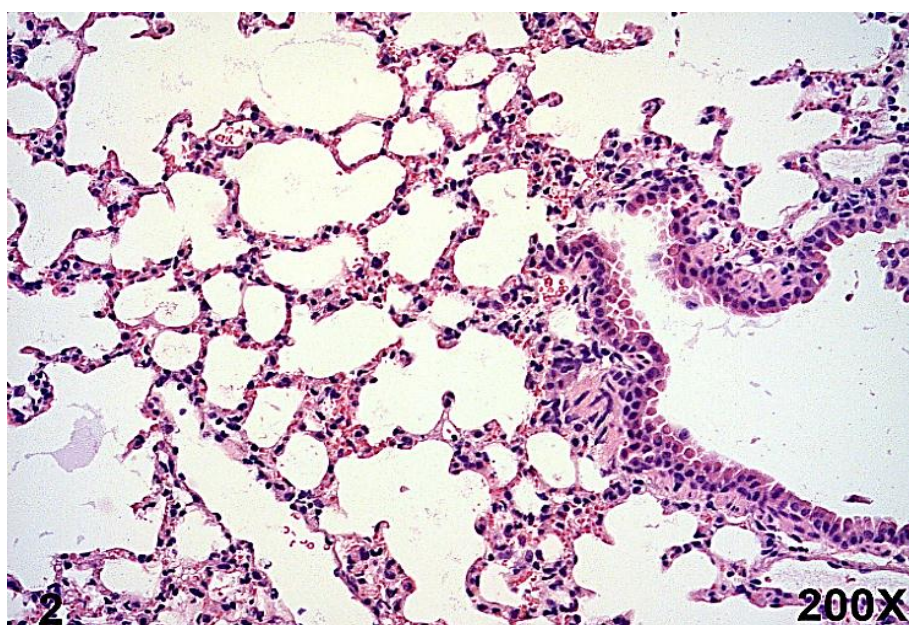
Fotografía 44. Sección de corazón de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina).
Histología normal



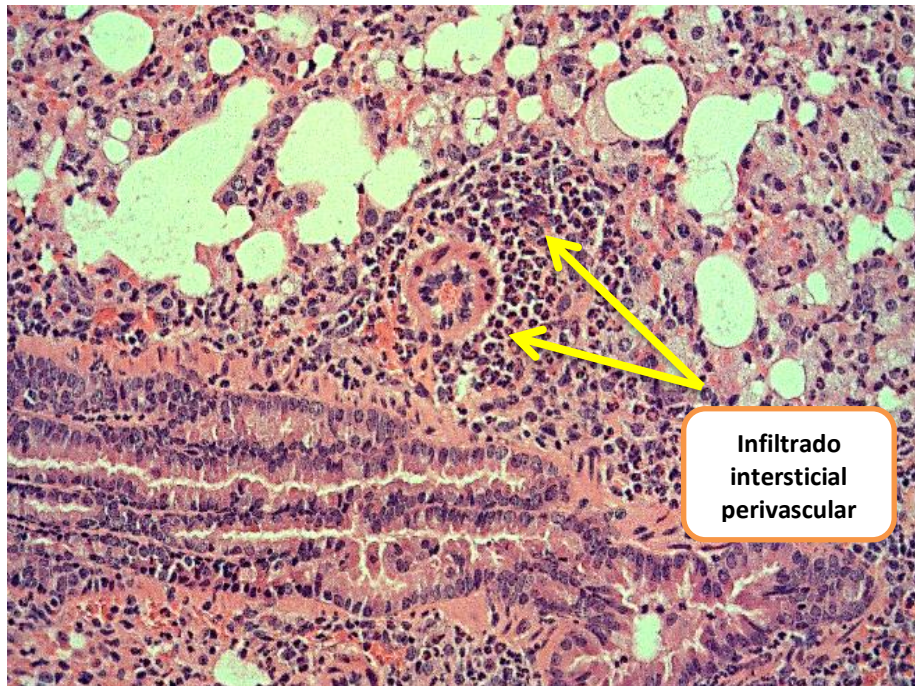
7.5.2.- PULMÓN.

La mayoría de los ratones sacrificados mostraron una histología pulmonar normal (fotografía 45). Cabe destacar que se detectaron áreas localizadas de patrón intersticial con infiltrado perivascular a expensas de polimorfonucleares neutrófilos (fotografías 46 y 47) en 6 de los 14 ratones NOD/SCID infundidos con Células Stem Mesenquimales sin fucosilar (42.8%), en 2 de los 13 ratones infundidos con CSM fucosiladas (15.3%) y también en 1 de los 4 animales infundidos con SSF (25%). En los ratones NOD/SCID estas alteraciones fueron observadas en uno de los ratones sacrificados en la 1ª semana postinfusión, en los 2 de la 5ª semana, en 1 de la 7ª semana, en 1 de la 9ª y en 2 de los 7 animales sacrificados en la 12ª semana tras la administración de las CSM fucosiladas.

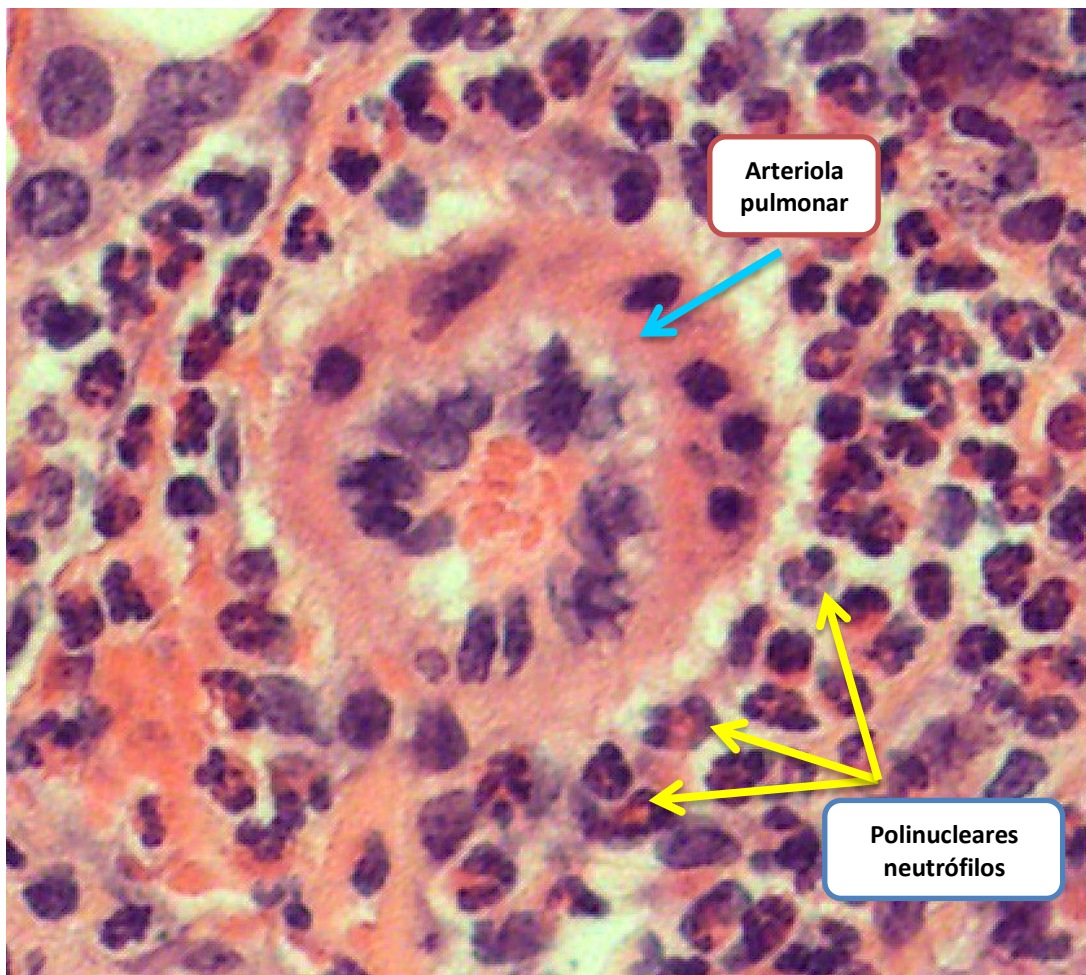
Fotografía 45. Sección de pulmón de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina). Histología normal.



Fotografía 46. Sección de pulmón de ratón NOD/SCID a 100x (Hematoxilina-Eosina).
Infiltrado intersticial perivascular



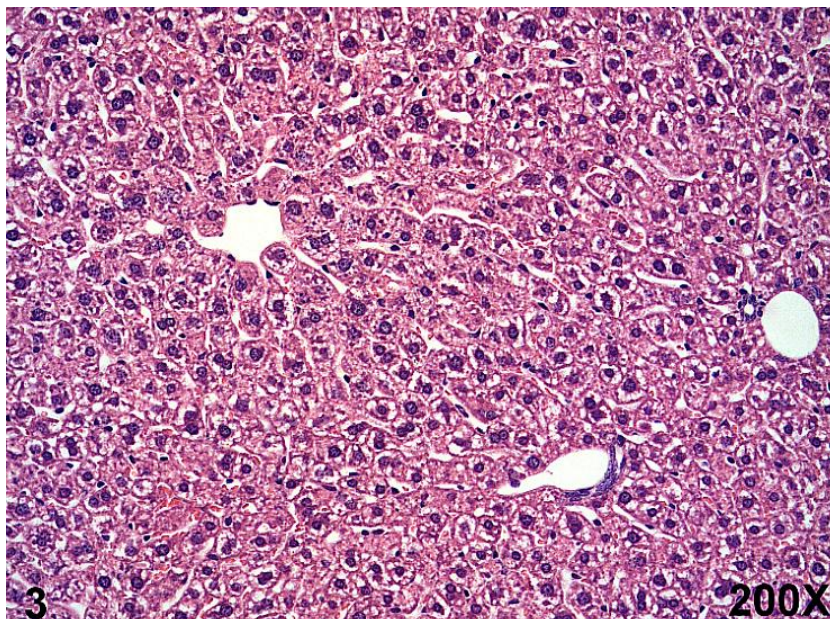
Fotografía 47. Sección de pulmón de ratón NOD/SCID a 800x (Hematoxilina-Eosina). Infiltrado intersticial perivascular a expensas de polimorfonucleares neutrófilos.



7.5.3.- HÍGADO.

La arquitectura y celularidad del hígado de los ratones NOD/SCID fue normal (fotografía 48).

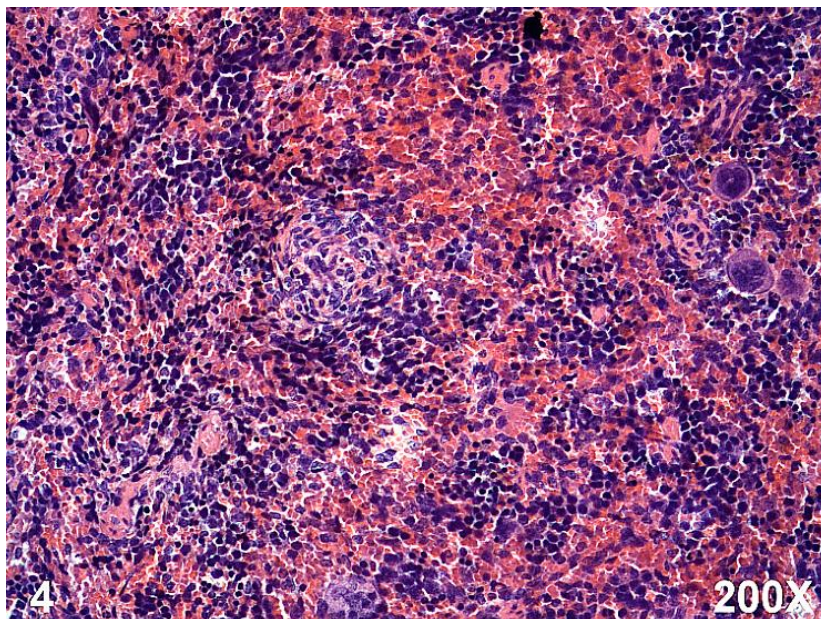
**Fotografía 48. Sección de hígado de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina).
Histología normal.**



7.5.4.- BAZO.

No se observó ninguna alteración macroscópica en ninguna de las ramas. Microscópicamente se observaron los hallazgos típicos de la cepa NOD/SCID ausencia de nódulos linfáticos o poco desarrollo de los mismos. La pulpa roja fue normal (fotografía 49). En uno de los roedores infundidos con CSM fucosiladas se observaron vainas linfoides periarteriales poco desarrolladas y en un ratón infundido con CSM sin fucosilar se objetivó la presencia de vainas linfoides.

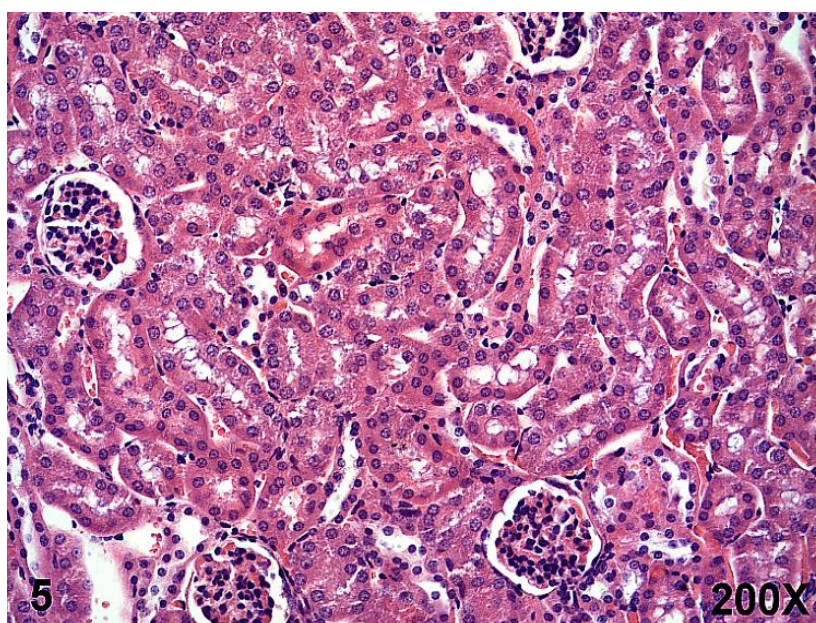
**Fotografía 49. Sección de bazo de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina).
Histología normal.**



7.5.5.- RIÑÓN.

No se observó ninguna alteración macro ni microscópica en ninguna de las ramas (fotografía 50).

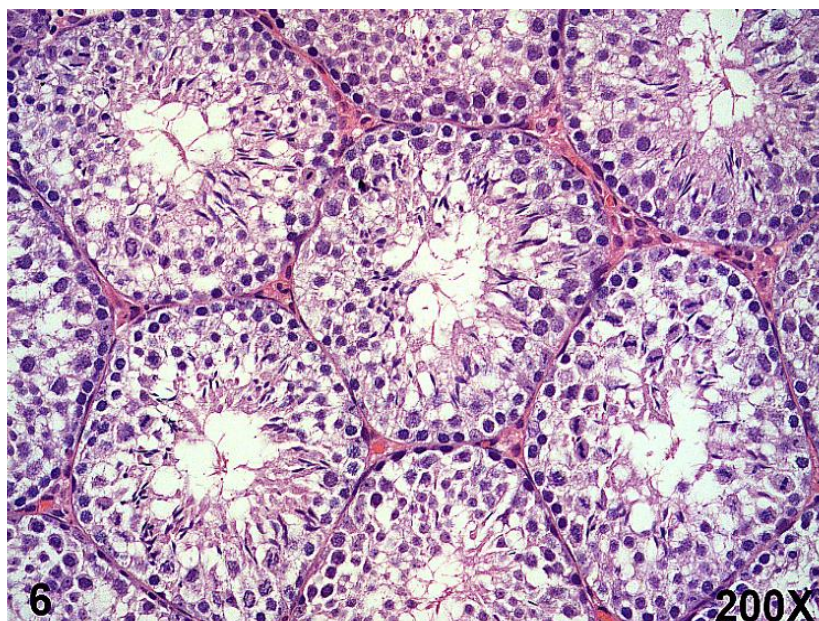
**Fotografía 50. Sección de riñón de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina).
Histología normal.**



7.5.6.- GÓNADAS.

No se objetivaron alteraciones ni en testículos (fotografía 51) ni en ovarios en ninguna de las ramas.

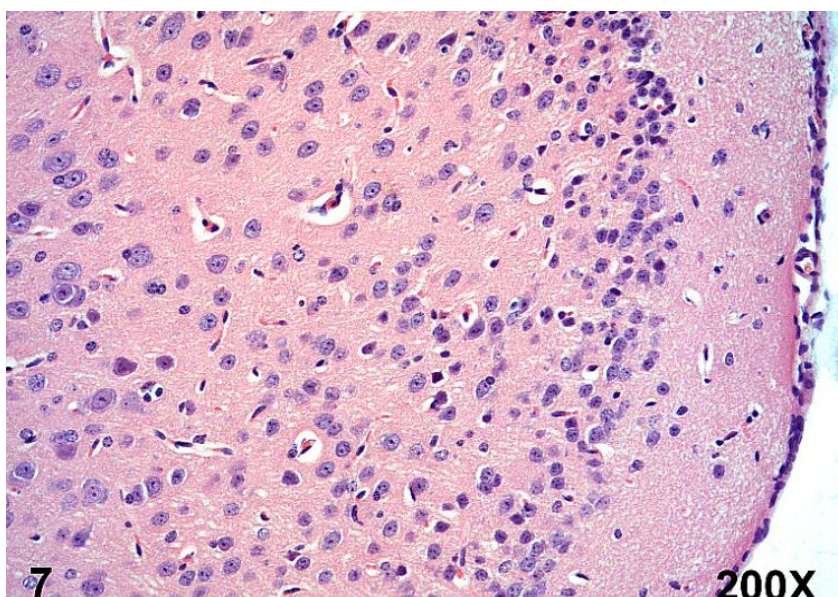
**Fotografía 51. Sección de testículo de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina).
Histología normal.**



7.5.7.- CEREBRO.

No se objetivaron alteraciones en todas las muestras de cerebros tomadas a los ratones NOD/SCID en ninguna rama (fotografía 52).

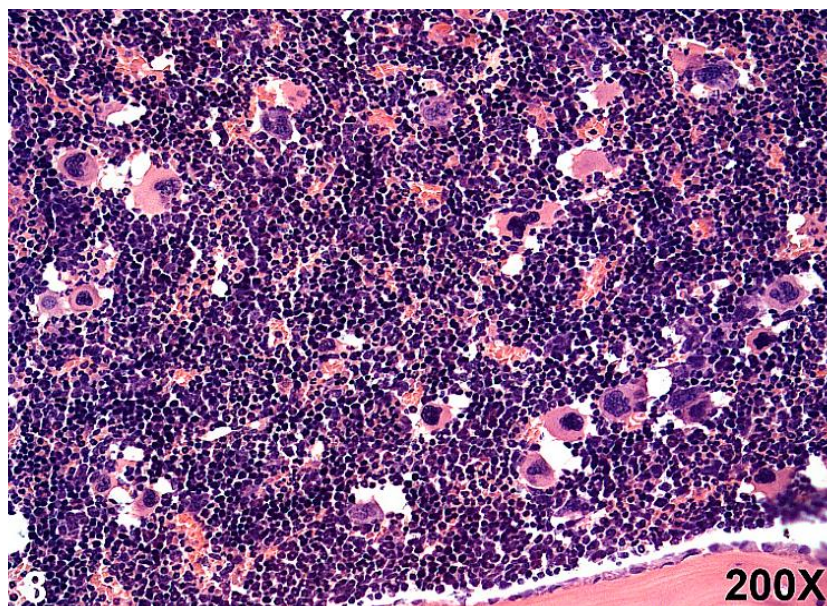
**Fotografía 52. Sección de testículo de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina).
Histología normal.**



7.5.8.- MÉDULA ÓSEA.

Las médulas óseas obtenidas de tibias de los ratones NOD/SCID sacrificados fueron normales en los tres grupos a estudio (fotografía 53).

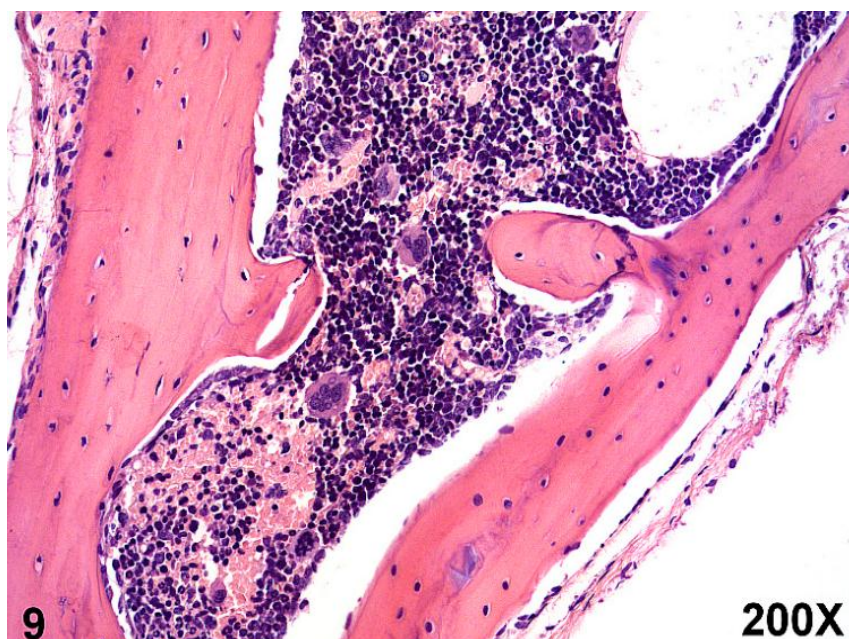
**Fotografía 53. Sección de médula ósea de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina).
Histología normal.**



7.5.9.- HUESO.

No objetivamos alteraciones histológicas en las tibias y calotas de los ratones sacrificados (fotografía 54).

**Fotografía 54. Sección de tibia de ratón NOD/SCID a 200x (Hematoxilina-Eosina).
Histología normal.**

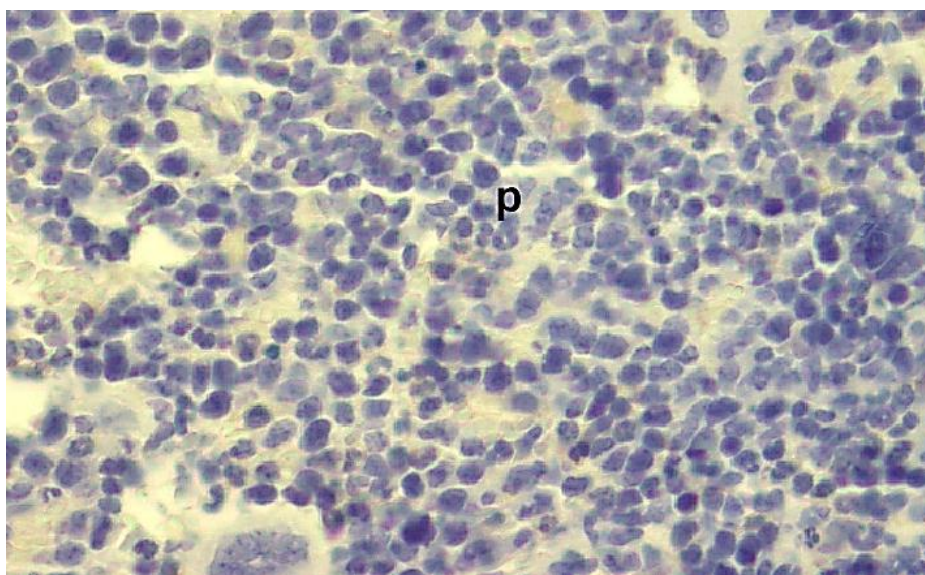


8.- ANÁLISIS DE EFICACIA DEL XENOTRASPLANTE: INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ANTI-OSTEOCALCINA HUMANA.

8.1.- ANÁLISIS CUALITATIVO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS EN HUESO MURINO MEDIANTE POSITIVIDAD INMUNOHISTOQUÍMICA PARA OSTEÓCALCINA HUMANA.

Se realizó estudio inmunohistoquímico, analizando la expresión de osteocalcina humana en calota y tibia de todos los ratones NOD/SCID del estudio. Se identificaron células positivas para osteocalcina en las 2 ramas del estudio en las que fueran infundidas, sin detectar células osteocalcina positivas en los animales infundidos con suero salino fisiológico (fotografía 55).

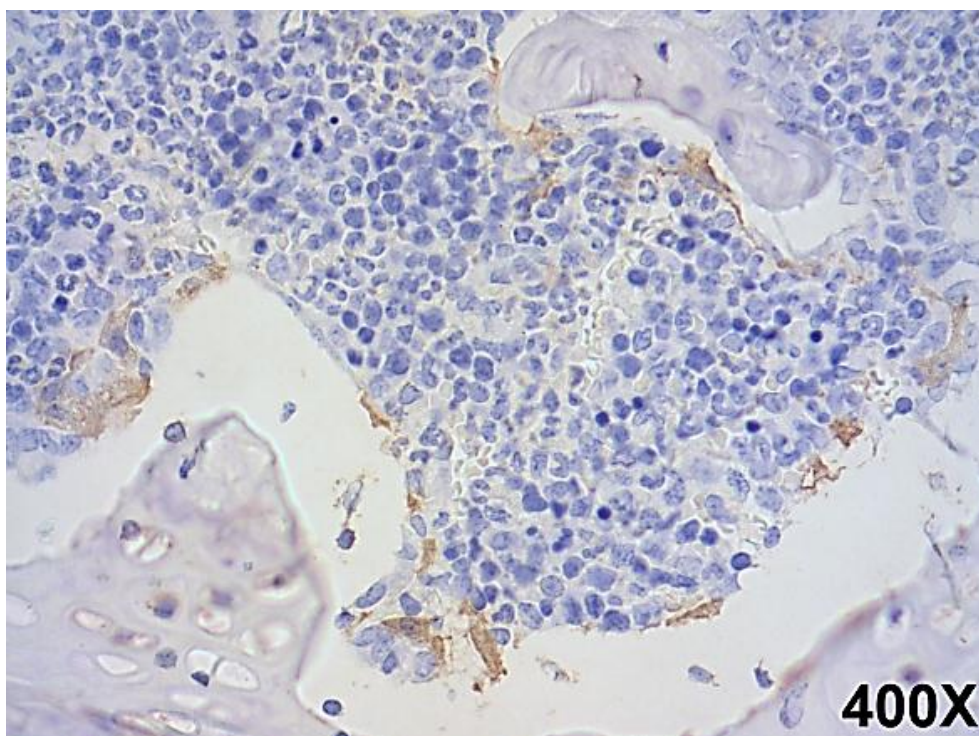
Fotografía 55. Sección de tibia con negatividad para anticuerpo antiosteocalcina humana en la 12ª semana postinfusión a 630x (Ratón 12n88 infundido con salino).



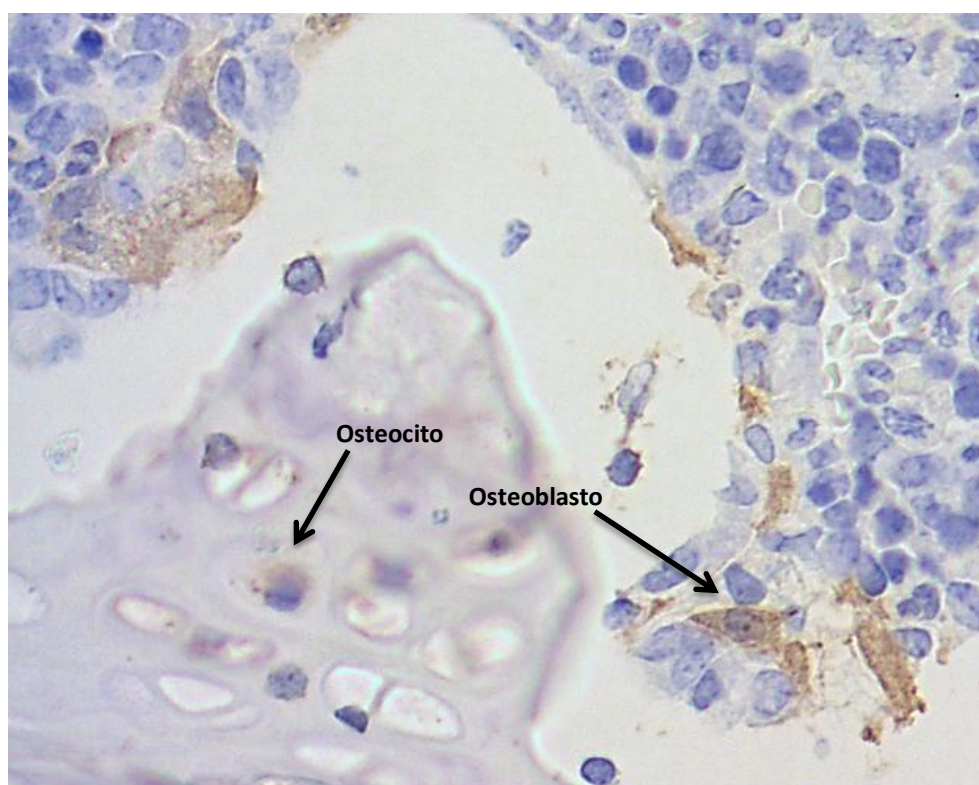
p: Polimorfonuclear neutrófilo.

Sólo en aquellos ratones infundidos con Células Stem Mesenquimales tanto fucosiladas como sin fucosilar se detectaron células mononucleadas en el estroma medular y osteoblastos en fase activa (células de morfología cuboide) y células osteoprogenitoras quiescentes (morfología cilíndrica baja) dispuestos en la capa epiteliode del frente de avance de ambos huesos (Fotografías 56, 57, 58, 59, 60 y 61).

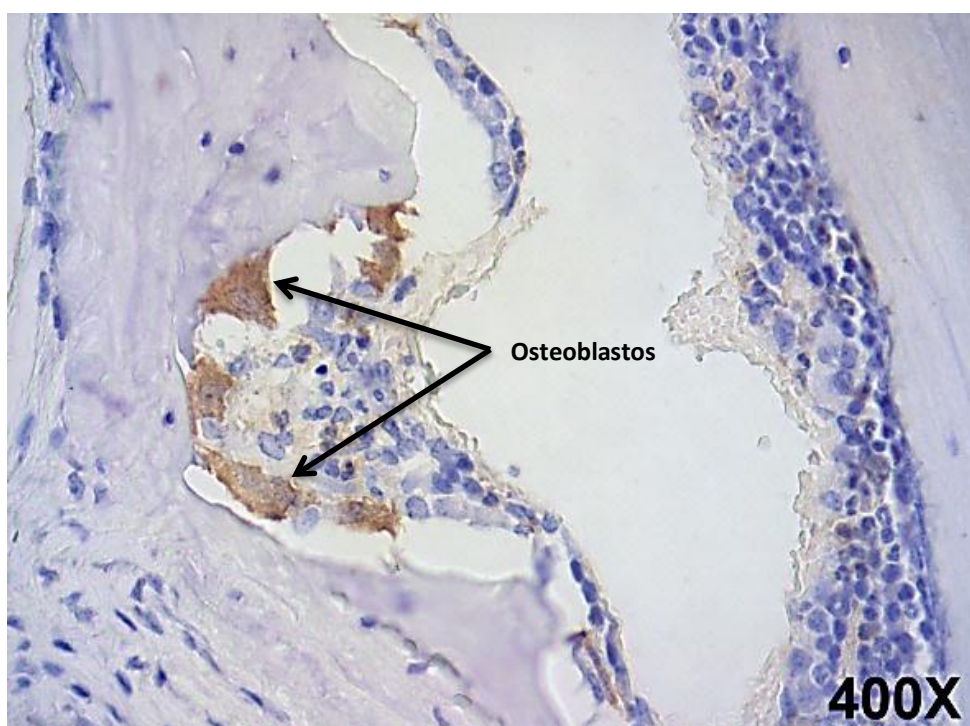
Fotografía 56. Sección ósea con osteoblastos y osteocitos osteocalcina humana positivos en la 2ª semana postinfusión a 400x.



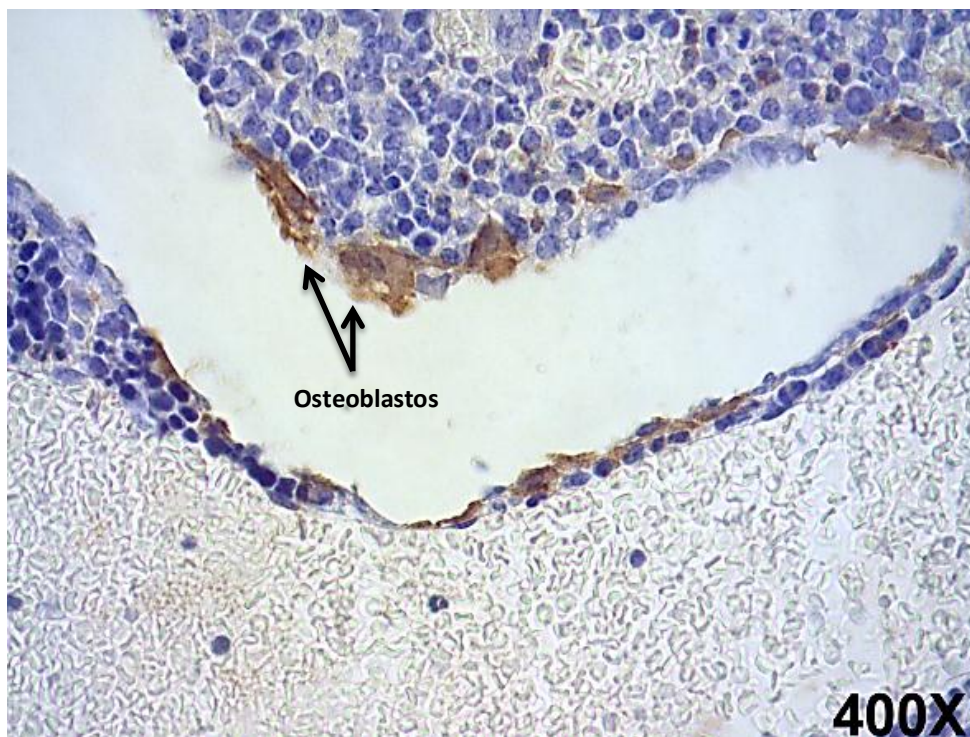
Fotografía 57. Sección ósea con osteoblastos y osteocitos osteocalcina humana positivos en la 2ª semana postinfusión a 630x.



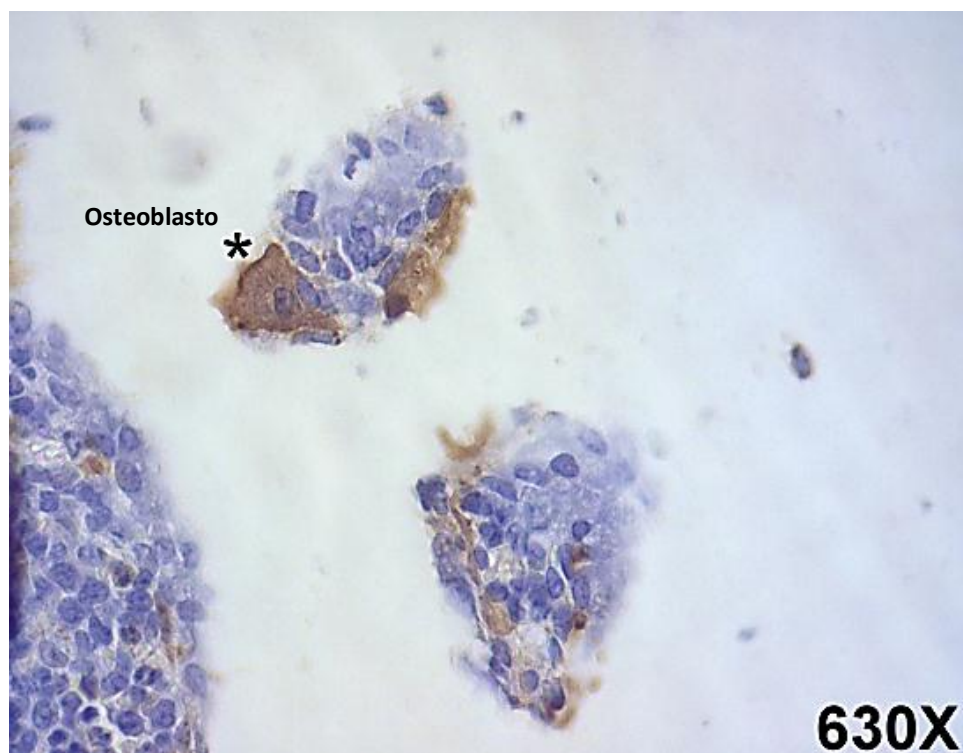
Fotografía 58. Sección ósea con osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 5ª semana postinfusión a 400x.



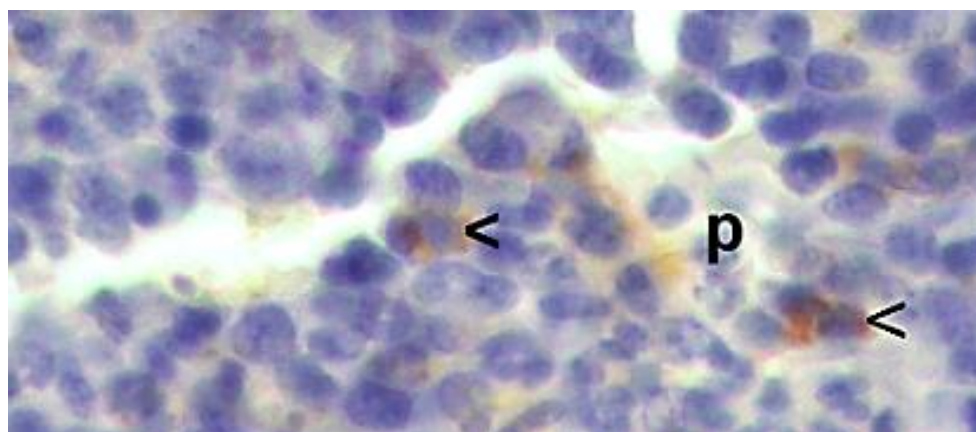
Fotografía 59. Sección ósea con osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión a 400x.



Fotografía 60. Sección ósea con osteoblasto osteocalcina humana positiva en la 12ª semana postinfusión a 630x.



Fotografía 61. Sección ósea con células mononucleadas osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión a 630x.



p: Polimorfonuclear neutrófilo. <: célula mononucleada osteocalcina positiva.

El número de ratones en cada rama en los que se identificaron células osteoblásticas positivas en tibia o en calota a la 12ª semana postinfusión se expone en la tabla 39. El 100% de los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas y el 62.5% de los infundidos con CSM sin fucosilar, evaluados en la 12ª semana postinfusión, mostraron osteoblastos humanos (Tabla 32). No se detectaron osteoblastos en los ratones infundidos con suero salino fisiológico. Observamos diferencias significativas en la expresión de osteocalcina humana en los distintos grupos ($p=0.01$).

Tabla 39. Frecuencia de ratones NOD/SCID con osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión estratificado por rama de tratamiento (n=17) (Test χ^2).

	Nº de ratones con osteoblastos humanos (osteocalcina POSITIVOS)	
	Sí	No
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas (n=5)	5	0
NOD/SCID infundidos con CSM sin fucosilar (n=8)	5	3
NOD/SCID infundidos con SSF (n=4)	0	4

p = 0.01

Una mayor proporción de ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas desarrollaron osteoblastos humanos con respecto a los inyectados con SSF ($p=0.008$), pero no con respecto a los infundidos con CSM sin fucosilar ($p=0.23$). De igual forma, tampoco objetivamos un porcentaje significativamente superior de ratones con osteoblastos humanos en la rama de mesenquimales sin fucosilar con respecto a los infundidos con SSF ($p=0.08$). La infusión de CSM (fucosiladas o no) se asoció a una mayor proporción de NOD/SCID con osteoblastos humanos con respecto a los del grupo de SSF (76.9% vs 0%) ($p=0.01$) (tabla 40).

Tabla 40. Frecuencia de ratones NOD/SCID con osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión tras agrupar ramas del estudio (infusión de células mesenquimales versus salino) (n=17) (Test Exacto de Fisher).

	Nº de ratones con osteoblastos humanos (osteocalcina POSITIVOS)	
	Sí	No
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas o no (n=13)	10	3
NOD/SCID infundidos con SSF (n=4)	0	4

p = 0.01

No es necesario analizar de forma independiente la expresión en tibia y calota de forma cualitativa puesto que todos los ratones que desarrollaban osteoblastos con osteocalcina humana positiva en uno, también la desarrollaba en el otro.

8.2.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS EN HUESO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ANTI-OSTEOCALCINA HUMANA.

También se evaluó además el número de osteoblastos humanos formados en cada una de las ramas para estudiar de forma cuantitativa la osteoblastogénesis inducida en cada grupo y el posible impacto de las células mesenquimales y la fucosilación. El número de osteoblastos absolutos identificados en 10 campos de gran aumento en tibia y en calota por cada ratón NOD/SCID en cada una de las ramas se expone en la tabla 41. Los valores descriptivos (mediana y rango intercuartílico) figuran en la tabla 42.

Tabla 41. Número de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión estratificada por ramas de tratamiento (n=17).

Número de osteoblastos humanos osteocalcina POSITIVOS por cada 10 campos 400x

	Código ratón	Tibia	Calota
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas (n=5)	12N90	6	5
	12N100	4	3
	12N101	25	18
	12N102	19	50
	12N103	18	14
NOD/SCID infundidos con CSM (n=8)	12N93	0	0
	12N94	0	0
	12N95	0	0
	12N96	4	1
	12N97	3	6
	12N98	9	3
	12N99	1	5
	12N104	24	7
NOD/SCID infundidos con SSF (n=4)	12N88	0	0
	12N89	0	0
	12N91	0	0
	12N92	0	0

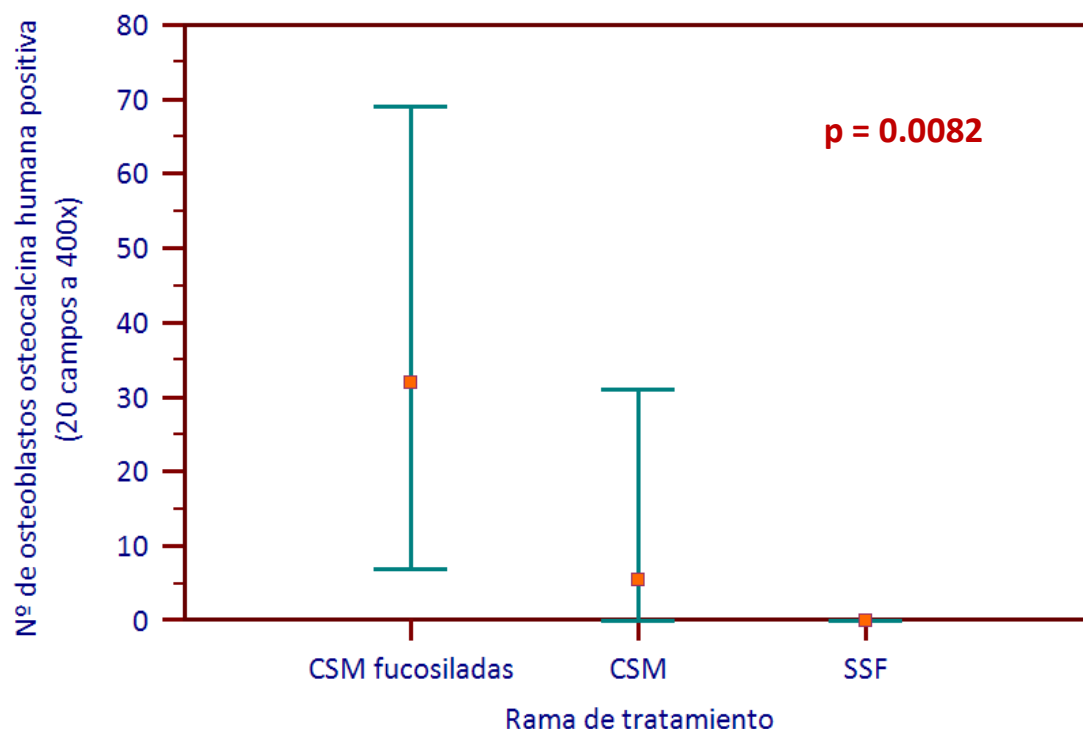
Considerando de forma global los 20 campos (tibia y calota) se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres brazos ($p=0.0082$) (tabla 42 y gráfico 45). En el análisis post-hoc se objetivo que fueron los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas los que presentaban mayor número de osteoblastos osteocalcina positivos que los ratones del brazo de CSM sin fucosilar y los de SSF ($p<0.05$ en ambos casos).

Tabla 42. Estadísticos descriptivos del número de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión estratificados por rama de tratamiento en 20 campos a 400x (n=17) (Test Kruskal-Wallis).

Osteoblastos humanos osteocalcina positivos en 20 campos a 400x		
	Mediana [RIC]	p
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas (n=5)	32 [10-49.5]	0.0082
NOD/SCID infundidos con CSM (n=8)	5.5 [0-10.5]	
NOD/SCID infundidos con SSF (n=4)	0 [0-0]	

CSM: Células Stem Mesenquimales; RIC: rango intercuartílico; SSF: suero salino fisiológico.

Gráfico 45. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión estratificada por rama de tratamiento (20 campos a 400x). CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: suero salino fisiológico. (n=17) (Test Kruskal-Wallis).



Al estratificar el número de osteoblastos osteocalcina positiva en función de la localización ósea también se observaron diferencias significativas en el número de osteoblastos absolutos identificados en 10 campos de gran aumento en tibia entre los 3 grupos del estudio ($p=0.01$) (tabla 43 y gráfico 46). En el análisis post-hoc se confirmó que fueron los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas los que presentaban mayor número de osteoblastos osteocalcina positivos, y que existía una diferencia significativa con respecto a los ratones del brazo de CSM sin fucosilar y los de SSF ($p<0.05$ en ambos casos). También evidenciamos diferente número de osteoblastos absolutos formados al evaluar 10 campos de gran aumento en las calotas de los 3 grupos del estudio ($p=0.01$) (tabla 43 y gráfico 47). De igual forma que en tibia, en el análisis post-hoc se confirmó que los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas presentaban un número de osteoblastos osteocalcina positivos significativamente superior a los ratones del brazo de CSM sin fucosilar y los de SSF ($p<0.05$ en ambos casos).

Tabla 43. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión estratificada por rama de tratamiento y localización ósea en 10 campos a 400x. CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: suero salino fisiológico (n=17) (U Mann Whitney).

Osteoblastos humanos osteocalcina positivos por cada 10 campos 400x				
	Mediana [RIC] Tibia	p	Mediana [RIC] Calota	p
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas (n=5)	18 [5.5-20.5]	0.01	14 [4.5-26]	0.01
NOD/SCID infundidos con CSM (n=8)	0 [0-6.5]		2 [0-5.5]	
NOD/SCID infundidos con SSF (n=4)	0 [0-0]		0 [0-0]	

Gráfico 46. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión en tibias de ratones NOD/SCID estratificada por rama de tratamiento (10 campos a 400x). CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: suero salino fisiológico. (n=17) (Test Kruskal-Wallis)

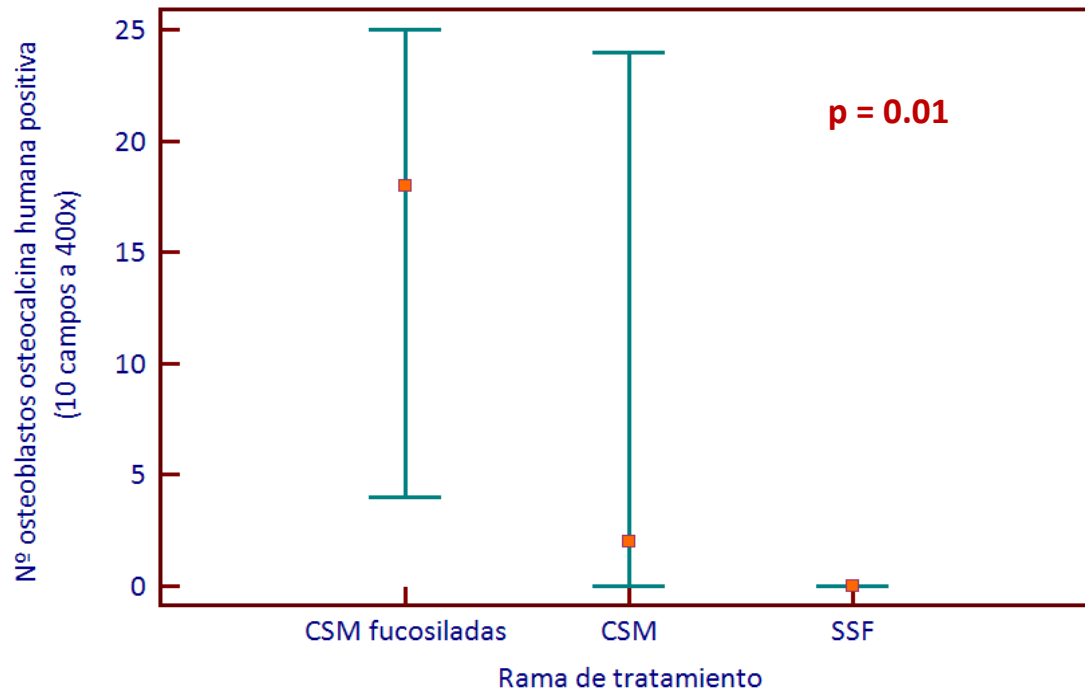
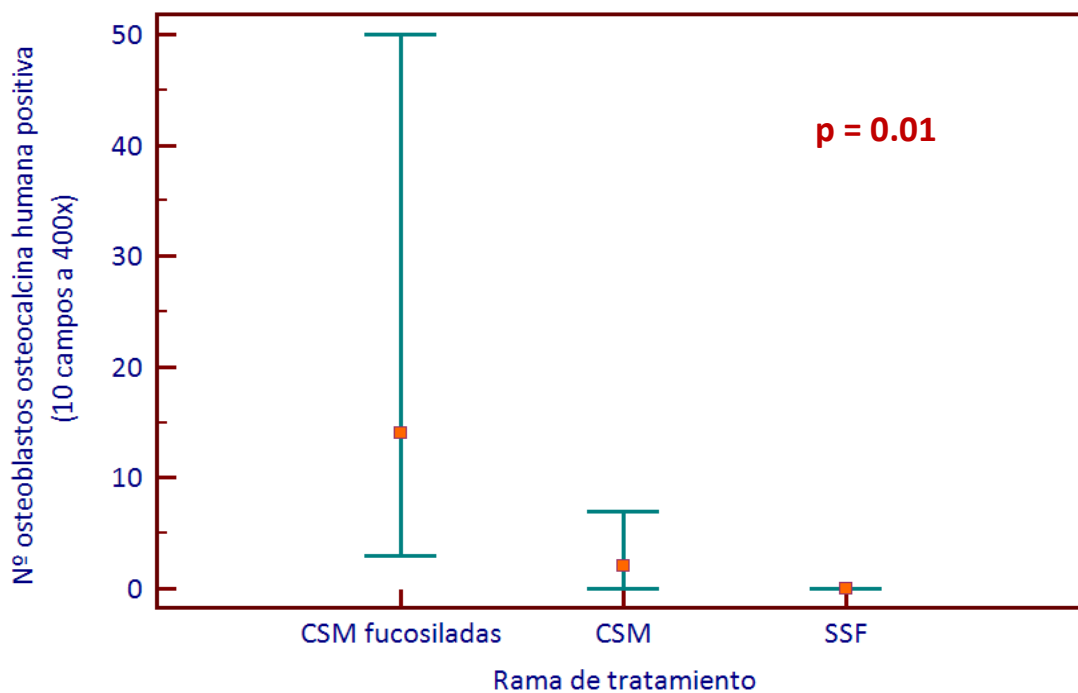


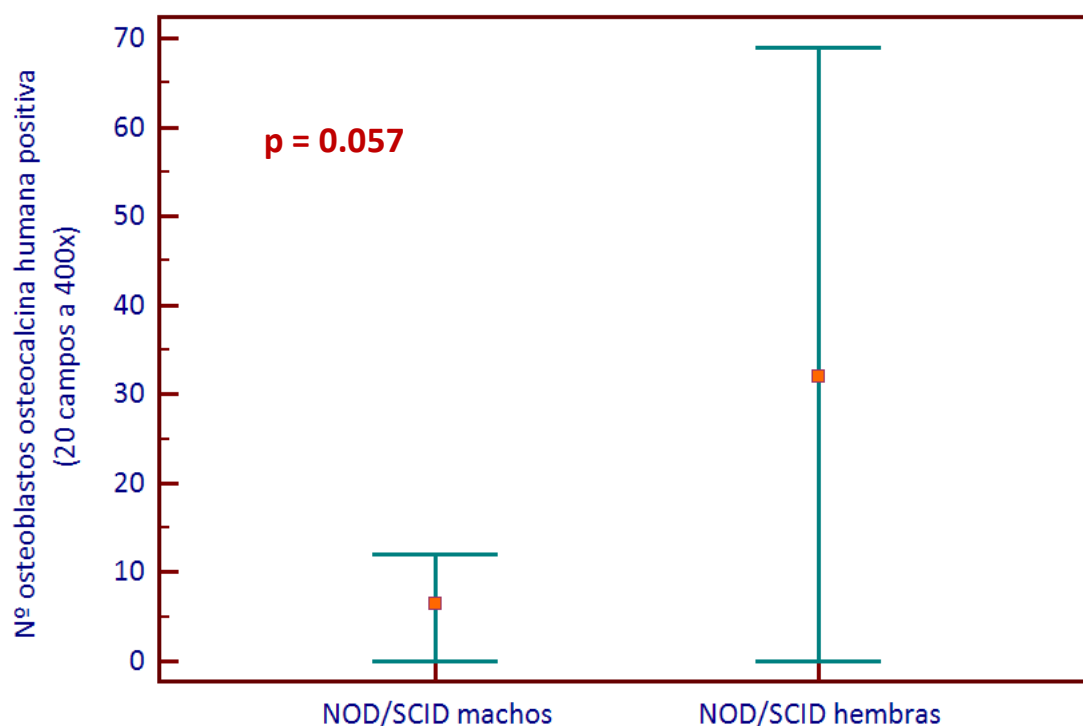
Gráfico 47. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión en calotas de ratones NOD/SCID estratificada por rama de tratamiento (10 campos a 400x). CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: suero salino fisiológico. (n=17)



No se identificó influencia de la localización ósea en la cantidad de osteoblastos osteocalcina positivos en los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas ($p=0.81$) de forma global. No existió relación entre el peso del animal y el número de osteoblastos formados ($p=0.4$). Al estratificar por sexo, tampoco observamos diferencias en la localización ósea en los machos ($p=0.83$) ni en las hembras ($p=0.46$).

A la 12ª semana no se objetivaron diferencias con respecto al número de osteoblastos formados en los animales infundidos con CSM en función del sexo ($p=0.057$) con una mediana en 20 campos a 400 aumentos 6.5 [2.5-10] en los machos y de 32 [23.2-49.5] en las hembras (gráfico 48).

Gráfico 48. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión en ratones NOD/SCID infundidos con Células Stem Mesenquimales estratificada por sexo considerando tibia y calota (20 campos a 400x) (*U Mann Whitney*).



8.2.1.- ANÁLISIS DE EFICACIA ESTRATIFICADO POR SEXO Y LOCALIZACIÓN ÓSEA.

Al estratificar por rama de tratamiento tampoco se observaron diferencias en cuanto a género. Los machos que recibieron células fucosiladas presentaron una mediana de osteoblastos considerando tibia y calota de 9 [7-11] mientras que en las hembras fue de 43 [34.7-62.5] ($p=0.08$) (gráfico 49). Los machos que recibieron células mesenquimales fucosiladas presentaron una mediana de osteoblastos considerando tibia de 5 [4-6] mientras que en las hembras fue de 19 [18.2-23.5] mientras que en calota fue de 4 osteoblastos cada 10 campos en los machos [3-5] y de 18 [15-42] en las hembras (tabla 44). Al estratificar los ratones infundidos con CSM fucosiladas en función de la localización ósea tampoco observamos diferencias en tibia ($p=0.08$) ni en calota ($p=0.08$) (tabla 44).

Gráfico 49. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión en ratones NOD/SCID infundidos con Células Stem Mesenquimales fucosiladas estratificada por sexo considerando tibia y calota (20 campos a 400x) (n=5) (U Mann Whitney).

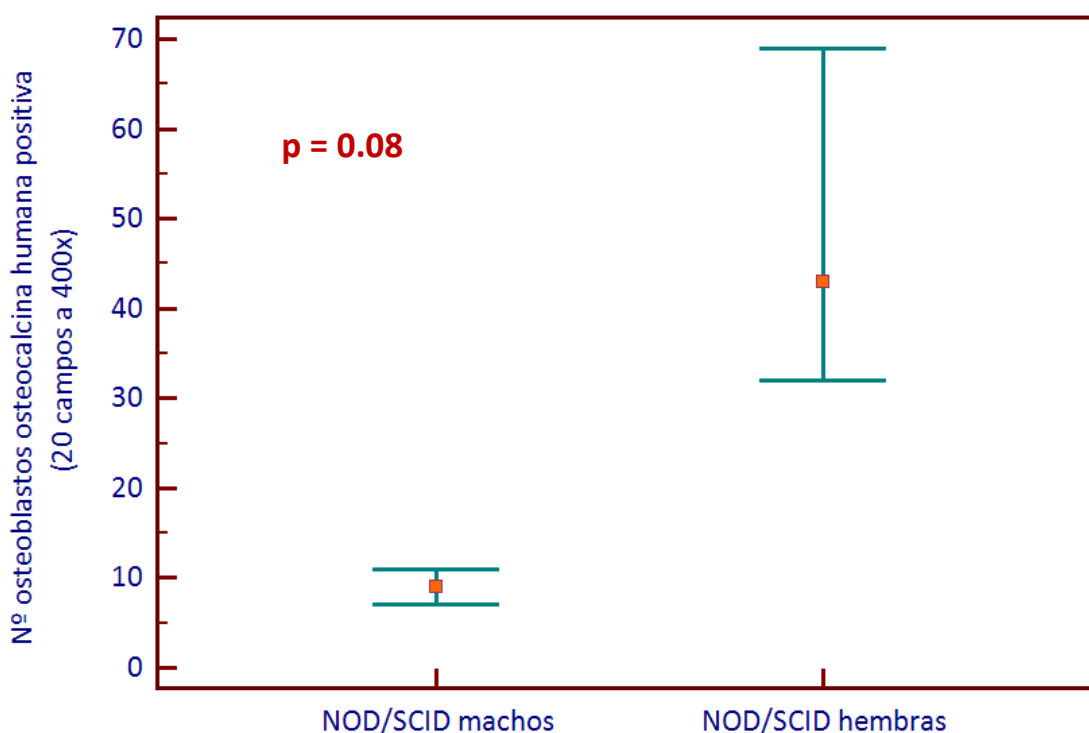


Tabla 44. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postinfusión en ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas estratificada por sexo y localización ósea en 10 campos a 400x (n=5) (U Mann Whitney).

Osteoblastos humanos osteocalcina positivos por cada 10 campos 400x en función del sexo y localización.

	Sexo	Mediana [RIC] Tibia	p	Mediana [RIC] Calota	p
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas (n=5)	Machos (n=2)	5 [4-6]	0.08	4 [3-5]	0.08
	Hembras (n=3)	19 [18.2-23.5]		18 [15-42]	

8.2.2.- ANÁLISIS DE EFICACIA ESTRATIFICADO POR SEMANAS.

En los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas sacrificados en los días 1º, 2º y en la 1ª semana postinfusión no se detectaron osteoblastos humanos. En los ratones infundidos con células fucosiladas se empezaron a detectar osteoblastos osteocalcina positivos a partir de la 5ª semana en ambos sexos tanto en tibia como en calota, objetivándose en el resto de ratones sacrificados hasta el final del estudio (5ª, 7ª y 12ª semana). En el control de ratones de infundidos con células sin fucosilar ya se observaban células en hueso a la 2ª semana. Sin embargo de ese tiempo no disponemos de sacrificios de ratones infundidos con células fucosiladas (tabla 45).

El número de osteoblastos osteocalcina humana positivos observados en 20 campos a un aumento de 400x en ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas en función de la semana de sacrificio se muestra en la tabla 46. En los gráficos 50 y 51 se puede observar la mediana de osteoblastos humanos por ratón sacrificado según la semana postinfusión de forma global y en función del sexo.

Para comprobar si existía un mayor número de osteoblastos osteocalcina positivos en fases más tardías desde la infusión de CSM fucosiladas, establecimos como punto inicial de corte la 7ª semana. Los ratones NOD/SCID sacrificados a partir de la 7ª semana, mostraron una mayor osteoblastogénesis humana que los sacrificados antes de ese período con medianas de osteoblastos osteocalcina positivos de 32 [10-49.5] versus 1[0-9] (p=0.018). El análisis de la mediana de osteoblastos osteocalcina positivos en función del tiempo postinfusión se expone en la tabla 47.

Tabla 45. Frecuencia de ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas que expresan osteocalcina humana distribuidos por semana de sacrificio (n=13).

	1º DÍA				2º DÍA				1ª SEMANA			
	Macho (n=1)		Hembra (n=1)		Macho (n=1)		Hembra (n=1)		Macho (n=1)			
	Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia		Calota	
NOD/SCID OSTEOCALCINA+	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
	5ª SEMANA				7ª SEMANA				12ª SEMANA			
	Hembra (n=1)				Macho (n=1)		Hembra (n=1)		Macho (n=2)		Hembra (n=3)	
	Tibia		Calota		Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia	Calota
NOD/SCID OSTEOCALCINA+	1		1		1	0	1	1	2	2	2	2

Tabla 46. Número de osteoblastos osteocalcina humana positiva en ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas distribuidos por semana de sacrificio (n=13) (10 campos a 400x).

	1º DÍA				2º DÍA				1ª SEMANA			
	Macho (n=1)		Hembra (n=1)		Macho (n=1)		Hembra (n=1)		Macho (n=1)			
	Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia		Calota	
Nº OSTEOBLASTOS OSTEOCALCINA+	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
	5ª SEMANA				7ª SEMANA				12ª SEMANA			
	Hembra (n=1)				Macho (n=1)		Hembra (n=1)		Macho (n=2)		Hembra (n=3)	
	Tibia		Calota		Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia	Calota	Tibia	Calota
Nº OSTEOBLASTOS OSTEOCALCINA+	1		8		2	0	3	10	10	8	62	50

Gráfico 50. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positiva en ratones NOD/SCID infundidos con CSM distribuida por semana de sacrificio (20 campos a 400x).

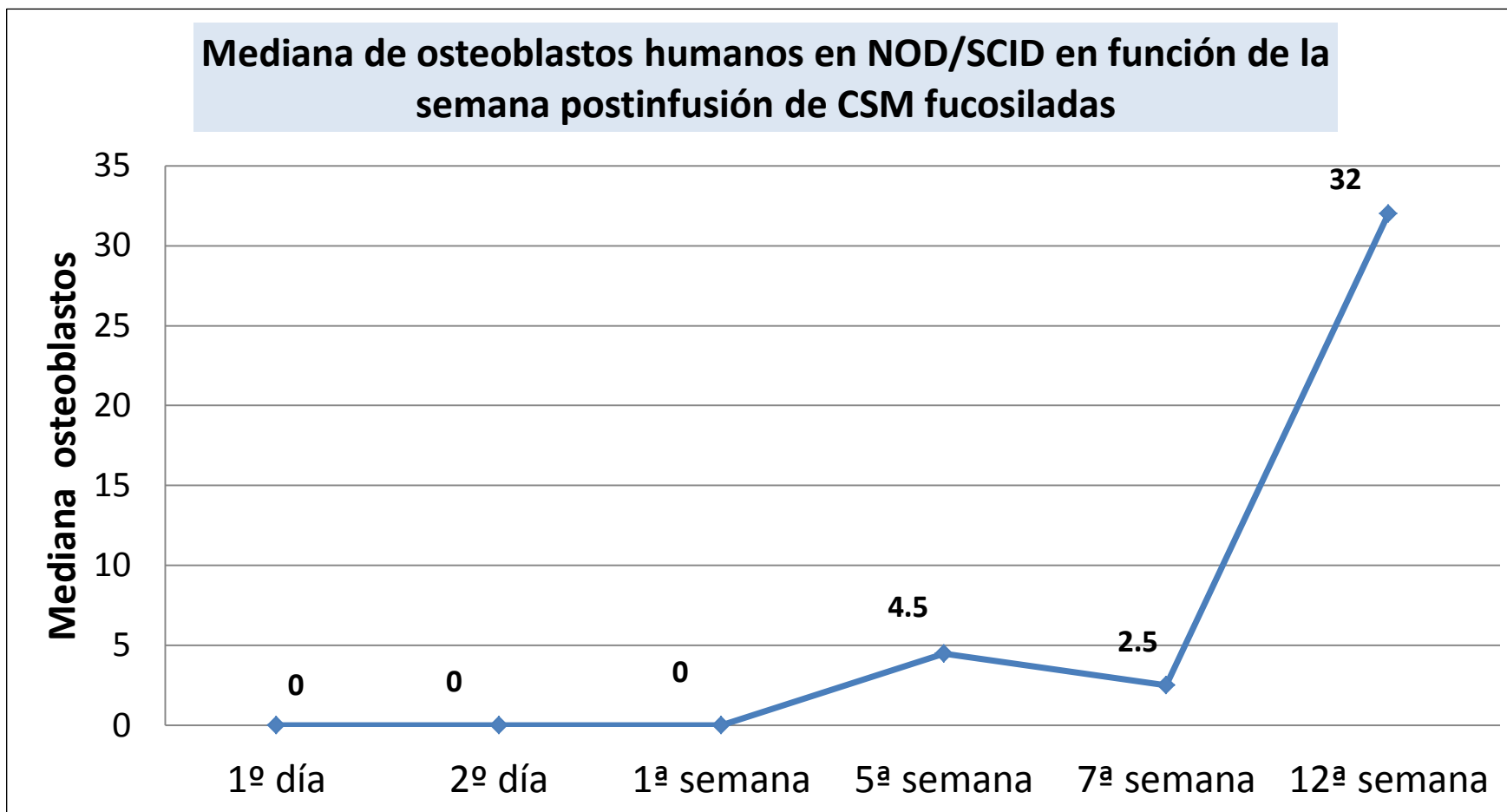


Gráfico 51. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positiva en ratones NOD/SCID infundidos con CSM distribuida por semana de sacrificio estratificada por sexo (20 campos a 400x).

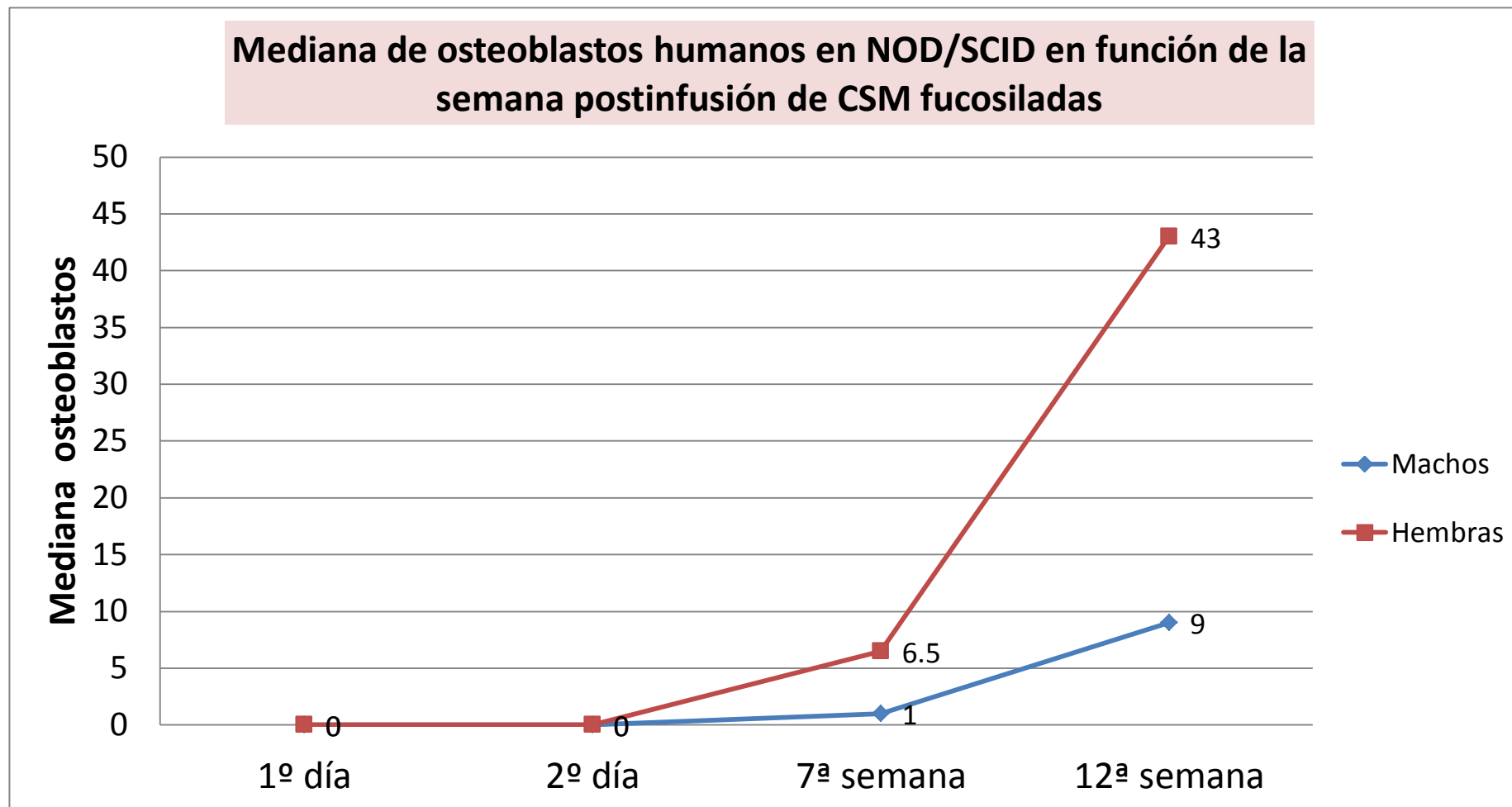


Tabla 47. Mediana de osteoblastos osteocalcina humana positiva en ratones NOD/SCID infundidos con CSM estratificada por semana de sacrificio (20 campos a 400x) (*U Mann Whitney*).

NÚMERO DE OSTEOLASTOS OSTEOLALCINA HUMANA POSITIVOS EN NOD/SCID INFUNDIDOS CON CSM FUCOSILADAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO POST-INFUSIÓN		
Punto de corte Tiempo post-infusión	Medianas [RIC]	p
> 7ª semana vs ≤ 7ª semana	32 [10-49.5] vs 1 [0-9]	0.018

9.- RESULTADOS DE BIODISTRIBUCIÓN. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA POR RETROTRANSCRIPCIÓN (qRT-PCR).

Fueron procesadas las muestras de todos los órganos seleccionados de todos los animales sacrificados, obteniendo material apropiado para la realización de la qRT-PCR en el 100% de los casos.

9.1.- qRT-PCR BETA-ACTINA MURINA.

El ARN mensajero (ARNm) de β -actina murina fue detectado en todas las muestras, objetivando amplificación del ADNc en el 100% de los casos. Los valores Crossing threshold (CT) obtenidos en la amplificación de este ARNm se exponen en la tabla 48.

Tabla 48. Valores de CT (Crossing Thershold) de amplificación de β -actina murina por qRT-PCR de los ratones NOD/SCID.

ID	SEXO	PRODUCTO	DÍA	VALORES CT (CROSSING THERESHOLD)							
				CORAZON	PULMÓN	HIGADO	BAZO	RIÑÓN	GÓNADAS	SNC	SP
12N60	MACHO	FUCO	1D	25.67	28.7	28.66	27.39	25.59	22.35	23.67	27.45
12N61	HEMBRA	FUCO	1D	24.69	29.98	33.72	34	26.44	25.68	24.99	26.61
12N62	MACHO	FUCO	2D	28.48	30.81	28.45	31.29	28.13	24.98	24.7	27.84
12N63	HEMBRA	FUCO	2D	29.11	30.5	28.09	30.2	26.77	23.91	25.31	26.9
12N70	MACHO	FUCO	1S	27.89	30.96	26.59	31.81	27.19	23.95	24.62	26.84
12N71	HEMBRA	MSCH	1S	27.83	30.76	26.92	32.54	27.04	24.06	23.97	28.14
12N72	HEMBRA	MSCH	2S	22.16	29.15	28.32	28.4	25.1	25.1	23.35	26.54
12N73	MACHO	MSCH	2S	23.3	30.29	34.92	34	25.86	23.19	24.15	28.12
12N78	HEMBRA	FUCO	5S	27.51	33.5	26.51	32.06	27.59	30.33	24.23	27.58
12N79	MACHO	MSCH	5S	27.22	31.17	26.53	32.43	27.52	24.15	24.15	26.53
12N82	MACHO	FUCO	7S	27.73	30.42	27.46	30.91	27.61	28.63	24.34	24.94
12N83	HEMBRA	FUCO	7S	27.63	32.4	28.11	33.53	27.1	23.6	25.05	26.45
12N86	MACHO	MSCH	9S	27.95	29.3	27.35	32.81	27.65	24.92	25.06	26.04
12N87	HEMBRA	MSCH	9S	29.31	30.79	29.02	33.14	26.82	24.69	24.65	26.32
12N88	MACHO	SSF	12S	23.34	29.7	29.82	34.58	25.29	23.5	27.06	26.87
12N89	MACHO	SSF	12S	27.3	31.41	28.03	32.93	28.16	24.87	25.04	28.05
12N90	MACHO	FUCO	12S	27.08	31.91	26.56	32.63	27.03	25.78	24.58	30.91
12N91	HEMBRA	SSF	12S	28.48	30.01	28.96	31.34	26.67	22.87	22.46	25.33
12N92	HEMBRA	SSF	12S	22.87	26.79	32.97	28.4	24.6	23.02	27	27.4
12N93	HEMBRA	MSCH	12S	23.75	27.95	30.09	28.27	24.41	28.78	27.4	29.53
12N94	MACHO	MSCH	12S	24.93	29.57	30.1	27.44	24.55	23.58	26.98	26.65
12N95	MACHO	MSCH	12S	27.41	30.55	28.53	27.47	27.21	23.86	23.64	25.4
12N96	MACHO	MSCH	12S	27.18	29	29.74	27.79	26.81	23.55	22.62	28.04
12N97	MACHO	MSCH	12S	27.78	29.85	29.74	27	27.75	23.63	24.06	24.8
12N98	MACHO	MSCH	12S	27.97	29.81	28.71	32.01	28.74	24.02	22.19	25.9
12N99	MACHO	MSCH	12S	27.98	30.07	28.34	31.39	27.23	22.65	23.73	27.72
12N100	MACHO	FUCO	12S	23.84	30.98	29.04	31.73	24.57	23.68	27.83	25.38
12N101	HEMBRA	FUCO	12S	27.37	29.02	27.4	31.69	27.28	22.05	24	25.68
12N102	HEMBRA	FUCO	12S	27.27	29.44	29.14	31.81	26.63	22.81	23.43	27.12
12N103	HEMBRA	FUCO	12S	26.85	30.19	29.03	32.16	25.66	22.16	22.93	25.57
12N104	HEMBRA	MSCH	12S	24.55	27.22	29.61	35.01	24.27	26.01	27.45	25.1

D: Día; DÍA: Día del sacrificio postinfusión; FUCO: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; ID: Número de identificación; MSCH: Células Stem mesenquimales; S: Semana; SNC: Sistema nervioso central; SP: Sangre periférica.

9.2.- qRT-PCR BETA-2-MICROGLOBULINA MURINA.

El ARN mensajero (ARNm) de β_2 -microglobulina murina fue detectado en todas las muestras, objetivando amplificación del ADNc en el 100% de los casos. Los valores Crossing thershold (CT) obtenidos en la amplificación de este ARNm se exponen en la tabla 49.

Tabla 49. Valores de CT (Crossing Thershold) de amplificación de β_2 -microglobulina murina por qRT-PCR de los ratones NOD/SCID.

ID	SEXO	PRODUCTO	DÍA	VALORES CT (CROSSING THERESHOLD)							
				CORAZON	PULMÓN	HIGADO	BAZO	RIÑÓN	GÓNADAS	SNC	SP
12N60	MACHO	FUCO	1D	27.89	32.11	26.41	24.91	26.98	24.59	28.11	27.45
12N61	HEMBRA	FUCO	1D	26.73	31.39	36.79	37.09	27.46	25.61	27.49	26.61
12N62	MACHO	FUCO	2D	28.55	31.73	25.75	33.89	28.3	27.35	28.01	29.18
12N63	HEMBRA	FUCO	2D	28.63	31.42	26.25	33.26	26.43	25.08	27.79	28.07
12N70	MACHO	FUCO	1S	27.98	32.03	25.02	33.71	28	27.15	28.46	27.98
12N71	HEMBRA	MSCH	1S	26.87	30.56	24.62	33.21	27.07	24.93	27.3	27.23
12N72	HEMBRA	MSCH	2S	24.4	30.27	25.86	26.14	25.45	33.08	27.21	26.54
12N73	MACHO	MSCH	2S	25.09	31.93	35.85	35.56	26.8	26.8	28.05	28.12
12N78	HEMBRA	FUCO	5S	25.34	34.17	25.38	34.19	26.53	32.07	27.13	26.96
12N79	MACHO	MSCH	5S	25.84	32.27	25.69	33.17	27.15	27.69	27.47	25.9
12N82	MACHO	FUCO	7S	24.45	30.62	27.06	32.23	25.84	29.76	27.42	23.76
12N83	HEMBRA	FUCO	7S	26.22	32.75	27.36	35.3	26.94	25.82	28.6	25.9
12N86	MACHO	MSCH	9S	26.82	29.02	27.42	35.21	27.63	27.5	28.63	25.84
12N87	HEMBRA	MSCH	9S	27.43	31.7	28.24	35.21	26.53	25.83	27.75	26.03
12N88	MACHO	SSF	12S	25.25	31.28	27.32	36.23	26.67	27.45	27.06	27.91
12N89	MACHO	SSF	12S	25.48	31.75	25.14	36.49	28.23	27.44	27.33	27.79
12N90	MACHO	FUCO	12S	26.21	32.71	25.11	34.4	27.19	28.54	28.11	30.93
12N91	HEMBRA	SSF	12S	26.21	30.52	31.84	31.81	26.2	24.7	27.25	27.09
12N92	HEMBRA	SSF	12S	24.93	28.68	29.56	29.09	24.93	25.04	27	28.64
12N93	HEMBRA	MSCH	12S	26.38	30.22	27.91	28.07	25.09	31.41	27.4	31.26
12N94	MACHO	MSCH	12S	25.91	30.88	27.5	27.65	25.7	27.24	26.98	27.72
12N95	MACHO	MSCH	12S	25.21	30.93	28.5	28.5	27.3	27.27	28.01	26.65
12N96	MACHO	MSCH	12S	24.81	28.74	29.29	29.29	26.67	26.8	26.79	29.16
12N97	MACHO	MSCH	12S	25.19	30.73	28.11	28.11	27.22	27.09	28.57	26.17
12N98	MACHO	MSCH	12S	25.58	30.18	31.83	31.83	28.82	27.7	26.23	27.69
12N99	MACHO	MSCH	12S	25.43	30	31.77	31.77	26.62	24.44	27.75	28.58
12N100	MACHO	FUCO	12S	25.46	32.73	26.79	32.54	32.54	27.7	27.83	26.23
12N101	HEMBRA	FUCO	12S	25.57	30.14	31.98	31.98	26.38	24.25	27.84	26.94
12N102	HEMBRA	FUCO	12S	25.78	30.36	31.86	31.86	25.87	24.96	27.44	27.9
12N103	HEMBRA	FUCO	12S	26.45	30.62	31.79	31.79	24.65	24.42	27.1	27.03
12N104	HEMBRA	MSCH	12S	26.43	28.26	27.05	35.91	24.52	26.94	27.45	25.97

D: Día; DÍA: Día del sacrificio postinfusión; FUCO: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; ID: Número de identificación; MSCH: Células Stem mesenquimales; S: Semana; SNC: Sistema nervioso central; SP: Sangre periférica.

9.3.- qRT-PCR BETA-ACTINA HUMANA.

El ARN mensajero (ARNm) de β -actina humana fue detectado en 2 muestras analizadas, objetivando amplificación del mismo. Una de las dos muestras positivas pertenecía a la muestra tomada de los pulmones de una hembra infundida con Células Stem Mesenquimales sin fucosilar y sacrificada en la 12ª semana postinfusión (código: 12N104). La otra muestra con amplificación de ARNm de β -actina humana correspondió a la muestra de bazo de una hembra infundida con Células Stem Mesenquimales fucosiladas y sacrificada en el 1º día tras la infusión (código: 12N61).

En la tabla 50 se pueden observar los resultados de PCR para β -actina humana en todos los órganos analizados. En caso de no amplificación por encima del valor CT el resultado en la tabla figura como negativo mientras que en caso de amplificación del ARNm colocamos el valor CT en la casilla correspondiente.

Tabla 50. Resultados de qRT-PCR de amplificación de β -actina humana en los diferentes órganos de ratones NOD/SCID del estudio y los valores CT (Crossing Thershold) en caso de amplificación significativa.

ID	SEXO	PRODUCTO	DÍA	VALORES CT (CROSSING THERESHOLD)							
				CORAZON	PULMÓN	HIGADO	BAZO	RIÑÓN	GÓNADAS	SNC	SP
12N60	MACHO	FUCO	1D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N61	HEMBRA	FUCO	1D	NEG	NEG	NEG	36.24	NEG	NEG	NEG	NEG
12N62	MACHO	FUCO	2D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N63	HEMBRA	FUCO	2D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N70	MACHO	FUCO	1S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N71	HEMBRA	MSCH	1S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N72	HEMBRA	MSCH	2S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N73	MACHO	MSCH	2S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N78	HEMBRA	FUCO	5S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N79	MACHO	MSCH	5S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N82	MACHO	FUCO	7S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N83	HEMBRA	FUCO	7S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N86	MACHO	MSCH	9S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N87	HEMBRA	MSCH	9S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N88	MACHO	SSF	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N89	MACHO	SSF	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N90	MACHO	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N91	HEMBRA	SSF	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N92	HEMBRA	SSF	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N93	HEMBRA	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N94	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N95	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N96	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N97	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N98	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N99	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N100	MACHO	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N101	HEMBRA	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N102	HEMBRA	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N103	HEMBRA	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N104	HEMBRA	MSCH	12S	NEG	29.95	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

D: Día; DÍA: Día del sacrificio postinfusión; FUCO: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; ID: Número de identificación; MSCH: Células Stem mesenquimales; NEG: Negativo; S: Semana; SNC: Sistema nervioso central; SP: Sangre periférica.

9.4.- qRT-PCR BETA-2-MICROGLOBULINA HUMANA.

El ARN mensajero (ARNm) de β_2 -microglobulina humana fue detectado en 3 muestras analizadas, objetivando amplificación del mismo. Una de las tres muestras positivas pertenecía a la muestra tomada de los pulmones de una hembra infundida con Células Stem Mesenquimales sin fucosilar y sacrificada en la 12ª semana postinfusión (código: 12N104). En el segundo caso se detectó amplificación en la muestra de ovario de una hembra infundida con Células Stem Mesenquimales no fucosiladas y sacrificada en la 12ª semana tras la infusión (código: 12N93). Por último se constató amplificación en la muestra de cerebro de una hembra infundida con Células Stem Mesenquimales fucosiladas y sacrificada en el 2º día post-infusión (código: 12N63).

En la tabla 51 se pueden observar los resultados de PCR para β_2 -microglobulina humana en todos los órganos analizados y el valor CT en caso de amplificación del ARNm. En caso de no amplificación por encima del valor CT el resultado en la tabla figura como negativo mientras que en caso de amplificación del ARNm colocamos el valor CT en la casilla correspondiente.

Tabla 51. Resultados de qRT-PCR de amplificación de β_2 -microglobulina humana en los diferentes órganos de ratones NOD/SCID del estudio y los valores CT (Crossing Therseshold) en caso de amplificación significativa.

ID	SEXO	PRODUCTO	DÍA	VALORES CT (CROSSING THERESHOLD)							
				CORAZON	PULMÓN	HIGADO	BAZO	RIÑÓN	GÓNADAS	SNC	SP
12N60	MACHO	FUCO	1D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N61	HEMBRA	FUCO	1D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N62	MACHO	FUCO	2D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N63	HEMBRA	FUCO	2D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	37.33	NEG
12N70	MACHO	FUCO	1S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N71	HEMBRA	MSCH	1S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N72	HEMBRA	MSCH	2S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N73	MACHO	MSCH	2S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N78	HEMBRA	FUCO	5S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N79	MACHO	MSCH	5S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N82	MACHO	FUCO	7S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N83	HEMBRA	FUCO	7S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N86	MACHO	MSCH	9S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N87	HEMBRA	MSCH	9S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N88	MACHO	SSF	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N89	MACHO	SSF	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N90	MACHO	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N91	HEMBRA	SSF	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N92	HEMBRA	SSF	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N93	HEMBRA	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	35.2	NEG	NEG
12N94	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N95	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N96	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N97	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N98	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N99	MACHO	MSCH	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N100	MACHO	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N101	HEMBRA	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N102	HEMBRA	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N103	HEMBRA	FUCO	12S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12N104	HEMBRA	MSCH	12S	NEG	30.1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

D: Día; DÍA: Día del sacrificio postinfusión; FUCO: Células Stem Mesenquimales fucosiladas; ID: Número de identificación; MSCH: Células Stem mesenquimales; NEG: Negativo; S: Semana; SNC: Sistema nervioso central; SP: Sangre periférica.

DISCUSIÓN

1.- OBJETIVO PRINCIPAL: ESTUDIAR LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA INFUSIÓN INTRAVENOSA DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA FUCOSILADAS EN UN MODELO MURINO NOD/SCID.

El objetivo principal fue evaluar si podíamos realizar con eficacia la técnica de fucosilación de células stem mesenquimales de MO humana en nuestro medio, estudiar si este proceso modifica las propiedades biológicas de la célula y analizar la seguridad y eficacia del proceso tanto in vitro como in vivo tras su infusión en el modelo murino inmunodeprimido NOD/SCID. Los resultados obtenidos en este estudio preclínico y la prueba de concepto se discutirán en el mismo orden de exposición del apartado anterior.

1.1.- OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 1: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CITOMÉTRICA Y FUNCIONAL DE CSM DE MÉDULA ÓSEA HUMANA ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO DE FUCOSILACIÓN IN VITRO.

Nuestros resultados confirman que hemos generado un protocolo eficaz para obtener y cultivar CSM a partir de médula ósea humana. Las CSM presentaron una morfología, inmunofenotipo, y viabilidad normales, así como una consistente estabilidad cromosómica. Además mostraron en todos los casos capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica con lo que se demostraron todos los criterios definitorios de Células Madre Mesenquimales de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT).

De manera relevante, nuestros datos también mostraron que todas estas características se mantenían después de que las células fueran sometidas al proceso de fucosilación *ex vivo* con la enzima fucosiltransferasa FTVI.

La mayoría de los datos previos publicados, se refieren a fucosilación e infusión en modelo de ratón de CSM murinas fucosiladas (en lugar de humanas), lo que resta posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos al ser humano.

La especificidad de la técnica de fucosilación la comprobamos mediante la expresión de HCELL y del complejo E-selectina murina/Fc humano por medio de citometría de flujo. Para ello utilizamos un anticuerpo quimérico recombinante de E-selectina murina/Fc humano (HECA452) en las muestras de CSM que habían sido incubadas con la enzima FTVI a una concentración de 60 mU/mL. Además comprobamos que la unión era dependiente de calcio.

Para mayor consistencia, realizamos controles negativos con las muestras de CSM no sometidas al proceso de fucosilación y no observamos la expresión de HCELL ni de la quimera E-selectina murina/Fc humano. Las muestras 22 y 24 presentaron un patrón de fucosilación adecuado con aumento de expresión HCELL (HECA452) y de la quimera E-selectina murina/Fc humano.

Todos estos datos confirman los resultados obtenidos en el laboratorio del Dr. Sackstein et al (98), con un protocolo de fucosilación similar con las siguientes modificaciones. En primer lugar las CSM se cultivaron a una densidad algo menor (1.6×10^5 cél/cm² versus 2×10^5 cél/cm²). El criterio de confluencia para despegar las CSM en nuestro laboratorio fue más estricto, precisando un 60-80% de confluencia en lugar del 40% del requerido en el trabajo de Dr. Sackstein et al (98). Otra diferencia sustancial es la sustitución en el medio de cultivo del suero bovino fetal por un extracto de lisado plaquetar humano. Las condiciones establecidas para la fucosilación ex vivo de las CSM en nuestro laboratorio se han realizado con éxito logrando un crecimiento y expansión normal de las CSM, y con presevación de su integridad morfológica, inmunofenotípica y funcional. Otros grupos han conseguido realizar con eficiencia el proceso de fucosilación in vitro, y emplean otras fucosiltransferasas o emplean en las incubaciones productos como el manganeso que son tóxicos in vivo, lo que les invalida para las pruebas de concepto para el uso en seres humanos (98;354-356). Nuestros datos están en consonancia con lo publicado por Schallmoser K et al. (357) que defiende el empleo del lisado plaquetar en el medio de cultivo para la expansión de CSM como sustituto al suero bovino fetal argumentando como gran ventaja la erradicación del riesgo de transmisión de infecciones virales, priones y otras zoonosis derivadas del empleo de suero bovino fetal sin pérdida de eficacia en el proceso.

Además en la mayoría de los experimentos se emplean CSM murinas en lugar de humanas, lo que resta posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos en los mismos al ser humano.

En nuestro laboratorio, dada la colaboración establecida con el Prof. Sackstein elegimos su técnica de fucosilación con mínimas variaciones y utilizando células humanas y la FTVI, porque nuestro fin último es la realización de pruebas de concepto in vivo para poder utilizar estas células en protocolos de terapia regenerativa en patología humana.

Con estos resultados hemos conseguido implantar de manera consistente el protocolo de fucosilación in vitro de CSM de médula ósea humana en nuestro laboratorio. Actualmente estamos elaborando el diseño para evaluar la seguridad y la eficacia de la fucosilación en CSM humanas derivadas del tejido adiposo.

1.2.- OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 2: ESTUDIAR LA SEGURIDAD DE LA INFUSIÓN INTRAVENOSA DE CSM DE MÉDULA ÓSEA HUMANA FUCOSILADAS EN EL MODELO MURINO NOD/SCID.

En primer lugar, dadas las características del estudio preclínico con un modelo murino inmunodeprimido diseñamos un protocolo de actuación mediante hojas de trabajo con pasos específicos detallados para cada una de las etapas del cronograma (recepción, infusión, evaluación de toxicidad y sacrificio) con el fin de optimizar cada uno de los procesos. (Anexos III, V y VI). De igual forma elaboramos una ficha identificativa para cada uno de los ratones (Anexo IV) para un correcto registro del seguimiento durante el estudio. Estos protocolos de nueva creación podrán ser utilizados para posteriores ensayos en modelos animales en nuestro laboratorio.

Cabe destacar como incidencia reseñable el elevado peso basal de las hembras NOD/SCID (mediana de 20.9 g), lo que no concordaba con la mediana de peso que deberían presentar en la 5ª-6ª semana de vida según el laboratorio Harlan®, proveedor de los animales

(mediana de peso de 17.5 g aproximadamente (335). Una posible explicación sería que las hembras recibidas tuvieran una edad mayor a la solicitada y de ahí la descompensación ponderal objetivada. El peso de los machos si era similar al peso referenciado por el laboratorio. Sin embargo este hecho no mostró influencia en la supervivencia de las hembras puesto que como comentaremos posteriormente ningún animal falleció de forma espontánea antes del momento del sacrificio establecido en el cronograma ni presentó de forma significativa ningún signo anómalo en el score de bienestar o en la histología de los órganos analizados. A pesar de ello era importante su consideración dada la corta supervivencia de los ratones NOD/SCID (mediana de supervivencia 36-38 semanas), debido a un alto riesgo de presentar infecciones oportunistas tanto virales como bacterianas y a la elevada incidencia de neoplasias linfoproliferativas tímicas (335).

Para evaluar la seguridad de la infusión celular empleamos diferentes instrumentos: score de bienestar animal, hematimetría, bioquímica sérica en el momento del sacrificio e histología de órganos extraídos en la necropsia. También realizamos estudio de biodistribución con qRT-PCR, si bien los resultados de los mismos serán comentados en el objetivo específico número 4. A continuación se discuten los resultados de seguridad desglosados por apartados.

1.2.1.- TOXICIDAD AGUDA:

No se registró ningún fallecimiento durante el período de evaluación de toxicidad aguda. Tampoco se observó ninguna incidencia relacionada con la exposición a luz infrarroja previa a la administración endovenosa. Durante la infusión se produjeron dos reacciones locales menores (pequeñas equimosis) en la zona de punción de dos ratones (1 macho y 1 hembra) infundidos con CSM fucosiladas, relacionados con la canalización de la vena para la administración del fármaco. Estas equimosis mostraron una resolución progresiva con normalización en la 2ª semana.

1.2.1.1. SCORE DE BIENESTAR ANIMAL.

Al evaluar la posible toxicidad aguda relacionada con la infusión ningún ratón mostró ningún signo de afectación de su bienestar en las horas posteriores a la administración del producto y solamente en el 2º día postinfusión, una hembra en el brazo de SSF, tuvo agitación intensa provocada por la estimulación. No observamos ningún fallecimiento inmediato, por lo que podemos deducir que la dosis absoluta de 1×10^6 de CSM fucosiladas en un volumen de 0.3 mL de SSF es óptima en términos de seguridad. Esta cifra es superior a la dosis de $(1 \times 10^6/\text{Kg})$ empleada en ensayos clínicos fase I/II en los que se han utilizado CSM expandidas in vitro, administradas de forma intravenosa, para el tratamiento de entidades como la Enfermedad Injerto contra Huesped ($1 \times 10^6/\text{Kg}$) (358), citopenias refractarias (359) y a otros estudios en los que se han empleado tanto CSM fucosiladas para el estudio del homing in vivo (3×10^5 células) o CSH de cordón umbilical fucosiladas (356). Si bien cabe destacar que otros autores han descrito dosis más elevadas tanto de CSM humanas fucosiladas como el Dr. Sackstein et al (98) con infusión de 5×10^6 CSM humanas fucosiladas o Xia et al con la infusión de 8×10^6 células CD34+ de cordón umbilical humano (355) sin presentar toxicidades significativas. El volumen infundido de 0.3 mL en el modelo murino ha sido descrito en la literatura como seguro sin provocar efectos adversos durante la infusión (355). Nuestros datos dan pie a postular que la mayoría de las células administradas no quedaron retenidas en la microcirculación de los

grandes filtros vasculares del organismo (el pulmón, el hígado, el bazo), aspecto que posteriormente confirmamos con los resultados de biodistribución por qRT-PCR.

Se puede concluir por tanto, basados en estos datos, que la dosis inicial para el ensayo clínico en humanos con CSM fucosiladas puede ser de 1×10^6 CSM fucosiladas/Kg ya que como hemos argumentado estas dosis ha sido utilizada ampliamente de forma segura y eficaz por otros autores, y nosotros no hemos encontrado en nuestro estudio preclínico ninguna toxicidad infundiendo en el ratón dosis más altas de CSM humanas fucosiladas.

1.2.1.2. PESO.

El volumen circulante del ratón es de 72 mL/kg. El volumen celular infundido por vía endovenosa fue de 200-300 μ L en base a las recomendaciones del CSIC en la infusión endovenosa para el modelo murino (200-300 μ L) (339). El análisis del peso permitió de forma indirecta ver la tolerancia de los animales a este aporte exógeno de volumen.

Al analizar de forma conjunta todos los ratones, no observamos diferencias en la mediana de pesos ni en la variación ponderal en los primeros días postinfusión, sin embargo al examinar el incremento de peso estratificado por sexo se observaron resultados significativamente diferentes en el 1º día postinfusión. Los machos presentaron una ganancia de peso (0.3 g), mientras que las hembras presentaron una pérdida de peso (0.3 g). Además esta ganancia se mantenía pasadas 48 horas tras la infusión (+0.4 g en los machos versus -0.1 g en las hembras). Evaluando el incremento ponderal del 1º al 2º día no se observaron diferencias al estratificar por sexo.

Realizamos una estratificación de los machos en función del producto administrado, para comprobar si las CSM ejercían alguna influencia en el incremento ponderal de los animales. No observamos ninguna diferencia en el incremento ponderal de los machos que habían recibido CSM fucosiladas, CSM sin fucosilar o salino.

Así pues, con el análisis global y estratificado del incremento ponderal pudimos establecer que si bien no existían modificaciones en el peso absoluto de los ratones, si se producía un manejo inadecuado del volumen infundido en los ratones macho en las primeras 24 horas post-infusión, independientemente de la rama del producto recibido.

1.2.1.2. PARÁMETROS HEMÁTICOS.

Los valores de hemoglobina, leucocitos y fórmula leucocitaria obtenidos de los ratones infundidos con CSM fucosiladas (n=4) fueron concordantes con los valores normales correspondientes al hemograma de los ratones NOD/SCID de 8 a 16 semanas, (tabla 48) (336). Comprobamos que los ratones mostraban inmunodepresión celular. El único resultado anormal a destacar fue la cifra de plaquetas, que fue inferior a los valores de referencia establecidos por el laboratorio. Sin embargo, al realizar extensiones de sangre periférica, observamos múltiples agregados plaquetarios en el frotis. Es posible que esta Pseudotrombopenia fuera debida al EDTA en los tubos o a microtraumatismos en la extracción en algunos casos. Para evitar estos resultados atípicos se ha implementado la extracción de sangre en citrato y la extracción de vena periférica previo al sacrificio del animal. No hemos encontrado publicados datos de seguridad referidos a parámetros hemáticos en ratones infundidos con CSM fucosiladas para poder discutirlos.

Tabla 52. Parámetros hemáticos de sangre intracardíaca en ratones NOD/SCID estratificados por rama de tratamiento en período de evaluación de toxicidad aguda (n=4) con valores de referencia (336).

	Valores hematimétricos de normalidad	Mediana [Rango intercuartílico] en ratones sacrificados para evaluar toxicidad aguda (n=4)
Hemoglobina	145-154 g/L	141 g/L [116-162]
Plaquetas	1037-1300 x 10 ⁹ /L	314 x 10 ⁹ /L [90-502]
Leucocitos	0.41-0.78 x 10 ⁹ /L	0.59 x 10 ⁹ /L [0.37-1.34]
Neutrófilos	0.2-0.4 x 10 ⁹ /L	0.35 x 10 ⁹ /L [0.21-0.81]
Linfocitos	0.14-0.25 x 10 ⁹ /L	0.23 x 10 ⁹ /L [0.11-0.51]
Monocitos	0.01-0.03 x 10 ⁹ /L	0.01 x 10 ⁹ /L [0-0.03]
Eosinófilos	0.05-0.12 x 10 ⁹ /L	0.03 x 10 ⁹ /L [0.01-0.04]
Basófilos	0-0 x 10 ⁹ /L	0 x 10 ⁹ /L [0-0]

1.2.1.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO.

Los valores de urea, creatinina, transaminasas y del metabolismo calcio/ fósforo en los ratones infundidos con CSM fucosiladas (n=4) fueron normales (tabla 49) (336). Solo encontramos una discreta elevación de la glucemia, que puede explicarse por el pequeño tamaño muestral evaluado en este período. Estos datos son originales y no existen en la literatura datos de seguridad referidos a parámetros bioquímicos en ratones infundidos con CSM fucosiladas para poder discutirlos.

Tabla 53. Parámetros bioquímicos de sangre intracardíaca en ratones NOD/SCID estratificados por rama de tratamiento en período de evaluación de toxicidad aguda (n=4) con valores de referencia en suero (336).

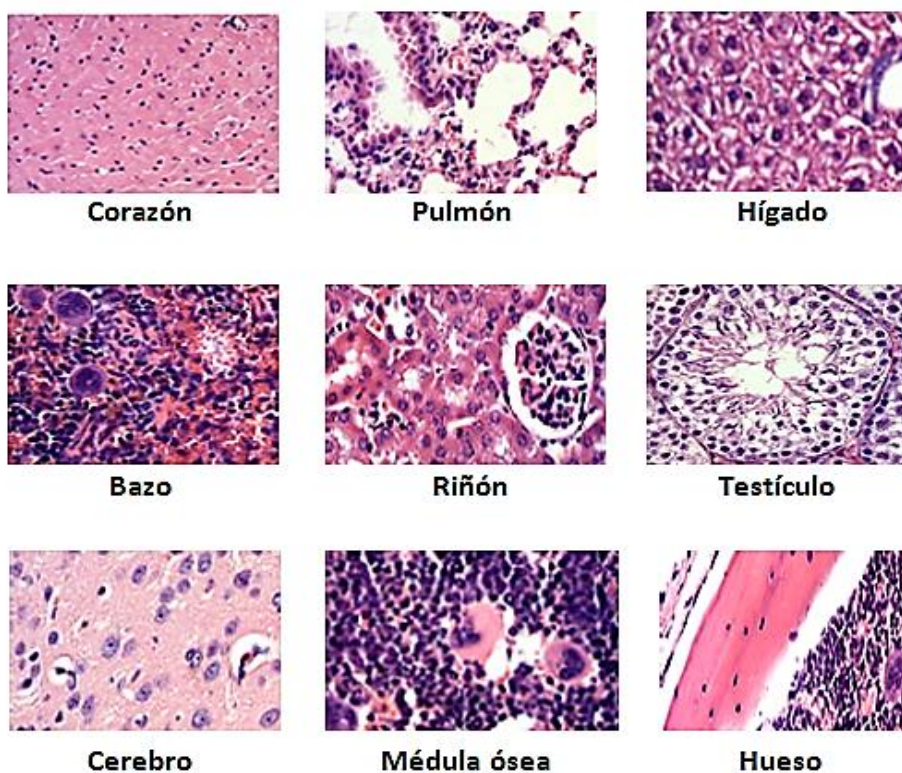
	Valores bioquímicos de normalidad en suero.	Mediana [Rango intercuartílico] en ratones sacrificados para evaluar toxicidad aguda (n=4)
Glucosa	175-335 mg/dL	360 mg/dL [350-365]
Urea	34-57 mg/dL	40 mg/dL [40-40]
Creatinina	< 0.5 mg/dL	< 0.2 mg/dL (todos los casos)
GOT	55-251 UI/L	220 UI/L [175-250]
GPT	41-64 UI/L	40 UI/L [40-55]
Calcio	9.9-10.7 mg/dL	10 mg/dL [9-10.5]
Fósforo	8.6-11.2 mg/dL	10.5 mg/dL [9-10.5]

UI: unidades internacionales

1.2.1.4. HISTOLOGÍA.

La arquitectura tanto macro como microscópica de todos los órganos evaluados (corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, gónadas) fue normal en los 4 ratones sacrificados durante el período de toxicidad aguda (fotografía 62).

Fotografía 4. Histología de ratones NOD/SCID sacrificados para evaluación de toxicidad aguda (n=4)



1.2.2.- TOXICIDAD CRÓNICA:

No se registraron fallecimientos espontáneos de animales durante el tiempo de seguimiento programado para analizar toxicidad crónica.

1.2.2.1. SCORE DE BIENESTAR ANIMAL.

Al analizar la evaluación de los scores de bienestar animal desde el 2º día hasta la 12ª semana postinfusión únicamente 2 ratones (ambos machos) presentaron alguna alteración del bienestar de carácter leve (uno en la rama de CSM sin fucosilar y otro en la rama de salino), que no precisaron ninguna actuación tal y como se plantea en el score de Lloyd y Walfenson (338).

Tabla 54. Resumen de resultados de score de bienestar animal en ratones evaluados para toxicidad crónica (342)

Score	Estado del animal	Actitud a tomar	Ratones evaluados durante el período de toxicidad crónica (n=27)
0-4	Normal	Ninguna	27
5-9	Afectación leve	Vigilar estrechamente. Valorar analgesia	0
10-14	Sufrimiento moderado	Considerar sacrificio	0
15-19	Dolor severo	Sacrificio inmediato	0

En el caso del animal infundido con CSM sin fucosilar solamente presentó una exagerada respuesta en el comportamiento estimulado de forma aislada en la 1ª semana postinfusión. El ratón infundido con SSF presentó la misma agitación en la respuesta a la estimulación provocada en la 1ª semana, desapareciendo en los controles realizados hasta la 9ª semana donde reapareció dicho comportamiento junto a un área de pelo encorvado y de alopecia, que se mantuvieron hasta su sacrificio fijado en la 12ª semana post-infusión. El 100% de los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas presentó un score de 0 durante todo el período de seguimiento de toxicidad crónica.

Cabe mencionar que no se observaron diferencias significativas entre los tres brazos al comparar entre ellos los scores alterados (≥ 1) ($p=0.28$) ni tampoco al evaluar la alteración en el score (≥ 1) en ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas con respecto a los infundidos con CSM sin fucosilar ($p=0.82$).

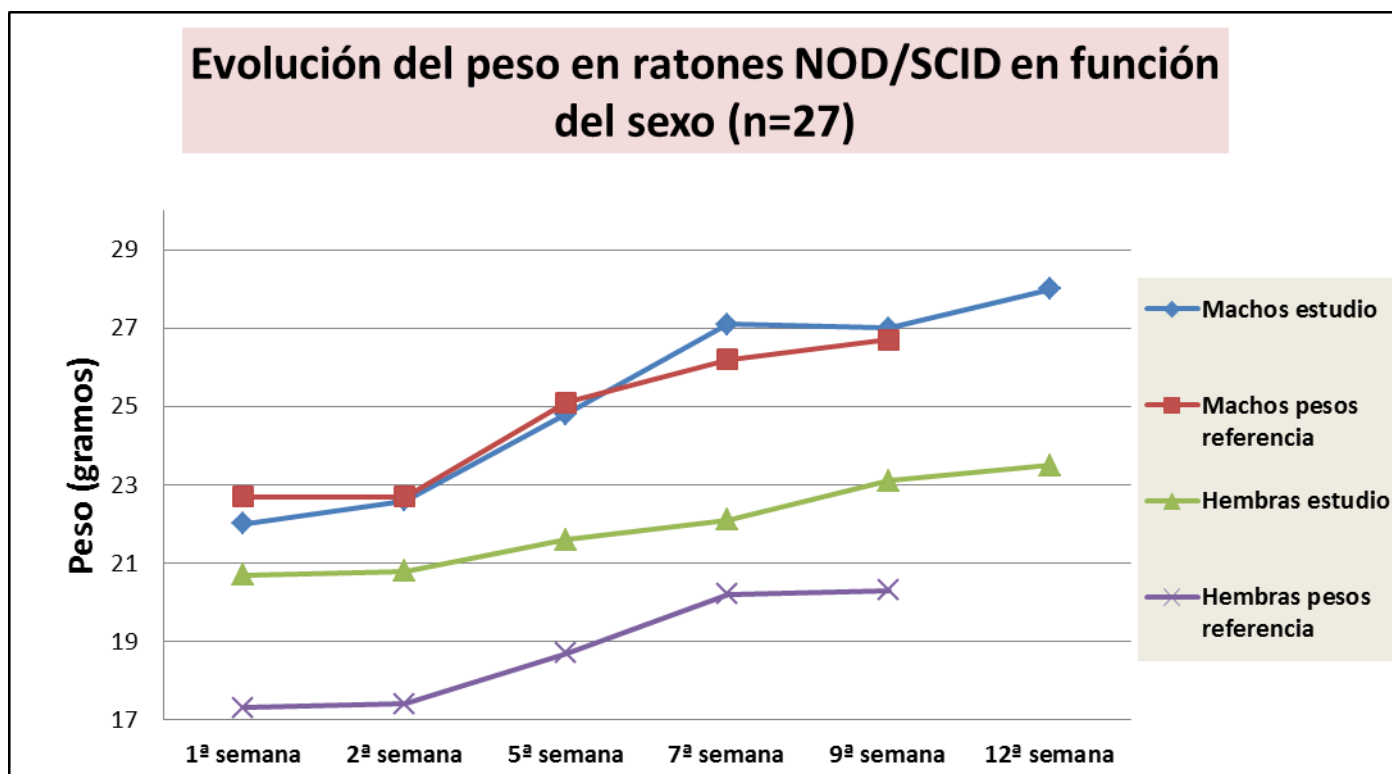
Estos datos confirman que la infusión de CSM no produce ninguna toxicidad crónica relevante, ya que en ningún animal de experimentación se observó un score ≥ 5 que obligara a realizar controles más frecuentes, administración de analgesia o practicar un sacrificio anticipado por sufrimiento del animal.

1.2.2.2. PESO.

La ganancia de peso de los ratones en el estudio se produjo de forma normal, con un incremento ponderal significativo en cada punto de evaluación del estudio con respecto al previo. Estos resultados están en consonancia con la media de peso de referencia del laboratorio Harlan® que proporcionó los animales (335),

Como era de esperar se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los ratones NOD/SCID machos y hembras a lo largo del seguimiento. En el gráfico 52 puede verse como los machos presentaron una curva de crecimiento muy semejante a la curva de referencia mientras que en las hembras la curva tenía morfología similar pero desplazada unas varias semanas. Estos datos también apoyan la hipótesis planteada de que las hembras presentaban una edad bastante superior a la 5ª semana en el momento de su recepción para el estudio.

Gráfico 52. Evolución de las medianas de peso en ratones NOD/SCID estratificado por sexo durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=27) y curvas de referencia de pesos (335).



No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los ratones NOD/SCID en función del producto administrado de forma intravenosa en ninguna semana de evaluación (tabla 32), ni en el incremento ponderal de los animales en función del producto administrado ($p=0.33$) (tabla 33). Estos datos también confirman la falta de toxicidad del producto celular administrado.

1.2.2.3. PARÁMETROS HEMÁTICOS.

En las tablas 55,56 y 57 se exponen los parámetros de las tres series hematológicas junto a los valores de referencia normales de los ratones NOD/SCID (336).

La mediana de hemoglobina en ratones infundidos con CSM fucosiladas fue discretamente más elevada que la referenciada por el laboratorio, pero ello no tuvo ninguna repercusión funcional ni hallazgos patológicos en la médula ósea de los ratones. Esta discreta variación, al igual que el leve descenso de las plaquetas puede estar en relación con el momento de extracción sanguínea, que como hemos comentado es susceptible de ser modificado en experimentos posteriores con la toma de muestra de sangre periférica venosa previo al sacrificio. También observamos un ligero aumento en los leucocitos a expensas de un mayor número de neutrófilos y linfocitos con respecto a los valores de referencia (tabla 55). Este aumento puede deberse a que los valores de referencia son referidos a ratones NOD/SCID con una edad de 5 a 6 semanas de vida y parte de nuestra población de animales era sacrificada en etapas posteriores, momento en el que según algunos autores este modelo de ratón inmunodeprimido puede recuperar de forma espontánea cierta inmunidad humoral y celular (335;336). No hemos encontrado publicados datos de seguridad referidos a parámetros hemáticos en ratones infundidos con CSM fucosiladas para poder discutirlos.

Tabla 55. Parámetros hemáticos de sangre intracardiaca en ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=9) con valores de referencia (336).

	Valores hematimétricos de normalidad	Mediana [Rango intercuartílico] en ratones infundidos con CSM fucosiladas sacrificados para evaluar toxicidad crónica (n=9)
Hemoglobina	145-154 g/L	161 [149-188]
Plaquetas	1037-1300 x 10 ⁹ /L	934 [797-1292]
Leucocitos	0.41-0.78 x 10 ⁹ /L	1.38 [1.14-3.87]
Neutrófilos	0.2-0.4 x 10 ⁹ /L	0.83 [0.56-2.63]
Linfocitos	0.14-0.25 x 10 ⁹ /L	0.65 [0.51-1.14]
Monocitos	0.01-0.03 x 10 ⁹ /L	0.02 [0-0.07]
Eosinófilos	0.05-0.12 x 10 ⁹ /L	0.02 [0.01-0.1]
Basófilos	0-0 x 10 ⁹ /L	0 [0-0]

Tanto la mediana de hemoglobina como la cifra de plaquetas de los ratones infundidos con CSM sin fucosilar se encuentra dentro de los valores normales referenciados por el laboratorio (tabla 56), si bien cabe destacar que el tamaño muestral era mayor que en los otros dos brazos. En esta rama de tratamiento de igual forma objetivamos el discreto en los leucocitos a expensas de neutrófilos y linfocitos que puede ser explicada por una recuperación parcial de la granulopoyesis y la linfopoyesis en este modelo animal (335;336).

Tabla 56. Parámetros hemáticos de sangre intracardíaca en ratones NOD/SCID infundidos con CSM sin fucosilar durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=14) con valores de referencia (336).

	Valores hematimétricos de normalidad	Mediana [Rango intercuartílico] en ratones infundidos con CSM sacrificados para evaluar toxicidad crónica (n=14).
Hemoglobina	145-154 g/L	150 [132-163]
Plaquetas	1037-1300 x 10 ⁹ /L	1120 [896-1610]
Leucocitos	0.41-0.78 x 10 ⁹ /L	1.26 [0.99-2]
Neutrófilos	0.2-0.4 x 10 ⁹ /L	0.48 [0.25-1.53]
Linfocitos	0.14-0.25 x 10 ⁹ /L	0.58 [0.43-0.84]
Monocitos	0.01-0.03 x 10 ⁹ /L	0.02 [0.02-0.03]
Eosinófilos	0.05-0.12 x 10 ⁹ /L	0.03 [0.02-0.07]
Basófilos	0-0 x 10 ⁹ /L	0 [0-0]

En la tabla 57, podemos comprobar un descenso en la hemoglobina en ratones infundidos con SSF y paralelamente un mayor descenso en la cifra de plaquetas que puede ser explicada por las posibles extracciones dificultosas. En este subgrupo identificamos únicamente un mayor recuento absoluto de linfocitos que quizás podría estar en relación al menor número de animales en esta rama.

Tabla 57. Parámetros hemáticos de sangre intracardiaca en ratones NOD/SCID infundidos con suero salino fisiológico durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=4) con valores de referencia (336).

	Valores hematimétricos de normalidad	Mediana [Rango intercuartílico] en ratones infundidos con salino para evaluar toxicidad crónica (n=4)
Hemoglobina	145-154 g/L	109 [105-125]
Plaquetas	1037-1300 x 10 ⁹ /L	886 [660-1885]
Leucocitos	0.41-0.78 x 10 ⁹ /L	0.89 [0.7-1.1]
Neutrófilos	0.2-0.4 x 10 ⁹ /L	0.2 [0.12-0.3]
Linfocitos	0.14-0.25 x 10 ⁹ /L	0.53 [0.42-0.81]
Monocitos	0.01-0.03 x 10 ⁹ /L	0 [0-0.01]
Eosinófilos	0.05-0.12 x 10 ⁹ /L	0.07 [0.06-0.09]
Basófilos	0-0 x 10 ⁹ /L	0 [0-0]

Al realizar el análisis estratificado por rama de tratamiento de los parámetros hemáticos, obtenidos en los ratones sacrificados durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=27), encontramos un descenso significativo en el nivel de hemoglobina en la rama de salino con respecto a los otros dos grupos infundidos con CSM ($p<0.05$). También observamos diferencias en el recuento absoluto de neutrófilos entre las tres ramas ($p=0.016$), detectando en el análisis post-hoc que el grupo infundido con CSM fucosiladas era el que presentaba mayores cifras con respecto a los infundidos con SSF ($p<0.05$) pero no con respecto a CSM sin fucosilar. No se observaron diferencias entre los tres grupos con respecto al recuento absoluto de linfocitos ($p=0.74$), monocitos ($p=0.09$) ni eosinófilos ($p=0.28$). No es descartable que el tamaño muestral sea la explicación de estas diferencias entre grupos, aunque también es plausible que se haya producido un efecto positivo de las CSM infundidas en el microambiente de la médula ósea del ratón. Una de las causas de este resultado es un posible mayor grado de hemodilución en estas muestras que conllevaría unas cifras de hemoglobina inferiores. Los únicos datos existentes en la literatura analizan la reconstitución hematopoyética en ratones NOD/SCID xenotrasplantados con células stem hematopoyéticas de cordón umbilical o con CSM de MO [360;361], pero no hemos encontrado bibliografía publicada por otros grupos con la descripción de los parámetros bioquímicos y hemáticos de ratones NOD/SCID infundidos exclusivamente con CSM fucosiladas. Nuestros datos son por tanto los primeros publicados en relación a las posibles alteraciones en parámetros bioquímicos y hematológicos en ratones NOD/SCID tras la infusión de CSM fucosiladas.

1.2.2.4. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO.

En las tablas 58, 59 y 60 se pueden observar los valores de urea, creatinina, transaminasas y del metabolismo calcio/ fósforo en suero obtenidos en los ratones evaluados durante el período de toxicidad crónica en función del producto administrado junto a los valores de referencia de ratones NOD/SCID entre las 8 y las 16 semanas de vida (336).

Tabla 58. Parámetros bioquímicos en suero de ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=9) con valores de referencia (336).

	Valores bioquímicos de normalidad en suero	Mediana [Rango intercuartílico] en ratones infundidos con CSM fucosiladas sacrificados para evaluar toxicidad crónica (n=9)
Glucosa (mg/dL)	175-335	340 [260-417]
Urea (mg/dL)	34-57	40 [40-42]
Creatinina (mg/dL)	< 0.5	< 0.2 mg/dL (todos los casos)
GOT (UI/L)	55-251	560 [160-835]
GPT (UI/L)	41-64	70 [40-135]
Calcio (mg/dL)	9.9-10.7	9 [8.7-10]
Fósforo (mg/dL)	8.6-11.2	12 [11-13]

UI: unidades internacionales

Tabla 59. Parámetros bioquímicos en suero de ratones NOD/SCID infundidos con CSM sin fucosilar durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=14) con valores de referencia (336).

	Valores bioquímicos de normalidad en suero	Mediana [Rango intercuartílico] en ratones infundidos con CSM sin fucosilar sacrificados para evaluar toxicidad crónica (n=14)
Glucosa (mg/dL)	175-335	335 [280-380]
Urea (mg/dL)	34-57	40 [40-50]
Creatinina (mg/dL)	< 0.5	125 [100-170]
GOT (UI/L)	55-251	30 [20-60]
GPT (UI/L)	41-64	9 [8-11]
Calcio (mg/dL)	9.9-10.7	11 [9-13]
Fósforo (mg/dL)	8.6-11.2	6.5 [3-11]

UI: unidades internacionales

Tabla 60. Parámetros bioquímicos en suero de ratones NOD/SCID infundidos con SSF durante el período de evaluación de toxicidad crónica (n=4) con valores de referencia (336).

	Valores bioquímicos de normalidad en suero	Mediana [Rango intercuartílico] en ratones infundidos con SSF para evaluar toxicidad crónica (n=4)
Glucosa (mg/dL)	175-335	340 [315-345]
Urea (mg/dL)	34-57	45 [40-50]
Creatinina (mg/dL)	< 0.5	220 [135-305]
GOT (UI/L)	55-251	50 [45-85]
GPT (UI/L)	41-64	9.5 [8.5-10]
Calcio (mg/dL)	9.9-10.7	11.5 [8-15.5]
Fósforo (mg/dL)	8.6-11.2	2.5 [1.5-5.5]

UI: unidades internacionales

No existieron diferencias significativas entre los tres grupos con respecto a los niveles en suero de glucosa ($p=0.99$), urea ($p=0.71$), creatinina ($p=1$), calcio ($p=0.99$) ni fósforo ($p=0.85$). En contraste, si constatamos un incremento significativo de la enzima hepática GOT entre los tres grupos ($p=0.03$), que no afectaba a los niveles de GPT ($p=0.06$). En el análisis post-hoc, los ratones infundidos con CSM fucosiladas tenían una mayor cifra de GOT con respecto a los infundidos con células sin fucosilar, pero no con respecto a salino. Para explicar esa diferencia lo primero que hicimos fue comprobar los niveles de hemólisis de cada uno de los grupos (Índices de Hemólisis). No observamos diferencias significativas al estratificar el Índice de hemólisis de los sueros en función del producto recibido, aunque el valor fue próximo a la significación ($p=0.08$). Por medio del coeficiente de Pearson se detectó que los valores de los índices de hemólisis tenían una fuerte correlación positiva con los niveles de GOT ($r=0.88$, $p<0.0001$), pudiendo establecer la ecuación de regresión: $y = 2.3525 + 32.1637 x$ con significación estadística ($p<0.001$) (gráfico 43). De igual forma los valores de GPT presentaban una correlación positiva con los índices de hemólisis ($r=0.86$, $p<0.0001$), estableciéndose la siguiente ecuación de regresión: $y = x$ ($p < 0.0001$), con significación estadística ($p<0.0001$) (gráfico 44). No existió correlación entre los valores de hemólisis en los sueros y el resto de parámetros bioquímicos estudiados.

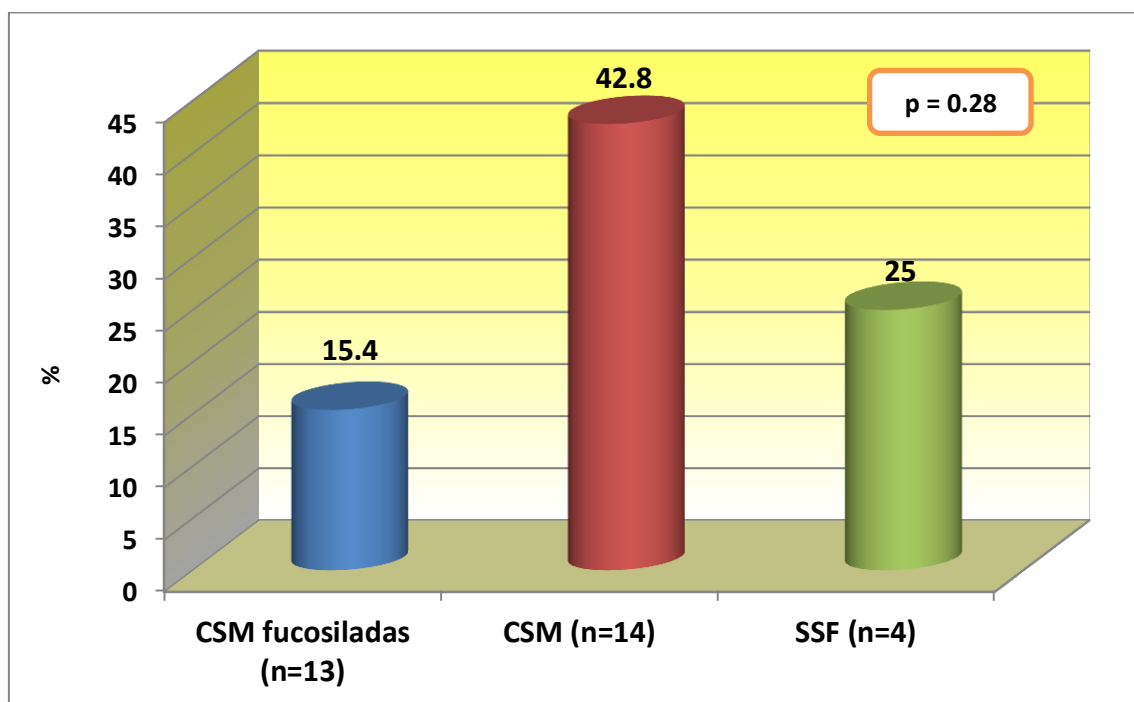
En consecuencia, se puede concluir que la hemólisis fue la causa del incremento irreal de los valores de las transaminasas. De ello se deduce que en estos modelos experimentales es fundamental determinar el índice de hemólisis en los sueros antes de interpretar como toxicidad hepática las elevaciones de transaminasas. No hemos encontrado publicados datos de seguridad referidos a parámetros bioquímicos ni datos de hemólisis en ratones infundidos con CSM fucosiladas para poder discutirlos.

1.2.3. HISTOLOGÍA.

El examen macro y microscópico de corazón, hígado, bazo, riñón, gónadas, sistema nervioso central, médula ósea y hueso de todos los ratones sacrificados durante el estudio fue normal sin constatar neoformaciones, patología vascular, infiltrados inflamatorios ni ninguna otra alteración (fotografías 44,45,48-54).

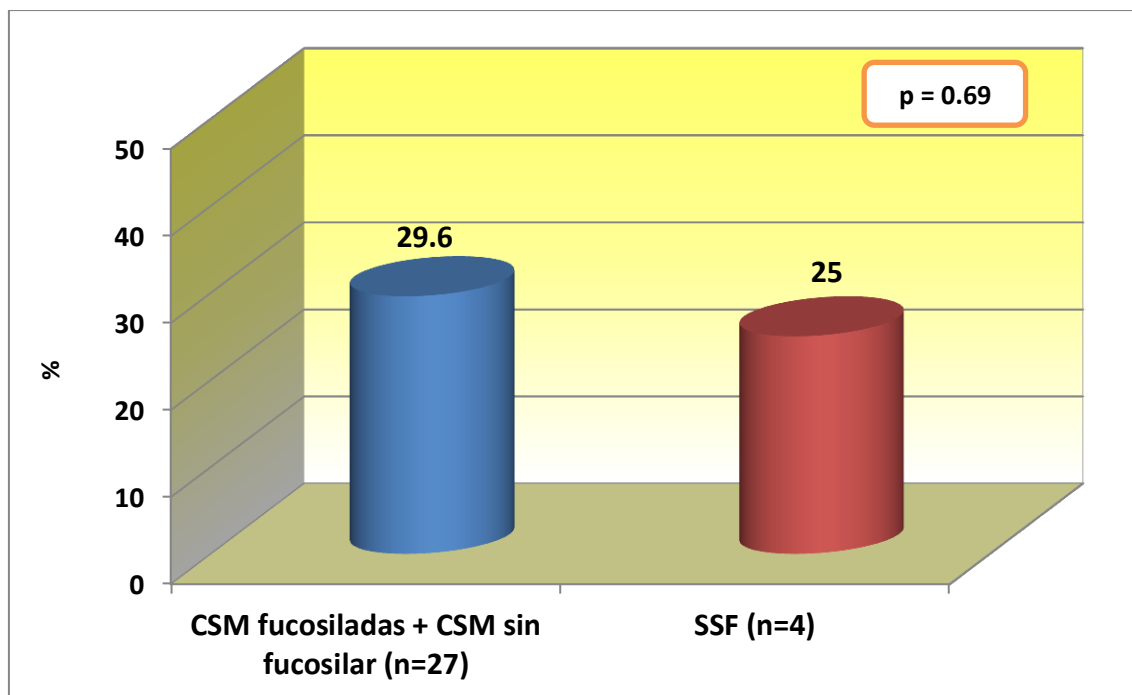
El único hallazgo observado fue la presencia en el parénquima pulmonar de infiltrados intersticiales a expensas de polimorfonucleares neutrófilos en áreas muy localizadas de las muestras analizadas (fotografías 46 y 47). Estos infiltrados fueron observados en todas las ramas del estudio en distintas proporciones (gráfico 53) que no fueron estadísticamente significativas. Al agrupar los animales que recibieron células frente a los que recibieron salino tampoco observamos diferencias (gráfico 54).

Gráfico 53. Proporción de ratones con infiltrados intersticiales pulmonares en áreas localizadas estratificado por producto infundido (n=31).



CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: Suero salino fisiológico.

Gráfico 54. Proporción de ratones con infiltrados intersticiales pulmonares en áreas localizadas agrupando los que recibieron CSM versus SSF (n=31).



CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: Suero salino fisiológico.

La cepa de ratón NOD/SCID presenta una elevada susceptibilidad al desarrollo de infecciones oportunistas tanto virales como bacterianas, probabilidad que aumenta con el paso del tiempo hasta el momento del fallecimiento (335). Ello podría explicar la presencia de infiltrados pulmonares en nuestros ratones, aunque también nos planteamos la posibilidad de un efecto adverso de la infusión celular. A favor del origen infeccioso está la presencia prácticamente exclusiva de polimorfonucleares neutrófilos en las áreas localizadas de los infiltrados pulmonares, ya que en ningún caso se observaron infiltrados con morfología de CSM. Los estudios de biodistribución mediante qT-PCR, que se discuten más adelante, representan otra prueba complementaria que descarta la posible relación del producto infundido con estos infiltrados. Aunque es mucho más probable que los infiltrados tengan un origen infeccioso, no tenemos datos para confirmarlo porque no se tomaron muestras para estudios microbiológicos en la necropsia.

Cabe destacar la importancia de que este es el primer estudio que evalúa la histología de los órganos en modelo animal y los posibles efectos adversos en los órganos de la infusión intravenosa de las CSM fucosiladas humanas. Los resultados obtenidos avalan la seguridad de la infusión de CSM fucosiladas humanas en el ratón NOD/SCID puesto que no hemos obtenido alteraciones en el score de bienestar animal ni en los parámetros hemáticos ni bioquímicos. De la mayor trascendencia es la ausencia de neoformaciones o tumores en los órganos examinados; además la histología mantenía la arquitectura normal tanto macro como microscópicamente sin presentar diferencias significativas con respecto a la de los animales infundidos con CSM sin fucosilar o los que fueron infundidos con SSF. *Estos datos están en consonancia con otros estudios de trasplantes xenogénicos de CSM fucosiladas o sin fucosilar, en los que nunca se han observado casos de neoformaciones* [358-359].

1.3.- OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 3: ESTUDIAR LA EFICACIA DE LA INFUSIÓN INTRAVENOSA DE CSM DE MÉDULA ÓSEA HUMANA FUCOSILADAS EN EL MODELO MURINO NOD/SCID.

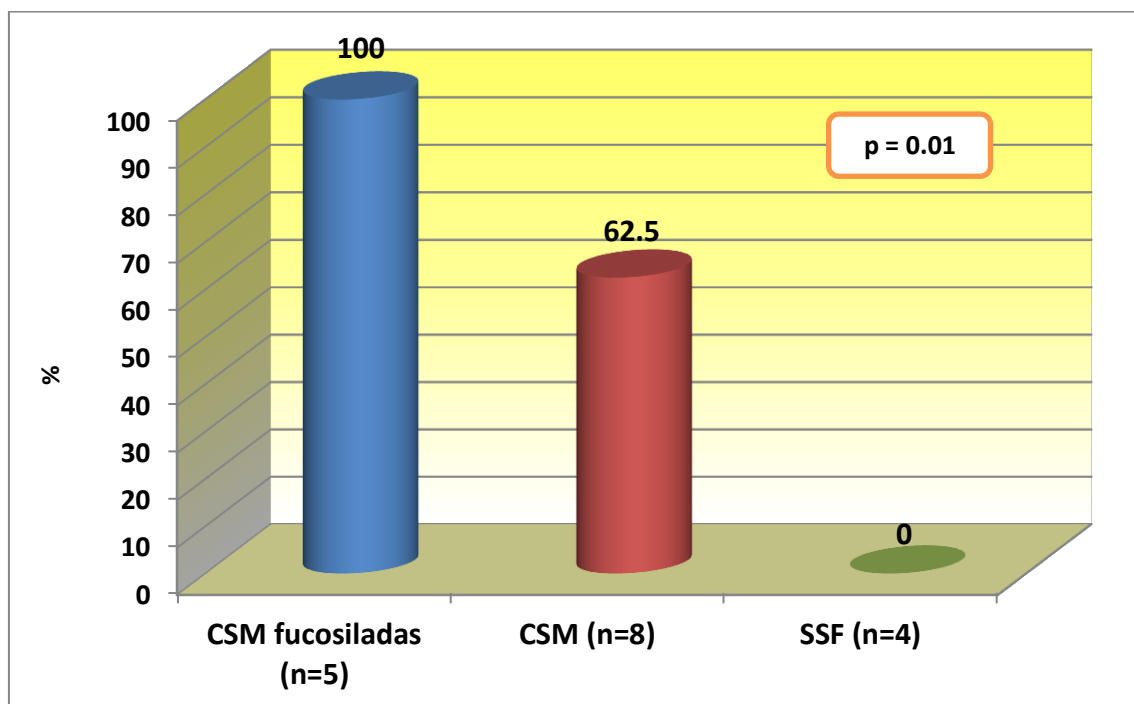
La prueba de concepto para confirmar la eficacia del trasplante de CSM fucosiladas humanas en el modelo animal consistió en la identificación de células positivas para anti-osteocalcina humana en las muestras de tibia de aquellos animales que recibieron CSM humanas y su ausencia en los ratones que recibieron SSF (fotografía 55).

A diferencia de los trabajos de Sackstein y cols. (98) en los que la eficacia era evaluada sólo con técnica de inmunofluorescencia, nuestro estudio nos permitió evaluar la morfología de las células positivas para osteocalcina humana y cuantificarlas, pudiendo aplicar métodos estadísticos para determinar si la infusión de CSM de MO humana fucosiladas constituye una herramienta terapéutica eficaz para la formación ósea. En el diseño prospectivo, con financiación limitada, decidimos enfocar nuestros esfuerzos a estudiar las localizaciones que nos dieran más datos para validar la traslación a un ensayo clínico en pacientes con osteoporosis. En este sentido nuestro estudio tiene la limitación de que solo evaluamos dos localizaciones óseas (calota y tibia) y no pudimos explorar la presencia de células osteocalcina positivas en otras ubicaciones. Con todo, es conocido que la E-selectina, el ligando específico de HCELL, está sobre-expresada en el endotelio de la médula ósea, la piel y los tejidos inflamados (362).

Las células identificadas en el análisis histológico del hueso en los ratones que recibieron tanto CSM fucosiladas como sin fucosilar eran de cuatro tipos: células mononucleadas en el estroma médula ósea, otras aplanadas en hilera monoestratificada (osteoblastos inactivos) en la parte externa ósea sobre la matriz ósea, otras células con morfología poliédrica en la misma localización (osteoblastos activados) y por último otras inmersas en lagunas osteocitarias (osteocitos) (32) (fotografías 56-61).

Conforme a lo descrito en los trabajos de Sackstein y cols. (98) observamos un número significativamente superior osteoblastos osteocalcina humana positivos en el hueso de los animales que habían recibido células fucosiladas (gráfico 55), con respecto a los animales que recibieron CSM sin fucosilar o los que recibieron SSF (en este caso, no se halló ninguna célula positiva para osteocalcina humana en el hueso del ratón). Fue muy notable poder confirmar que el 100% de los ratones que recibieron células fucosiladas tenían células osteocalcina positivas.

Gráfico 55. Proporción de ratones con presencia de osteoblastos osteocalcina positivos (n=17).

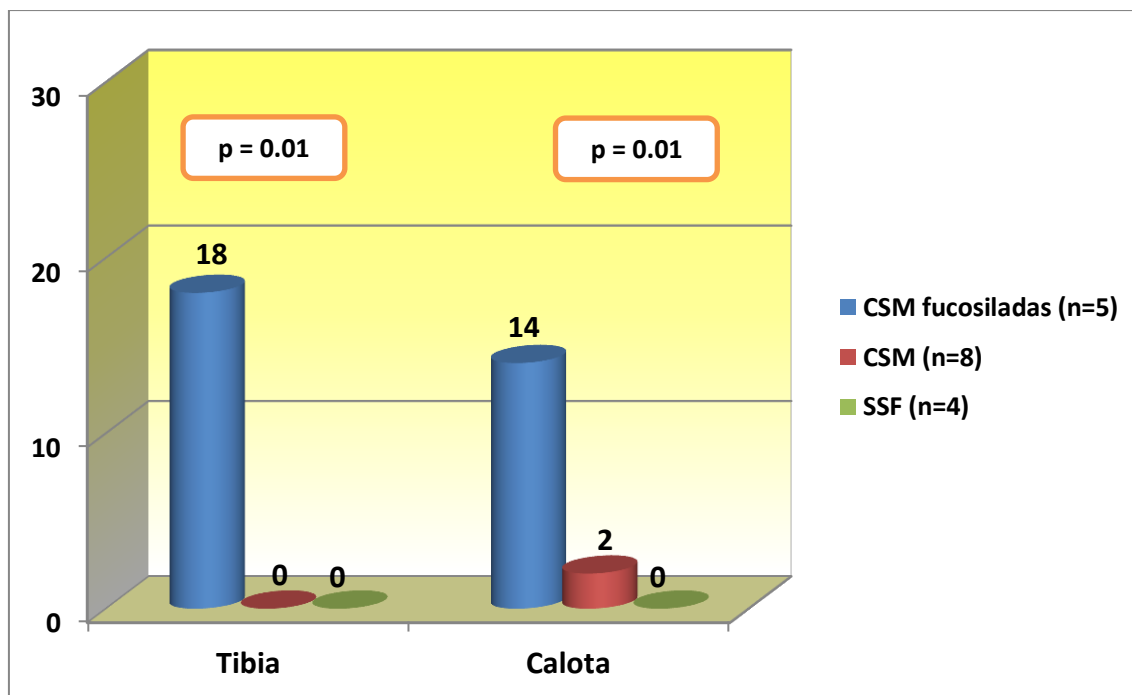


CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: Suero salino fisiológico.

El análisis cuantitativa también demostró un mayor número de osteoblastos osteocalcina positivos en los ratones infundidos con CSM fucosiladas frente a no fucosiladas. Ello se observó tanto en la evaluación conjunta de tibia y calota (20 campos a 400 aumentos) con una mediana de hasta casi 6 veces superior para los infundidos con CSM fucosiladas ($p=0.0082$) (gráfico 45), como al examinar de forma independiente cada localización ósea ($p=0.01$ en ambos casos) (gráficos 46-47).

El empleo del anticuerpo antiosteocalcina humana demostró ser efectivo en la identificación de CSM humanas en la MO de los ratones NOD/SCID. Otros grupos han utilizado con éxito otras técnicas como anticuerpos antimitocondria humana, anti-SDF1 y anti-osteopontina humana (363). En estudios posteriores nos planteamos la posibilidad de analizar la expresión tanto de SDF1 como de osteopontina en las secciones de tibia y calota de los ratones NOD/SCID en nuestro estudio para comparar ambas técnicas de identificación de células donante y su localización.

Gráfico 56. Mediana de osteoblastos osteocalcina positivos estratificado por rama de tratamiento y localización ósea (n=17).



CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: Suero salino fisiológico.

El mayor número de osteoblastos osteocalcina humana positivos hallados en localización ósea en ratones infundidos con CSM fucosiladas, es consecuencia, de acuerdo a lo publicado por el Dr. Sackstein, del mayor tropismo de las CSM fucosiladas por el tejido óseo gracias a la tecnología GPS (Glycotransferase-Programmed Stereosubstitution of cell surface glycans (98). Nuestros datos apoyan la hipótesis de que la fucosilación determina un mayor y mejor anidamiento o “homing” medular de las CSM. Pero además, la fucosilación parece preservar mejor la viabilidad y la funcionalidad celular, ya que se observaron osteoblastos con morfología normal, tanto activados como en reposo, en las muestras óseas evaluadas con anti-osteocalcina humana. Todo ello es coherente con la teoría de los frenos moleculares necesarios para el anidamiento de las células en la médula ósea actualmente admitida (98;320;326;327).

Aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística el número mediano de osteoblastos formados en los ratones macho fue muy inferior al de las hembras, 6.5 [2.5-10] versus 32 [23.2-49.5] ($p=0.057$) (gráfico 48). Esta tendencia a una mayor osteoblastogénesis también fue observada al estratificar por rama de tratamiento en las hembras infundidas con CSM fucosiladas ($p=0.08$) (tabla 44). Este hallazgo de una mayor osteoblastogénesis de NOD/SCID hembras al ser infundidas con CSM fucosiladas no ha sido descrito por otros grupos.

La cinética de la osteoblastogénesis la evaluamos analizando la formación de osteoblastos positivos para osteocalcina humana por inmunohistoquímica periódicamente, en la primera, quinta, séptima y doceava semana tras el xenotrasplante (tabla 46). Los primeros osteoblastos osteocalcina positivos en los ratones infundidos con células fucosiladas se detectaron en la 5ª semana post-infusión en ambos sexos tanto en tibia como en calota, siendo este un hallazgo constante en todos los ratones sacrificados, a lo largo de todo el estudio (tabla 45). Esta secuencia temporal está en concordancia con la duración normal de la

osteoblastogénesis humana (entre uno y tres meses) y a los hallazgos publicados por Sackstein et al (32;98). Además observamos que los ratones sacrificados con tiempos más prolongados desde la infusión de CSM fucosiladas desarrollaban un mayor número de osteoblastos osteocalcina positivos (tabla 46) (gráfico 50). El incremento llegó a alcanzar significación estadística al establecer como punto de corte la 7ª semana post-infusión ($p=0.018$) (tabla 47). En contraste, en los ratones infundidos con células sin fucosilar ya se observaban células osteocalcina positivas en el hueso a la 2ª semana post-infusión. Estos datos son los primeros publicados en la literatura ya que no hemos encontrado bibliografía de evaluación cuantitativa de osteoblastogénesis tras infusión de CSM fucosiladas.

1.4.- OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 4: ESTUDIAR LA BIODISTRIBUCIÓN DE LA INFUSIÓN INTRAVENOSA DE CSM DE MÉDULA ÓSEA HUMANA FUCOSILADAS EN EL MODELO MURINO NOD/SCID MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA POR RETROTRANSCRIPCIÓN (qRT-PCR)

En nuestro conocimiento, tras revisar la literatura existente, el análisis de biodistribución con este método, es el primero que se realiza para estudiar la biodistribución del trasplante xenogénico de CSM fucosiladas en modelo NOD/SCID. El uso de dos sondas humanas (β -actina y β_2 -microglobulina) tiene la ventaja de aumentar la sensibilidad de la detección de la expresión de ARNm humano en los órganos y tejidos de ratón disminuyendo de esa forma la tasa de falsos positivos y dándole más valor a los datos en lo que a seguridad de la infusión celular se refiere. Otros grupos han usado la RT-PCR cuantitativa para objetivar la expresión de ARN humano en modelos animales infundidos con CSM (363) o con progenitores multipotenciales de adulto (364).

En ningún caso se observó finalmente material génico humano en los tejidos analizados de los ratones infundidos con CSM humanas fucosiladas fuera del hueso, aunque nuestro estudio tiene la limitación que algunos órganos como la piel no pudieron ser estudiados. Tan solo observamos amplificación significativa de β -actina humana en el bazo de una hembra infundida con CSM fucosiladas sacrificada el 1º día tras la infusión (código: 12N61). Este dato no se vio corroborado con amplificación del ARNm de β_2 -microglobulina. De igual forma, la amplificación de β_2 -microglobulina humana detectada en una muestra de ovario de una hembra infundida con CSM no fucosiladas y sacrificada en la 12ª semana tras la infusión (código: 12N93) así como en la muestra de cerebro de una hembra infundida con CSM fucosiladas y sacrificada en el 2º día post-infusión (código: 12N63) no se vieron corroboradas con la amplificación de β -actina humana. Por tanto se objetivaron 3 falsos positivos. Aunque la qRT-PCR es una técnica muy específica y sensible, tiene el inconveniente de las potenciales contaminaciones y ello hace necesario emplear más de una sonda humana para la detección de material genético humano en estudios animales.

Solamente detectamos amplificación de ambos ARNm en la muestras de pulmón de una hembra infundida con Células Stem Mesenquimales sin fucosilar y sacrificada en la 12ª semana postinfusión (código: 12N104). Esta amplificación puede explicarse por el secuestro temporal que existe en los grandes filtros vasculares del organismo inmediatamente tras la infusión intravenosa de CSM lo que podría facilitar su fagocitosis por células macrofágicas (316;317). La proporción de ratones que mostró amplificación significativa de ARNm humano de las sondas empleadas puede observarse en la tabla 61.

Tabla 61. Resultados cualitativos de amplificación por qRT-PCR de los ratones NOD/SCID del estudio (n=31).

	Número de ratones con amplificación negativa por qRT-PCR en todos los órganos	Número de ratones con amplificación positiva por qRT-PCR al menos en un órgano
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas (n=13)	13	0 (0%)
NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas (n=14)	13	1 (7.1%)
NOD/SCID infundidos con SSF (n=4)	4	0 (0%)

CSM: Células Stem Mesenquimales; SSF: Suero salino fisiológico.

Las CSM de MO humana administradas por vía intravenosa quedan retenidas durante un corto espacio de tiempo en la microvasculatura pulmonar del ratón (366) pasando a la circulación sistémica y dirigiéndose a los capilares de los distintos órganos (sobre todo hígado), lo que ha sido demostrado al detectar células mononucleadas de origen humano en sangre periférica a los 15 minutos postinfusión (367). En nuestro estudio no detectamos CSM fucosiladas de origen humano fuera del hueso del ratón en el estudio de biodistribución a las 24 y 48 horas postinfusión a diferencia de otros estudios en los que se detectó hasta un 0,04 % de CSM de estirpe humana a las 48 horas en hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón (366). Algunos autores han comunicado la persistencia de CSM sin fucosilar a la 1ª semana postinfusión e incluso en un rango que abarca de los 4 a los 13 meses en hueso, médula ósea, bazo, tejido muscular y cartilaginoso, empleando marcaje con Tecnecio-99m (368). Nuestros resultados muestran que en un solo ratón se detectó la presencia de CSM humanas a los 4 meses en tejido pulmonar mientras que no detectamos ARN humano en ningún órgano de los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas lo que puede deberse al mayor tropismo óseo que presentan las CSM fucosiladas derivadas de una mayor afinidad por la E-selectina del endotelio vascular de la médula ósea.

Vilalta M et al estudiaron la biodistribución de CSM humanas de tejido adiposo transfectándolas con luciferasa en un modelo de ratón inmunocomprometida describiendo la persistencia de las CSM en pulmón (1 semana postinfusión) y en hígado (hasta 31 semanas postinfusión) (365). Otros autores han comunicado la presencia de CSM humanas de tejido adiposo en nuestro mismo modelo murino inmunodeprimido NOD/SCID tanto en bazo (durante 1 semanas) como en parénquima pulmonar (hasta 3 meses) (366). Estos datos son menos extrapolables a nuestros hallazgos por emplear CSM de una fuente distinta (tejido adiposo).

En nuestro estudio no hemos evidenciado ningún tipo de “tropismo” diferente al óseo al infundir tanto CSM fucosiladas como sin fucosilar, durante un período mayor de seguimiento (12 meses) y hemos incluido el estudio de las gónadas sin detectar material genético humano de forma análoga a lo publicado por otros autores (369;370). No se observó amplificación alguna de las dos sondas humanas en los órganos examinados, en ninguno de los ratones NOD/SCID infundidos con CSM fucosiladas. Estos resultados contribuyen a reforzar los datos de histología normal de los tejidos descritos anteriormente, lo que en conjunto avala que la infusión intravenosa de CSM fucosiladas es segura.

Por otro lado, los datos expuestos como prueba de concepto de eficacia son lo suficientemente consistentes como para que pueda considerarse que la infusión de CSM fucosiladas pueden constituir una prometedora herramienta terapéutica, para incrementar la osteoblastogénesis, debido a su mayor tropismo por la médula ósea.

Finalmente, nos gustaría destacar que la solidez de estos datos preclínicos en cuanto a la seguridad y eficacia de las células mesenquimales de médula ósea humana fucosiladas, servirán de base científica para la realización de un ensayo clínico fase I en pacientes con osteoporosis y fractura vertebral. Consideramos que en base a los resultados de este estudio preclínico y a las características transitorias de la modificación enzimática (la célula deja de estar fucosilada tras 72h por el propio turnover de las glicoproteínas de membrana), la infusión intravenosa de este tipo celular producido a escala clínica y en condiciones GMP puede constituir un nuevo enfoque terapéutico en la osteoporosis, alterando de forma positiva el balance formación-destrucción ósea patológico. De igual manera, esta aproximación de terapia celular puede aportar una novedosa pauta de infusión, segura, factible y apropiada para numerosas patologías sistémicas en las que la infusión local es insuficiente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. Hemos generado con éxito en nuestro laboratorio un protocolo eficiente para fucosilar “ex vivo” Células Stem Mesenquimales humanas.
2. Nuestra técnica de fucosilación “ex vivo” no modifica las características biológicas de las Células Stem Mesenquimales humanas que mantienen su integridad morfológica, inmunofenotípica, citogenética y funcional
3. La infusión intravenosa de Células Stem Mesenquimales fucosiladas humanas en ratones NOD/SCID mostró un perfil de seguridad óptimo. Los resultados del grupo experimental en términos de bienestar animal y parámetros hemáticos y bioquímicos fueron similares a los obtenidos en los infundidos con Células Stem Mesenquimales sin fucosilar o los infundidos con suero fisiológico, y además tuvieron menos frecuencia de alteraciones histológicas.
4. La infusión intravenosa de Células Stem Mesenquimales fucosiladas humanas en ratones NOD/SCID determina un aumento significativo de la osteoblastogénesis y del número de osteoblastos osteocalcina humana positivos, en comparación con los infundidos con Células Mesenquimales sin fucosilar o suero fisiológico
5. La biodistribución de las Células Stem Mesenquimales fucosiladas humanas en ratones NOD/SCIC fue normal. La evaluación realizada mediante reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción, no demostró expresión de ARNm humano en el corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, gónadas, sistema nervioso central ni sangre periférica de los animales estudiados.
6. La infusión intravenosa de Células Stem Mesenquimales humanas en ratones NOD/SCID es segura y eficaz. Nuestros datos avalan la prueba de concepto de que estas células podrían resultar útiles para el tratamiento de la osteoporosis en seres humanos.

REFERENCIAS

Referencias:

1. National Institutes of Health. NIH consensus statement: osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Consens Statement 2000;17:1-45. 2000.
2. CEBM. Oxford Centre for Evidence-based Medicine -Levels of Evidence (March 2009). 2009 [actualizado Marzo 2009; citado 5 Jul 2013]. Disponible en: <http://www.cebm.net/index.aspx?o=1025>.
3. Perez EL, Alonso RA, Roig VD, Garcia VA, Guanabens GN, Peris P, et al. [2011 Up-date of the consensus statement of the Spanish Society of Rheumatology on osteoporosis]. Reumatol Clin 2011 Nov;7(6):357-79.
4. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2006 position statement of The North American Menopause Society. Menopause 2006 May;13(3):340-67.
5. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser 1994;843:1-129.
6. Martinez-Morillo M, Grados D, Holgado S. Premenopausal osteoporosis: how to treat? Reumatol Clin 2012 Mar;8(2):93-7.
7. Herrera A, Martinez AA, Ferrandez L, Gil E, Moreno A. Epidemiology of osteoporotic hip fractures in Spain. Int Orthop 2006 Feb;30(1):11-4.
8. MELTON LJ III RBL. Epidemiologic features of age-related fractures. Alviloi LV. (ed): The Osteoporotic Syndrome: Detection, Prevention and Treatment. New York, Grune and Stratton, 1983; 45-72. 1983.
9. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int 2006 Dec;17(12):1726-33.
10. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, De LC, Dawson A. Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis. Bone 2000 Nov;27(5):585-90.
11. Strom O, Borgstrom F, Kanis JA, Compston J, Cooper C, McCloskey EV, et al. Osteoporosis: burden, health care provision and opportunities in the EU: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos 2011 Dec;6(1-2):59-155.
12. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int 2013 Jan;24(1):23-57.
13. Diaz CM, Carrasco de la Pena JL, Honorato PJ, Perez CR, Rapado A, Ruiz M, I. Study of bone mineral density in lumbar spine and femoral neck in a Spanish population. Multicentre Research Project on Osteoporosis. Osteoporos Int 1997;7(1):59-64.

14. Díaz CM. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. *Med Clin* 2000 Dec 5.
15. Kanterewicz E, Peris P, Puigoriol E. Prevalence of densitometric osteoporosis and osteopenia in Spain. *Bone* 2011 Mar 1;48(3):667-9.
16. Sanfelix-Genoves J, Reig-Molla B, Sanfelix-Gimeno G, Peiro S, Graells-Ferrer M, Vega-Martinez M, et al. The population-based prevalence of osteoporotic vertebral fracture and densitometric osteoporosis in postmenopausal women over 50 in Valencia, Spain (the FRAVO study). *Bone* 2010 Sep;47(3):610-6.
17. Diaz Lopez JB, Naves DM, Gomez AC, Fernandez Martin JL, Rodriguez RA, Cannata Andia JB. [Prevalence of vertebral fracture in population older than 50 years in Asturias (Spain) defined following different radiological criteria]. *Med Clin (Barc)* 2000 Sep 23;115(9):326-31.
18. Alvarez-Nebreda ML, Jimenez AB, Rodriguez P, Serra JA. Epidemiology of hip fracture in the elderly in Spain. *Bone* 2008 Feb;42(2):278-85.
19. Barbier S, Ecochard R, Schott AM, Colin C, Delmas PD, Jaglal SB, et al. Geographical variations in hip fracture risk for women: strong effects hidden in standardised ratios. *Osteoporos Int* 2009 Mar;20(3):371-7.
20. Wainwright SA, Marshall LM, Ensrud KE, Cauley JA, Black DM, Hillier TA, et al. Hip fracture in women without osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 May;90(5):2787-93.
21. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993 Jun;94(6):646-50.
22. Melton LJ, III. Who has osteoporosis? A conflict between clinical and public health perspectives. *J Bone Miner Res* 2000 Dec;15(12):2309-14.
23. National Osteoporosis Foundation. America's bone health: the state of osteoporosis and low bone mass in our nation. Washington (DC): National Osteoporosis Foundation; 2002.
24. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002 May 18;359(9319):1761-7.
25. Delmas PD, van de Langerijt L, Watts NB, Eastell R, Genant H, Grauer A, et al. Underdiagnosis of vertebral fractures is a worldwide problem: the IMPACT study. *J Bone Miner Res* 2005 Apr;20(4):557-63.
26. Kim N, Rowe BH, Raymond G, Jen H, Colman I, Jackson SA, et al. Underreporting of vertebral fractures on routine chest radiography. *AJR Am J Roentgenol* 2004 Feb;182(2):297-300.
27. Majumdar SR. Quality-improvement interventions for osteoporosis: when are the results worth the effort? *CMAJ* 2012 Feb 21;184(3):279-80.

28. Papaioannou A, Morin S, Cheung AM, Atkinson S, Brown JP, Feldman S, et al. 2010 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada: summary. *CMAJ* 2010 Nov 23;182(17):1864-73.
29. Majumdar SR, Lier DA, McAlister FA, Rowe BH, Siminoski K, Hanley DA, et al. Cost-effectiveness of osteoporosis interventions for 'incidental' vertebral fractures. *Am J Med* 2013 Feb;126(2):169-17. e9-17.
30. Kanis JA. The burden of fractures in the European Union in 2010. *Osteoporos Int* 2012;23 (Suppl 2):S57.
31. Kanis JA, Borgstrom F, De LC, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, et al. Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int* 2005 Jun;16(6):581-9.
32. Fundación Chilena de Osteoporosis [Página principal en internet]. Chile: Sociedad Chilena de Reumatología. Sociedad Chilena de Osteología y metabolismo mineral; c2006 [actualizado 26 Jun 2013; citado 14 Jul 2013]. Guías de diagnóstico, prevención y tratamiento de osteoporosis; [aprox. 3 pantallas]. Disponible en: <http://www.fundop.org/guias%20osteoporosis.pdf>. 2013.
33. Deramond H, Depriester C, Galibert P, Le GD. Percutaneous vertebroplasty with polymethylmethacrylate. Technique, indications, and results. *Radiol Clin North Am* 1998 May;36(3):533-46.
34. Heaney RP. Pathophysiology of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998 Jun;27(2):255-65.
35. Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006 Feb;194(2 Suppl):S3-11.
36. Chevalley T, Bonjour JP, Ferrari S, Rizzoli R. Deleterious effect of late menarche on distal tibia microstructure in healthy 20-year-old and premenopausal middle-aged women. *J Bone Miner Res* 2009 Jan;24(1):144-52.
37. Perez EL, Alonso RA, Roig VD, Garcia VA, Guanabens GN, Peris P, et al. [2011 Up-date of the consensus statement of the Spanish Society of Rheumatology on osteoporosis]. *Reumatol Clin* 2011 Nov;7(6):357-79.
38. Villa ML NL. Race, ethnicity, and osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press; 1996. p. 435-47. 1996.
39. Fang J, Freeman R, Jeganathan R, Alderman MH. Variations in hip fracture hospitalization rates among different race/ethnicity groups in New York City. *Ethn Dis* 2004;14(2):280-4.
40. Kelly PJ, Twomey L, Sambrook PN, Eisman JA. Sex differences in peak adult bone mineral density. *J Bone Miner Res* 1990 Nov;5(11):1169-75.
41. Seeman E. Osteoporosis in men: epidemiology, pathophysiology, and treatment possibilities. *Am J Med* 1993 Nov 30;95(5A):22S-8S.

42. Seeman E. Advances in the study of osteoporosis in men. En: Meunier PJ, editor. Osteoporosis: Diagnosis and management. London: Martin Dunitz; 1998. p. 211–32. 1998.
43. Peris P. Osteoporosis en individuos jóvenes. *Reumatol Clin*. 2010;6:217–23. 2010.
44. Díaz Curiel M. Prevalencia de la osteoporosis densitométrica en la población española. En: Díaz Curiel M, Díez Pérez A, Gómez Alonso C, editores. Nuevas fronteras en el estudio de la densidad ósea en la población española. Madrid: Edimsa; 1996. p.95–117. 1996.
45. Díaz Curiel M, García JJ, Carrasco JL, Honorato J, Pérez Cano R, Rapado A et al. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. *MedClin(Barc)*. 2001;116:86–8. 2001.
46. Riggs BL, Wahner HW, Dunn WL, Mazess RB, Offord KP, Melton LJ, III. Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging: relationship to spinal osteoporosis. *J Clin Invest* 1981 Feb;67(2):328-35.
47. Recker R, Lappe J, Davies K, Heaney R. Characterization of perimenopausal bone loss: a prospective study. *J Bone Miner Res* 2000 Oct;15(10):1965-73.
48. Sowers MR, Jannausch ML, McConnell DS, Kardia SR, Randolph JF, Jr. Endogenous estradiol and its association with estrogen receptor gene polymorphisms. *Am J Med* 2006 Sep;119(9 Suppl 1):S16-S22.
49. Khan A. Premenopausal women and low bone density. *Can Fam Physician* 2006 Jun;52:743-7.
50. Blum M, Harris SS, Must A, Phillips SM, Rand WM, Dawson-Hughes B. Weight and body mass index at menarche are associated with premenopausal bone mass. *Osteoporos Int* 2001;12(7):588-94.
51. Johnston CC. Pathogenesis of postmenopausal osteoporotic fractures. In: Stevenson JC, Lindsay R, eds. Osteoporosis. Chapman & Hall; London, 1998; 53-64. 1998.
52. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 2008 May 3;371(9623):1505-12.
53. Uitterlinden AG, Pols HA, Burger H, Huang Q, Van Daele PL, Van Duijn CM, et al. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res* 1996 Sep;11(9):1241-8.
54. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 1995 Mar 23;332(12):767-73.

55. Albrand G, Munoz F, Sornay-Rendu E, DuBoeuf F, Delmas PD. Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: the OFELY study. *Bone* 2003 Jan;32(1):78-85.
56. Liu JL, Zhang SQ, Zeng HM. Apal, Bsml, FokI and TaqI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of psoriasis: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013 Jun;27(6):739-46.
57. Ji GR, Yao M, Sun CY, Li ZH, Han Z. Bsml, TaqI, Apal and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in Caucasians: a meta-analysis. *Bone* 2010 Sep;47(3):681-6.
58. Pouresmaeli F, Jamshidi J, Azargashb E, Samangouee S. Association between Vitamin D Receptor Gene Bsml Polymorphism and Bone Mineral Density in A Population of 146 Iranian Women. *Cell J* 2013;15(1):75-82.
59. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004 Sep 1;338(2):143-56.
60. Cianferotti L, Brandi ML. Guidance for the diagnosis, prevention and therapy of osteoporosis in Italy. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2012 Sep;9(3):170-8.
61. Melton LJ, Thamer M, Ray NF, Chan JK, Chesnut CH, Einhorn TA, et al. Fractures attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res* 1997 Jan;12(1):16-23.
62. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Dawson A, De LC, Jonsson B. Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporos Int* 2001 Dec;12(12):989-95.
63. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002 Jun 1;359(9321):1929-36.
64. Cooper C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ, III. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res* 1992 Feb;7(2):221-7.
65. Wigderowitz CA, Cunningham T, Rowley DI, Mole PA, Paterson CR. Peripheral bone mineral density in patients with distal radial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 2003 Apr;85(3):423-5.
66. Goulding A, Cannan R, Williams SM, Gold EJ, Taylor RW, Lewis-Barned NJ. Bone mineral density in girls with forearm fractures. *J Bone Miner Res* 1998 Jan;13(1):143-8.
67. Fiorano-Charlier C, Ostertag A, Aquino JP, De Vernejoul MC, Baudoin C. Reduced bone mineral density in postmenopausal women self-reporting premenopausal wrist fractures. *Bone* 2002 Jul;31(1):102-6.

68. Sabatier JP, Guaydier-Souquieres G, Laroche D, Benmalek A, Fournier L, Guillon-Metz F, et al. Bone mineral acquisition during adolescence and early adulthood: a study in 574 healthy females 10-24 years of age. *Osteoporos Int* 1996;6(2):141-8.
69. Nguyen TV, Center JR, Eisman JA. Osteoporosis in elderly men and women: effects of dietary calcium, physical activity, and body mass index. *J Bone Miner Res* 2000 Feb;15(2):322-31.
70. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001 Aug;22(4):477-501.
71. Kim TH, Lee B, Kwon E, Choi CH, Sung IH, Kim Y, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits directly human osteoclastogenesis by down-regulation of the c-Fms and RANK expression. *Joint Bone Spine* 2013 May;80(3):307-14.
72. Kanis JA. The use of calcium in the management of osteoporosis. *Bone* 1999 Apr;24(4):279-90.
73. Nieves JW. Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am J Clin Nutr* 2005 May;81(5):1232S-9S.
74. Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet* 2007 Aug 25;370(9588):657-66.
75. Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN, Mason B, Horne A, Ames R, et al. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomized controlled trial. *BMJ* 2008 Feb 2;336(7638):262-6.
76. Bolland MJ, Avenell A, Baron JA, Grey A, MacLennan GS, Gamble GD, et al. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. *BMJ* 2010;341:c3691.
77. Bolland MJ, Grey A, Reid IR. Re: The calcium scare: what would Austin Bradford Hill have thought? *Osteoporos Int* 2011 Dec;22(12):3079-80.
78. Bolland MJ, Grey A, Avenell A, Gamble GD, Reid IR. Calcium supplements with or without vitamin D and risk of cardiovascular events: reanalysis of the Women's Health Initiative limited access dataset and meta-analysis. *BMJ* 2011;342:d2040.
79. Grey A, Bolland M, Reid R. Calcium supplements and cardiovascular disease--picking the spin. *Int J Clin Pract* 2011 Feb;65(2):226-7.
80. Lewis JR, Zhu K, Prince RL. Adverse events from calcium supplementation: relationship to errors in myocardial infarction self-reporting in randomized controlled trials of calcium supplementation. *J Bone Miner Res* 2012 Mar;27(3):719-22.

81. Pentti K, Tuppurainen MT, Honkanen R, Sandini L, Kroger H, Alhava E, et al. Use of calcium supplements and the risk of coronary heart disease in 52-62-year-old women: The Kuopio Osteoporosis Risk Factor and Prevention Study. *Maturitas* 2009 May 20;63(1):73-8.
82. Okano T. [Vitamin D, K and bone mineral density]. *Clin Calcium* 2005 Sep;15(9):1489-94.
83. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De LC, Eisman JA, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2005 Feb;16(2):155-62.
84. Krall EA, Dawson-Hughes B. Smoking increases bone loss and decreases intestinal calcium absorption. *J Bone Miner Res* 1999 Feb;14(2):215-20.
85. Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. *BMJ* 1997 Oct 4;315(7112):841-6.
86. Hannan MT, Felson DT, Dawson-Hughes B, Tucker KL, Cupples LA, Wilson PW, et al. Risk factors for longitudinal bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2000 Apr;15(4):710-20.
87. Albrand G, Munoz F, Sornay-Rendu E, DuBoeuf F, Delmas PD. Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: the OFELY study. *Bone* 2003 Jan;32(1):78-85.
88. Nilsson M, Ohlsson C, Mellstrom D, Lorentzon M. Previous sport activity during childhood and adolescence is associated with increased cortical bone size in young adult men. *J Bone Miner Res* 2009 Jan;24(1):125-33.
89. Kanis JA, for the World Health Organization Scientific Group. Assessment of Osteoporosis at the Primary Health Care Level. Technical Report. World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases. Sheffield, UK:University of Sheffield,2008:100-131. Disponible en: <http://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.aspx?country=4>.
90. Der Voort DJ, Geusens PP, Dinant GJ. Risk factors for osteoporosis related to their outcome: fractures. *Osteoporos Int* 2001;12(8):630-8.
91. Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Jul;85(7):2355-63.
92. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995 Feb 2;332(5):305-11.

93. Windahl SH, Hollberg K, Vidal O, Gustafsson JA, Ohlsson C, Andersson G. Female estrogen receptor beta-/- mice are partially protected against age-related trabecular bone loss. *J Bone Miner Res* 2001 Aug;16(8):1388-98.
94. Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ. Osteopetrosis. *N Engl J Med* 2004 Dec 30;351(27):2839-49.
95. Khosla S, Melton LJ, Riggs BL. Estrogens and bone health in men. *Calcif Tissue Int* 2001 Oct;69(4):189-92.
96. Rodan GA. Control of bone formation and resorption: biological and clinical perspective. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:55-61.
97. Rodriguez JM (Coordinador). GUÍA de BUENA PRÁCTICA CLÍNICA en Osteoporosis postmenopáusica. Prevención de fracturas por fragilidad [Monografía en internet]. Madrid: International Marketing and Communication; 2011 [accesado 26 Ago 2013]. [aprox. 2-3 pantallas]. Disponible en: https://www.cgcom.es/sites/default/files/gbpc_osteoporosis_postmenopausica.pdf.
98. Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* 2008 Feb;14(2):181-7.
99. Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, Bain SD, Sadovsky Y, Gazit D. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem Suppl* 2001;Suppl 36:144-55.
100. Chen TL, Aronow L, Feldman D. Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture. *Endocrinology* 1977 Mar;100(3):619-28.
101. Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 May 21;318(1):259-64.
102. Wang FS, Lin CL, Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Huang YT, et al. Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass. *Endocrinology* 2005 May;146(5):2415-23.
103. Luppen CA, Leclerc N, Noh T, Barski A, Khokhar A, Boskey AL, et al. Bone morphogenetic protein 2 treatment of glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblasts rescues commitment-associated cell cycle and mineralization without alteration of Runx2. *J Biol Chem* 2003 Nov 7;278(45):44995-5003.
104. Luppen CA, Smith E, Spevak L, Boskey AL, Frenkel B. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J Bone Miner Res* 2003 Jul;18(7):1186-97.

105. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998 Jul 15;102(2):274-82.
106. Cooper C, O'Neill T, Silman A. The epidemiology of vertebral fractures. European Vertebral Osteoporosis Study Group. *Bone* 1993;14 Suppl 1:S89-S97.
107. Kanterewicz E. Anamnesis. Exploración física. Estudio analítico. En: Arboleya L, Pérez L, editores. *Manual de enfermedades óseas* Sociedad Española de Reumatología. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010. p. 65–70. 2010.
108. Brunader R, Shelton DK. Radiologic bone assessment in the evaluation of osteoporosis. *Am Fam Physician* 2002 Apr 1;65(7):1357-64.
109. Faulkner KG, von SE, Miller P. Discordance in patient classification using T-scores. *J Clin Densitom* 1999;2(3):343-50.
110. Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, et al. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* 2004 Jan;34(1):195-202.
111. Sornay-Rendu E, Munoz F, Garnero P, DuBoeuf F, Delmas PD. Identification of osteopenic women at high risk of fracture: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 2005 Oct;20(10):1813-9.
112. Briot K. DXA parameters: Beyond bone mineral density. *Joint Bone Spine* 2013 May;80(3):265-9.
113. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int* 2008 Apr;19(4):385-97.
114. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Strom O, Borgstrom F. Development and use of FRAX in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2010 Jun;21 Suppl 2:S407-S413.
115. Lochmuller EM, Muller R, Kuhn V, Lill CA, Eckstein F. Can novel clinical densitometric techniques replace or improve DXA in predicting bone strength in osteoporosis at the hip and other skeletal sites? *J Bone Miner Res* 2003 May;18(5):906-12.
116. Brunader R, Shelton DK. Radiologic bone assessment in the evaluation of osteoporosis. *Am Fam Physician* 2002 Apr 1;65(7):1357-64.
117. Miller PD. Management of osteoporosis. *Dis Mon* 1999 Feb;45(2):21-54.
118. Link TM, Majumdar S. Osteoporosis imaging. *Radiol Clin North Am* 2003 Jul;41(4):813-39.

119. Cummings SR, Karpf DB, Harris F, Genant HK, Ensrud K, LaCroix AZ, et al. Improvement in spine bone density and reduction in risk of vertebral fractures during treatment with antiresorptive drugs. *Am J Med* 2002 Mar;112(4):281-9.
120. Sarkar S, Mitlak BH, Wong M, Stock JL, Black DM, Harper KD. Relationships between bone mineral density and incident vertebral fracture risk with raloxifene therapy. *J Bone Miner Res* 2002 Jan;17(1):1-10.
121. Watts NB, Cooper C, Lindsay R, Eastell R, Manhart MD, Barton IP, et al. Relationship between changes in bone mineral density and vertebral fracture risk associated with risedronate: greater increases in bone mineral density do not relate to greater decreases in fracture risk. *J Clin Densitom* 2004;7(3):255-61.
122. Lewiecki EM, Baim S, Langman CB, Bilezikian JP. The official positions of the International Society for Clinical Densitometry: perceptions and commentary. *J Clin Densitom* 2009 Jul;12(3):267-71.
123. Leib ES, Lewiecki EM, Binkley N, Hamdy RC. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *South Med J* 2004 Jan;97(1):107-10.
124. Lochmuller EM, Muller R, Kuhn V, Lill CA, Eckstein F. Can novel clinical densitometric techniques replace or improve DXA in predicting bone strength in osteoporosis at the hip and other skeletal sites? *J Bone Miner Res* 2003 May;18(5):906-12.
125. National Osteoporosis Foundation. Physician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Washington (DC): National Osteoporosis Foundation; 2003. p. 1.
126. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ* 1996 May 18;312(7041):1254-9.
127. Stone KL, Seeley DG, Lui LY, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, et al. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 2003 Nov;18(11):1947-54.
128. Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, et al. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* 2004 Jan;34(1):195-202.
129. Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De LC, Delmas P, et al. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res* 2005 Jul;20(7):1185-94.
130. Cummings SR, Cawthon PM, Ensrud KE, Cauley JA, Fink HA, Orwoll ES. BMD and risk of hip and nonvertebral fractures in older men: a prospective study and comparison with older women. *J Bone Miner Res* 2006 Oct;21(10):1550-6.
131. Leslie WD, Tsang JF, Caetano PA, Lix LM. Effectiveness of bone density measurement for predicting osteoporotic fractures in clinical practice. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Jan;92(1):77-81.

132. Nelson HD, Haney EM, Dana T, Bougatsos C, Chou R. Screening for osteoporosis: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2010 Jul 20;153(2):99-111.
133. Baim S, Wilson CR, Lewiecki EM, Luckey MM, Downs RW, Jr., Lentle BC. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry: position paper of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom* 2005;8(4):371-8.
134. Hans D, Downs RW, Jr., DuBoeuf F, Greenspan S, Jankowski LG, Kiebzak GM, et al. Skeletal sites for osteoporosis diagnosis: the 2005 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom* 2006 Jan;9(1):15-21.
135. Hans DB, Shepherd JA, Schwartz EN, Reid DM, Blake GM, Fordham JN, et al. Peripheral dual-energy X-ray absorptiometry in the management of osteoporosis: the 2007 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom* 2008 Jan;11(1):188-206.
136. Nelson HD, Haney EM, Dana T, Bougatsos C, Chou R. Screening for osteoporosis: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2010 Jul 20;153(2):99-111.
137. Hans DB, Shepherd JA, Schwartz EN, Reid DM, Blake GM, Fordham JN, et al. Peripheral dual-energy X-ray absorptiometry in the management of osteoporosis: the 2007 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom* 2008 Jan;11(1):188-206.
138. Kanis JA, Gluer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000;11(3):192-202.
139. Baim S, Wilson CR, Lewiecki EM, Luckey MM, Downs RW, Jr., Lentle BC. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry: position paper of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom* 2005;8(4):371-8.
140. Lewiecki EM, Binkley N, Petak SM. DXA quality matters. *J Clin Densitom* 2006 Oct;9(4):388-92.
141. Bell KJ, Hayen A, Macaskill P, Irwig L, Craig JC, Ensrud K, et al. Value of routine monitoring of bone mineral density after starting bisphosphonate treatment: secondary analysis of trial data. *BMJ* 2009;338:b2266.
142. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Strom O, Borgstrom F. Development and use of FRAX in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2010 Jun;21 Suppl 2:S407-S413.
143. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Strom O, Borgstrom F, Oden A. Case finding for the management of osteoporosis with FRAX--assessment and intervention thresholds for the UK. *Osteoporos Int* 2008 Oct;19(10):1395-408.
144. Gourlay ML, Fine JP, Preisser JS, May RC, Li C, Lui LY, et al. Bone-density testing interval and transition to osteoporosis in older women. *N Engl J Med* 2012 Jan 19;366(3):225-33.

145. Bluc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA* 2009 Feb 4;301(5):513-21.
146. Briot K, Cortet B, Thomas T, Audran M, Blain H, Breuil V, et al. 2012 update of French guidelines for the pharmacological treatment of postmenopausal osteoporosis. *Joint Bone Spine* 2012 May;79(3):304-13.
147. Chapurlat RD, Duboeuf F, Marion-Audibert HO, Kalpakcioglu B, Mitlak BH, Delmas PD. Effectiveness of instant vertebral assessment to detect prevalent vertebral fracture. *Osteoporos Int* 2006;17(8):1189-95.
148. International Society for Clinical Densitometry (ISCD). Middletown; c2013 [actualizado 2004; citado Julio 2013]. Canadian Physician pocket guide to BMD testing [aprox 3-4 pantallas]. Disponible en: <http://www.iscd.org/Visitors/PDFs/ISCDCANADIANPanelOfficialPositions-BMDcard.pdf>.
149. National Osteoporosis Foundation. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. 2008 [acceso Julio 2013]. Disponible en: www.nof.org. 2008.
150. U.S. Preventive Services Task Force. Guide to Clinical Preventive Services 2010 [actualizado 2010; citado Julio 2013]. Disponible en: <http://www.ahrq.gov/clinic/uspstfix.htm>. 2010.
151. Lewiecki EM, Baim S, Langman CB, Bilezikian JP. The official positions of the International Society for Clinical Densitometry: perceptions and commentary. *J Clin Densitom* 2009 Jul;12(3):267-71
152. Panel de expertos del Documento de Consenso 2006 de la SER sobre la osteoporosis posmenopáusica. Documento de Consenso 2006 de la Sociedad Española de Reumatología sobre la osteoporosis posmenopáusica. *Reumatol Clin*. 2007;3 Suppl 1:26-32. 2007.
153. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008 Apr;19(4):399-428.
154. González Macías J, Guañabens Gay N, Gómez Alonso C, Del Río Barquero L, Muñoz Torres M, Delgado M, et al. Guías de práctica clínica en la osteoporosis postmenopáusica, glucocorticoidea y del varón. Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral. *Rev Clin Esp*. 2008;28 Suppl 1:1-24. 2013.
155. National Osteoporosis Guideline Group. NOGG. Sheffield: World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases; 2010 [actualizado Julio 2013]. Disponible en: <http://www.shef.ac.uk/NOGG/>. 2010.
156. Bell KJ, Hayen A, Macaskill P, Irwig L, Craig JC, Ensrud K, et al. Value of routine monitoring of bone mineral density after starting bisphosphonate treatment: secondary analysis of trial data. *BMJ* 2009;338:b2266.

157. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 1994 Nov;4(6):368-81.
158. Kanis JA, Gluer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000;11(3):192-202.
159. Hasserijs R, Karlsson MK, Nilsson BE, Redlund-Johnell I, Johnell O. Prevalent vertebral deformities predict increased mortality and increased fracture rate in both men and women: a 10-year population-based study of 598 individuals from the Swedish cohort in the European Vertebral Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 2003 Jan;14(1):61-8.
160. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA, III, Berger M. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res* 2000 Apr;15(4):721-39.
161. Naves M, Diaz-Lopez JB, Gomez C, Rodriguez-Rebollar A, Rodriguez-Garcia M, Cannata-Andia JB. The effect of vertebral fracture as a risk factor for osteoporotic fracture and mortality in a Spanish population. *Osteoporos Int* 2003 Jul;14(6):520-4.
162. Naves M, Diaz-Lopez JB, Gomez C, Rodriguez-Rebollar A, Serrano-Arias M, Cannata-Andia JB. Prevalence of osteoporosis in men and determinants of changes in bone mass in a non-selected Spanish population. *Osteoporos Int* 2005 Jun;16(6):603-9.
163. Grados F, Fechtenbaum J, Flipon E, Kolta S, Roux C, Fardellone P. Radiographic methods for evaluating osteoporotic vertebral fractures. *Joint Bone Spine* 2009 May;76(3):241-7.
164. Brown JP, Fortier M, Frame H, Lalonde A, Papaioannou A, Senikas V, et al. Canadian Consensus Conference on osteoporosis, 2006 update. *J Obstet Gynaecol Can* 2006 Feb;28(2 Suppl 1):S95-112.
165. Tannenbaum C, Clark J, Schwartzman K, Wallenstein S, Lapinski R, Meier D, et al. Yield of laboratory testing to identify secondary contributors to osteoporosis in otherwise healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Oct;87(10):4431-7.
166. Cerda GD, Peris P, Monegal A, Albaladejo C, Martinez MA, Muxi A, et al. Search for hidden secondary causes in postmenopausal women with osteoporosis. *Menopause* 2010 Jan;17(1):135-9.
167. Eastell R, Hannon RA. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc* 2008 May;67(2):157-62.
168. Garnero P. Bone markers in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2009 Sep;7(3):84-90.
169. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000;11 Suppl 6:S2-17.

170. Diez-Perez A, Gonzalez-Macias J. Inadequate responders to osteoporosis treatment: proposal for an operational definition. *Osteoporos Int* 2008 Nov;19(11):1511-6.
171. Eastell R, Krege JH, Chen P, Glass EV, Reginster JY. Development of an algorithm for using PINP to monitor treatment of patients with teriparatide. *Curr Med Res Opin* 2006 Jan;22(1):61-6.
172. Khosla S, Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover. In: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 5th ed. Kelseyville (CA): American Society for Bone and Mineral Research; 2003. p. 166-71. 2003.
173. Gerdhem P, Ivaska KK, Alatalo SL, Halleen JM, Hellman J, Isaksson A, et al. Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *J Bone Miner Res* 2004 Mar;19(3):386-93.
174. Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, Woitge HW, Seibel MJ, Vaananen HK. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem* 2001 Mar;47(3):597-600.
175. Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 2001 Jan;47(1):74-80.
176. Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De LC, Brown J, et al. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int* 2007 Aug;18(8):1033-46.
177. Briot K. DXA parameters: Beyond bone mineral density. *Joint Bone Spine* 2013 May;80(3):265-9.
178. Kanis JA. Osteoporosis. *Journal of Medical Sciences* (2010); 3(3): 124-130. 2010.
179. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Strom O, Borgstrom F, Oden A. Case finding for the management of osteoporosis with FRAX--assessment and intervention thresholds for the UK. *Osteoporos Int* 2008 Oct;19(10):1395-408.
180. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De LC, Eisman JA, et al. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int* 2005 Jul;16(7):737-42.
181. Kanis JA, Hans D, Cooper C, Baim S, Bilezikian JP, Binkley N, et al. Interpretation and use of FRAX in clinical practice. *Osteoporos Int* 2011 Sep;22(9):2395-411.
182. Van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2000 Jun;15(6):993-1000.
183. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De LC, Eisman JA, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2005 Feb;16(2):155-62.

184. Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(7):CD000333.
185. Chevalley T, Bonjour JP, Ferrari S, Rizzoli R. High-protein intake enhances the positive impact of physical activity on BMC in prepubertal boys. *J Bone Miner Res* 2008 Jan;23(1):131-42.
186. Hind K, Burrows M. Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: a review of controlled trials. *Bone* 2007 Jan;40(1):14-27.
187. Martyn-St JM, Carroll S. Effects of different impact exercise modalities on bone mineral density in premenopausal women: a meta-analysis. *J Bone Miner Metab* 2010 May;28(3):251-67.
188. Michael YL, Whitlock EP, Lin JS, Fu R, O'Connor EA, Gold R. Primary care-relevant interventions to prevent falling in older adults: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2010 Dec 21;153(12):815-25.
189. Gillespie WJ, Gillespie LD, Parker MJ. Hip protectors for preventing hip fractures in older people. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(10):CD001255.
190. Rizzoli R. Nutrition: its role in bone health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008 Oct;22(5):813-29.
191. Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization (2001). Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand. Washington, DC. 2001.
192. Bonjour JP, Gueguen L, Palacios C, Shearer MJ, Weaver CM. Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. *Br J Nutr* 2009 Jun;101(11):1581-96.
193. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Baron JA, Burckhardt P, Li R, Spiegelman D, et al. Calcium intake and hip fracture risk in men and women: a meta-analysis of prospective cohort studies and randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2007 Dec;86(6):1780-90.
194. Prince RL, Devine A, Dhaliwal SS, Dick IM. Effects of calcium supplementation on clinical fracture and bone structure: results of a 5-year, double-blind, placebo-controlled trial in elderly women. *Arch Intern Med* 2006 Apr 24;166(8):869-75.
195. Shea B, Wells G, Cranney A, Zytaruk N, Robinson V, Griffith L, et al. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VII. Meta-analysis of calcium supplementation for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002 Aug;23(4):552-9.
196. Lewis JR, Calver J, Zhu K, Flicker L, Prince RL. Calcium supplementation and the risks of atherosclerotic vascular disease in older women: results of a 5-year RCT and a 4.5-year follow-up. *J Bone Miner Res* 2011 Jan;26(1):35-41.

197. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Stuck AE, Staehelin HB, Orav EJ, et al. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2009 Mar 23;169(6):551-61.
198. Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med* 2006 Feb 16;354(7):669-83.
199. McClung M. Use of highly potent bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2003 Dec;1(3):116-22.
200. Cranney A, Wells GA, Yetisir E, Adami S, Cooper C, Delmas PD, et al. Ibandronate for the prevention of nonvertebral fractures: a pooled analysis of individual patient data. *Osteoporos Int* 2009 Feb;20(2):291-7.
201. Wells GA, Cranney A, Peterson J, Boucher M, Shea B, Robinson V, et al. Etidronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(1):CD003376.
202. Wells GA, Cranney A, Peterson J, Boucher M, Shea B, Robinson V, et al. Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(1):CD001155.
203. Khan SA, Kanis JA, Vasikaran S, Kline WF, Matuszewski BK, McCloskey EV, et al. Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1997 Oct;12(10):1700-7.
204. Cranney A, Guyatt G, Krolicki N, Welch V, Griffith L, Adachi JD, et al. A meta-analysis of etidronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2001;12(2):140-51.
205. Ott SM, Woodson GC, Huffer WE, Miller PD, Watts NB. Bone histomorphometric changes after cyclic therapy with phosphate and etidronate disodium in women with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Apr;78(4):968-72.
206. Black DM, Schwartz AV, Ensrud KE, Cauley JA, Levis S, Quandt SA, et al. Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: the Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): a randomized trial. *JAMA* 2006 Dec 27;296(24):2927-38.
207. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004 Mar 18;350(12):1189-99.
208. Cranney A, Tugwell P, Adachi J, Weaver B, Zytaruk N, Papaioannou A, et al. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis.III. Meta-analysis of risedronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002 Aug;23(4):517-23.

209. Harrington JT, Ste-Marie LG, Brandi ML, Civitelli R, Fardellone P, Grauer A, et al. Risedronate rapidly reduces the risk for nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2004 Feb;74(2):129-35.
210. Watts NB, Josse RG, Hamdy RC, Hughes RA, Manhart MD, Barton I, et al. Risedronate prevents new vertebral fractures in postmenopausal women at high risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Feb;88(2):542-9.
211. Chesnut III CH, Skag A, Christiansen C, Recker R, Stakkestad JA, Hoiseth A, et al. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2004 Aug;19(8):1241-9.
212. Harris ST, Blumentals WA, Miller PD. Ibandronate and the risk of non-vertebral and clinical fractures in women with postmenopausal osteoporosis: results of a meta-analysis of phase III studies. *Curr Med Res Opin* 2008 Jan;24(1):237-45.
213. Reginster JY, Adami S, Lakatos P, Greenwald M, Stepan JJ, Silverman SL, et al. Efficacy and tolerability of once-monthly oral ibandronate in postmenopausal osteoporosis: 2 year results from the MOBILE study. *Ann Rheum Dis* 2006 May;65(5):654-61.
214. Stakkestad JA, Lakatos P, Lorenc R, Sedarati F, Neate C, Reginster JY. Monthly oral ibandronate is effective and well tolerated after 3 years: the MOBILE long-term extension. *Clin Rheumatol* 2008 Aug;27(8):955-60.
215. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007 May 3;356(18):1809-22.
216. Colon-Emeric CS, Mesenbrink P, Lyles KW, Pieper CF, Boonen S, Delmas P, et al. Potential mediators of the mortality reduction with zoledronic acid after hip fracture. *J Bone Miner Res* 2010 Jan;25(1):91-7.
217. Lyles KW, Colon-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, et al. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med* 2007 Nov 1;357(18):1799-809.
218. Agencia Española del Medicamento y productos Sanitarios [Página principal en internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; c2009 [actualizado 16 Ene 2012; citado 16 Ago 2013]. Nota informativa de la AEMPS. Recomendaciones para la prevención de la osteonecrosis del maxilar asociada al tratamiento con bisfosfonatos; [aprox. 3-4 pantallas]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2009/Ni_2009-10_bisfosfonatos.htm.
219. Johnell O, Scheele WH, Lu Y, Reginster JY, Need AG, Seeman E. Additive effects of raloxifene and alendronate on bone density and biochemical markers of bone remodeling in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Mar;87(3):985-92.

220. Cranney A, Tugwell P, Zytaruk N, Robinson V, Weaver B, Adachi J, et al. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IV. Meta-analysis of raloxifene for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002 Aug;23(4):524-8.
221. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, et al. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2006 Jul 13;355(2):125-37.
222. Adomaityte J, Farooq M, Qayyum R. Effect of raloxifene therapy on venous thromboembolism in postmenopausal women. A meta-analysis. *Thromb Haemost* 2008 Feb;99(2):338-42.
223. Barrett-Connor E, Cox DA, Song J, Mitlak B, Mosca L, Grady D. Raloxifene and risk for stroke based on the framingham stroke risk score. *Am J Med* 2009 Aug;122(8):754-61.
224. De Villiers TJ, Chines AA, Palacios S, Lips P, Sawicki AZ, Levine AB, et al. Safety and tolerability of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis: results of a 5-year, randomized, placebo-controlled phase 3 trial. *Osteoporos Int* 2011 Feb;22(2):567-76.
225. Silverman SL, Christiansen C, Genant HK, Vukicevic S, Zanchetta JR, de Villiers TJ, et al. Efficacy of bazedoxifene in reducing new vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis: results from a 3-year, randomized, placebo-, and active-controlled clinical trial. *J Bone Miner Res* 2008 Dec;23(12):1923-34.
226. Greenspan SL, Resnick NM, Parker RA. Combination therapy with hormone replacement and alendronate for prevention of bone loss in elderly women: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003 May 21;289(19):2525-33.
227. Lufkin EG, Wahner HW, O'Fallon WM, Hodgson SF, Kotowicz MA, Lane AW, et al. Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. *Ann Intern Med* 1992 Jul 1;117(1):1-9.
228. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002 Jul 17;288(3):321-33.
229. Overgaard K, Riis BJ, Christiansen C, Hansen MA. Effect of salcatonin given intranasally on early postmenopausal bone loss. *BMJ* 1989 Aug 19;299(6697):477-9.
230. Chesnut CH III, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, et al. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med* 2000 Sep;109(4):267-76.

231. Agencia Española del Medicamento y productos Sanitarios[Página principal en internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; c2013 [actualizado 10 Abr 2013; citado 16 Ago 2013]. Nota informativa de la AEMPS. Calcitonina: Suspensión de la comercialización de los preparados intranasales y restricción del uso de preparados inyectables a tratamientos de corta duración [aprox. 3-4 pantallas]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2013/docs/NI-MUH_FV_09-2013-calcitonina.pdf.
232. Lewiecki EM. Denosumab update. *Curr Opin Rheumatol* 2009 Jul;21(4):369-73.
233. Cummings SR, San MJ, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2009 Aug 20;361(8):756-65.
234. Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, et al. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res* 2009 Jan;24(1):153-61.
235. Seeman E, Delmas PD, Hanley DA, Sellmeyer D, Cheung AM, Shane E, et al. Microarchitectural deterioration of cortical and trabecular bone: differing effects of denosumab and alendronate. *J Bone Miner Res* 2010 Aug;25(8):1886-94.
236. Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, Kendler DL, Wang H, Liu Y, et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 Jun;93(6):2149-57.
237. Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, Cohen SB, Bolognese MA, Liu Y, et al. Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *J Bone Miner Res* 2007 Dec;22(12):1832-41.
238. Von KC, Hopkins R, Anastasilakis A, Toulis K, Goeree R, Tarride JE, et al. Clinical efficacy and safety of denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density and osteoporosis: a meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 2011 Oct;41(2):178-86.
239. Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, Hanley DA, Lindsay R, Zanchetta JR, et al. Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007 Mar 6;146(5):326-39.
240. Body JJ, Gaich GA, Scheele WH, Kulkarni PM, Miller PD, Peretz A, et al. A randomized double-blind trial to compare the efficacy of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] with alendronate in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Oct;87(10):4528-35.
241. Jolette J, Wilker CE, Smith SY, Doyle N, Hardisty JF, Metcalfe AJ, et al. Defining a noncarcinogenic dose of recombinant human parathyroid hormone 1-84 in a 2-year study in Fischer 344 rats. *Toxicol Pathol* 2006;34(7):929-40.

242. Agencia Española del Medicamento y productos Sanitarios[Página principal en internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; c2013 [actualizado 24 Abr 2013; citado 16 Ago 2013]. Nota informativa de la AEMPS. Ranelato de estroncio (Osseor®, Protelos®): Riesgo de Infarto Agudo de Miocardio [aprox. 3-4 pantallas]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2013/docs/NI-MUH_FV_11-2013-ranelato-estroncio.pdf.
243. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004 Jan 29;350(5):459-68.
244. Reginster JY, Seeman E, de Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 May;90(5):2816-22.
245. Jonville-Bera AP, Crickx B, Aaron L, Hartingh I, Autret-Leca E. Strontium ranelate-induced DRESS syndrome: first two case reports. *Allergy* 2009 Apr;64(4):658-9.
246. Pernicova I, Middleton ET, Aye M. Rash, strontium ranelate and DRESS syndrome put into perspective. European Medicine Agency on the alert. *Osteoporos Int* 2008 Dec;19(12):1811-2.
247. Breart G, Cooper C, Meyer O, Speirs C, Deltour N, Reginster JY. Osteoporosis and venous thromboembolism: a retrospective cohort study in the UK General Practice Research Database. *Osteoporos Int* 2010 Jul;21(7):1181-7.
248. International Society for Clinical Densitometry (ISCD). Middletown; c2007 [actualizado 2007; citado 2013]. ISCD Official Positions [aprox 3-4 pantallas]. Disponible en: <http://www.iscd.org/>
249. Delmas PD, Vrijens B, Eastell R, Roux C, Pols HA, Ringe JD, et al. Effect of monitoring bone turnover markers on persistence with risedronate treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Apr;92(4):1296-304.
250. Mazanec DJ, Podichetty VK, Mompoin A, Potnis A. Vertebral compression fractures: manage aggressively to prevent sequelae. *Cleve Clin J Med* 2003 Feb;70(2):147-56.
251. Jensen ME, Evans AJ, Mathis JM, Kallmes DF, Cloft HJ, Dion JE. Percutaneous polymethylmethacrylate vertebroplasty in the treatment of osteoporotic vertebral body compression fractures: technical aspects. *AJNR Am J Neuroradiol* 1997 Nov;18(10):1897-904.
252. Jensen ME, Dion JE. Vertebroplasty relieves osteoporosis pain. *Diagn Imaging (San Franc)* 1997 Sep;19(9):68, 71-68, 72.
253. Levine SA, Perin LA, Hayes D, Hayes WS. An evidence-based evaluation of percutaneous vertebroplasty. *Manag Care* 2000 Mar;9(3):56-60, 63.

254. Buchbinder R, Osborne RH, Ebeling PR, Wark JD, Mitchell P, Wriedt C, et al. A randomized trial of vertebroplasty for painful osteoporotic vertebral fractures. *N Engl J Med* 2009 Aug 6;361(6):557-68.
255. Kallmes DF, Comstock BA, Heagerty PJ, Turner JA, Wilson DJ, Diamond TH, et al. A randomized trial of vertebroplasty for osteoporotic spinal fractures. *N Engl J Med* 2009 Aug 6;361(6):569-79.
256. Klazen CA, Lohle PN, de VJ, Jansen FH, Tielbeek AV, Blonk MC, et al. Vertebroplasty versus conservative treatment in acute osteoporotic vertebral compression fractures (Vertos II): an open-label randomised trial. *Lancet* 2010 Sep 25;376(9746):1085-92.
257. Bernad PM, Garces Puentes MA, Fernandez PA, Frutos MR, Marin AB. [Acute vertebral fracture and vertebral reinforcement techniques]. *Reumatol Clin* 2009 Aug;5 Suppl 2:32-5.
258. Herrera A, Lobo-Escolar A, Mateo J, Gil J, Ibarz E, Gracia L. Male osteoporosis: A review. *World J Orthop* 2012 Dec 18;3(12):223-34.
259. Zhong ZM, Chen JT. Anti-fracture efficacy of risedronic acid in men: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Drug Investig* 2009;29(5):349-57.
260. Orwoll ES, Miller PD, Adachi JD, Brown J, Adler RA, Kendler D, et al. Efficacy and safety of a once-yearly i.v. Infusion of zoledronic acid 5 mg versus a once-weekly 70-mg oral alendronate in the treatment of male osteoporosis: a randomized, multicenter, double-blind, active-controlled study. *J Bone Miner Res* 2010 Oct;25(10):2239-50.
261. Orwoll ES, Scheele WH, Paul S, Adami S, Syversen U, Diez-Perez A, et al. The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003 Jan;18(1):9-17.
262. Peris P, Guanabens N, Martinez de Osaba MJ, Monegal A, Alvarez L, Pons F, et al. Clinical characteristics and etiologic factors of premenopausal osteoporosis in a group of Spanish women. *Semin Arthritis Rheum* 2002 Aug;32(1):64-70.
263. Bhalla AK. Management of osteoporosis in a pre-menopausal woman. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010 Jun;24(3):313-27.
264. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int* 2007 Oct;18(10):1319-28.
265. Weinstein RS. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *N Engl J Med* 2011 Jul 7;365(1):62-70.
266. Reid DM, Devogelaer JP, Saag K, Roux C, Lau CS, Reginster JY, et al. Zoledronic acid and risedronate in the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis (HORIZON): a multicentre, double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. *Lancet* 2009 Apr 11;373(9671):1253-63.

267. Saag KG, Shane E, Boonen S, Marin F, Donley DW, Taylor KA, et al. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 2007 Nov 15;357(20):2028-39.
268. Sambrook PN. Anabolic therapy in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 2007 Nov 15;357(20):2084-6.
269. Sosa HM, Diaz CM, Diez PA, Gomez AC, Gonzalez MJ, Farrerons MJ, et al. [Guide for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Spanish Society of Internal Medicine]. *Rev Clin Esp* 2008 Jan;208(1):33-45.
270. Meseguer Olmo L, Bernabeu Escaplez A, Vallet Regi M, Aznar Cervantes S, Vicente Ortega V, Alcaraz Baños M et al. Ingeniería tisular del tejido óseo. Diseño y desarrollo de materiales híbridos biológicamente activos basados en vitrocerámicas para sustitución ósea. *REVISTA ESPAÑOLA DE CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA*. 2010; 54: 59-68. 2010.
271. Moraleda JM, Blanquer M, Gomez-Espuch J, Iniesta F, Hurtado V, Perez-Espejo MA et al. Terapia con células madre en enfermedades neurodegenerativas. *REVISTA DE HEMATOLOGÍA MEXICANA* 2011;12(3):144-14. 2011.
272. Moraleda Jiménez JM. La terapia celular en enfermedades no hematológicas: ¿sueño o realidad?. *REVISTA DE HEMATOLOGÍA MEXICANA* 2011;12(4):239-241.
273. Insausti CL, Blanquer M, Majado MJ, Insausti A, Moraleda JM. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. *REVISTA DE HEMATOLOGÍA MEXICANA* 2011;11(4):276-286.
274. Alcaraz A, Mrowiec A, Insausti CL, Garcia-Vizcaino EM, Ruiz-Canada C, Lopez-Martinez MC, et al. Autocrine TGF-beta induces epithelial to mesenchymal transition in human amniotic epithelial cells. *Cell Transplant* 2013;22(8):1351-67.
275. Aznar-Cervantes S, Roca MI, Martinez JG, Meseguer-Olmo L, Cenis JL, Moraleda JM, et al. Fabrication of conductive electrospun silk fibroin scaffolds by coating with polypyrrole for biomedical applications. *Bioelectrochemistry* 2012 Jun;85:36-43.
276. Blanquer M, Perez Espejo MA, Iniesta F, Gomez EJ, Meca J, Villaverde R, et al. [Bone marrow stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: technical aspects and preliminary results from a clinical trial]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2010 Dec;32 Suppl A:31-7.
277. Blanquer M, Perez-Espejo MA, Martinez-Lage JF, Iniesta F, Martinez S, Moraleda JM. A surgical technique of spinal cord cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Methods* 2010 Aug 30;191(2):255-7.
278. Blanquer M, Moraleda JM, Iniesta F, Gomez-Espuch J, Meca-Lallana J, Villaverde R, et al. Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study. *Stem Cells* 2012 Jun;30(6):1277-85.

279. Bueno C, Ramirez C, Rodriguez-Lozano FJ, Tabares-Seisdedos R, Rodenas M, Moraleda JM, et al. Human adult periodontal ligament-derived cells integrate and differentiate after implantation into the adult mammalian brain. *Cell Transplant* 2013;22(11):2017-28.
280. Garcia Santos JM, Blanquer M, Torres del RS, Iniesta F, Espuch JG, Perez-Espejo MA, et al. Acute and chronic MRI changes in the spine and spinal cord after surgical stem cell grafting in patients with definite amyotrophic lateral sclerosis: post-infusion injuries are unrelated with clinical impairment. *Magn Reson Imaging* 2013 Oct;31(8):1298-308.
281. Gonzalez-Garcia M, Rodriguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodriguez-Gonzalez MA, Onate-Sanchez R, et al. Mesenchymal stem cells and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the future? *Oral Dis* 2012 Nov;18(8):823-4.
282. Gonzalez-Garcia M, Rodriguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodriguez-Gonzalez MA, Onate-Sanchez R, et al. Cell therapy in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg* 2013 May;24(3):e226-e228.
283. Insausti CL, Alcaraz A, Garcia-Vizcaino EM, Mrowiec A, Lopez-Martinez MC, Blanquer M, et al. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen* 2010 Jul;18(4):368-77.
284. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 2010 Jan;25(1):91-8.
285. Insausti CL, Blanquer MB, Olmo LM, Lopez-Martinez MC, Ruiz XF, Lozano FJ, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the fat layer on the density gradient separated bone marrow. *Stem Cells Dev* 2012 Jan 20;21(2):260-72.
286. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Ruiz F, Bonilla S, et al. Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transpl Immunol* 2006 Dec;17(1):74-7.
287. Pastor D, Viso-Leon MC, Jones J, Jaramillo-Merchan J, Toledo-Aral JJ, Moraleda JM, et al. Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF expression and motor function recovery in a motoneuron degenerative mouse model. *Stem Cell Rev* 2012 Jun;8(2):445-58.
288. Pastor D, Viso-Leon MC, Botella-Lopez A, Jaramillo-Merchan J, Moraleda JM, Jones J, et al. Bone marrow transplantation in hindlimb muscles of motoneuron degenerative mice reduces neuronal death and improves motor function. *Stem Cells Dev* 2013 Jun 1;22(11):1633-44.
289. Rodriguez-Lozano FJ, Moraleda JM. Use of dental stem cells in regenerative dentistry: a possible alternative. *Transl Res* 2011 Dec;158(6):385-6.
290. Rodriguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramirez MC, Blanquer M, et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J* 2011 Sep;44(9):800-6.

291. Rodriguez-Lozano FJ, Insausti CL, Meseguer L, Ramirez MC, Martinez S, Moraleda JM. Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation. *J Craniofac Surg* 2012 Nov;23(6):e571-e575.
292. Rodriguez-Lozano FJ, Insausti CL, Iniesta F, Blanquer M, Ramirez MD, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012 Nov;17(6):e1062-e1067.
293. Rodriguez-Lozano FJ, Serrano-Belmonte I, Perez Calvo JC, Coronado-Parra MT, Bernabeu-Esclapez A, Moraleda JM. Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression). *J Mater Sci Mater Med* 2013 Apr;24(4):979-88.
294. Rodriguez Lozano FJ, Moraleda JM. Mesenchymal dental pulp stem cells: a new tool in sinus lift. *J Craniofac Surg* 2011 Mar;22(2):774-5.
295. Perez-Simon JA, Lopez-Villar O, Andreu EJ, Rifon J, Muntion S, Campelo MD, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica* 2011 Jul;96(7):1072-6.
296. Perez-Ilzarbe M, Diez-Campelo M, Aranda P, Tabera S, Lopez T, Del CC, et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion* 2009 Sep;49(9):1901-10.
297. Sanchez PL, Sanchez-Guijo FM, Villa A, Del CC, Arnold R, San Roman JA, et al. Launching a clinical program of stem cell therapy for cardiovascular repair. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007 Feb;4 Suppl 1:S123-S129.
298. Carrancio S, Romo C, Ramos T, Lopez-Holgado N, Muntion S, Prins HJ, et al. Effects of MSC coadministration and route of delivery on cord blood hematopoietic stem cell engraftment. *Cell Transplant* 2013;22(7):1171-83.
299. Carrancio S, Blanco B, Romo C, Muntion S, Lopez-Holgado N, Blanco JF, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells for improving hematopoietic function: an in vitro and in vivo model. Part 2: Effect on bone marrow microenvironment. *PLoS One* 2011;6(10):e26241.
300. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968 Mar;6(2):230-47.
301. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Feb 3;95(3):1142-7.
302. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* 1968 Jul 5;161(3836):54-6.

303. Galian-Canovas A. Respuesta biológica del hueso al composite HA-Colágeno. Estudio morfológico y ultraestructural. 1995. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 1995.
304. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. Clin Orthop Relat Res 1995 Apr;(313):8-18.
305. De BC, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. Arthritis Rheum 2006 Apr;54(4):1209-21.
306. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. J Bone Joint Surg Br 2005 Jul;87(7):896-902.
307. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. Clin Orthop Relat Res 1995 Apr;(313):8-18.
308. Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Maeshima K, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. Arthritis Rheum 2011 Jun;63(6):1658-67.
309. Gazit Z. Mesenchymal stem cells. En Atala A, Lanza R, Thomson J, Nerem R. Principles of Regenerative Medicine.2008:318-343. 2008.
310. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. J Bone Joint Surg Br 2005 Jul;87(7):896-902.
311. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. Nat Med 1999 Mar;5(3):309-13.
312. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. Blood 2001 Mar 1;97(5):1227-31.
313. Horwitz EM. Marrow mesenchymal cell transplantation for genetic disorders of bone. Cytotherapy 2001;3(5):399-401.
314. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, 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 U S A 2002 Jun 25;99(13):8932-7.
315. Otsuru S, Gordon PL, Shimono K, Jethva R, Marino R, Phillips CL, et al. Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. Blood 2012 Aug 30;120(9):1933-41.

316. Panaroni C, Gioia R, Lupi A, Besio R, Goldstein SA, Kreider J, et al. In utero transplantation of adult bone marrow decreases perinatal lethality and rescues the bone phenotype in the knockin murine model for classical, dominant osteogenesis imperfecta. *Blood* 2009 Jul 9;114(2):459-68.
317. Xu C, Miranda-Nieves D, Ankrum JA, Matthiesen ME, Phillips JA, Roes I, et al. Tracking mesenchymal stem cells with iron oxide nanoparticle loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Nano Lett* 2012 Aug 8;12(8):4131-9.
318. Landazuri N, Tong S, Suo J, Joseph G, Weiss D, Sutcliffe DJ, et al. Magnetic targeting of human mesenchymal stem cells with internalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Small* 2013 Dec 9;9(23):4017-26.
319. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Cote D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 2005 Jun 16;435(7044):969-73.
320. Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Curr Opin Hematol* 2005 Nov;12(6):444-50.
321. Sackstein R. The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the 'step 2-bypass pathway' and other emerging perspectives. *Curr Opin Hematol* 2011 Jul;18(4):239-48.
322. Sackstein R. The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cell homing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004 Sep;9(3):215-23.
323. Sackstein R. The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cell homing. *J Invest Dermatol* 2004 May;122(5):1061-9.
324. Sackstein R, Fuhlbrigge R. The blot rolling assay: a method for identifying adhesion molecules mediating binding under shear conditions. *Methods Mol Biol* 2006;341:217-26.
325. Sackstein R, Fuhlbrigge R. Western blot analysis of adhesive interactions under fluid shear conditions: the blot rolling assay. *Methods Mol Biol* 2009;536:343-54.
326. Sackstein R. Directing stem cell trafficking via GPS. *Methods Enzymol* 2010;479:93-105.
327. Sackstein R. Glycoengineering of HCELL, the human bone marrow homing receptor: sweetly programming cell migration. *Ann Biomed Eng* 2012 Apr;40(4):766-76.
328. Thankamony SP, Sackstein R. Enforced hematopoietic cell E- and L-selectin ligand (HCELL) expression primes transendothelial migration of human mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Feb 8;108(6):2258-63.
329. Moraleda JM, Cabañas-Perianes V, López-Lucas MD, García-Hernández A, Blanquer M, Gómez-Espuch J et al. Fucosylated mesenchymal stem cell to treat systemic bone diseases. En: Libro de Abstracts: European Society of Gene and Cell Therapy. Sociedad Española de Terapia Génica y Celular. Collaborative Congress 2013. Madrid; Palacio Municipal de Congresos de Madrid/Campo de las Naciones;2013.p.A26.

330. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
331. Baumans,V. The welfare of laboratory mice. En: Kaliste,E,editora. The welfare of Laboratory Animals.Dordrecht: Springer; 2007. p.119-52. 2007.
332. BOE (2005). Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE 252 (21 Octubre 2005): 34367-91. 2005.
333. BOE (2007). Ley 32/2007 para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. BOE 268 (8 Noviembre 2007): 45914-20. 2007.
334. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. 2010.
335. Harlan laboratories [Página principal en internet]. Indianapolis; c2012 [actualizado 29 Jun 2013; citado 29 Jun 2013]. NOD/SCID mice; [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/nodscid_mice.hl. 2011.
336. The Jackson Laboratory [Página principal en internet]. Maine; c2013 [actualizado 30 Jun 2013; citado 30 Jun 2013]. Mouse Phenome Database. Phenotype data > NOD.CB17-Prkdcscid/J strain [aprox. 4 pantallas]. Disponible en: <http://phenome.jax.org/>
337. Mateu E, Casal J. Tamaño de la muestra. *Rev. Epidem. Med. Prev.* (2003), 1: 8-14. 2003.
338. Lloyd and Wolfensohn (1998) Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research.In: Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research, Proceedings of the International Conference,22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. (Hendricksen C.F.M. and Morton D.S. eds). London UK: Royal Society of Medicine Press, pp.48-53. 1998.
339. Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) [Página principal en internet]. Madrid: Comité Etico de Experimentación Animal Centro Nacional de Biotecnología-CSIC; c2007 [actualizado Mayo 2007; citado 30 Jun 2013]. Técnicas de obtención e inoculación de muestras; [2 pantallas]. Disponible en: <http://www.cnb.csic.es/~animalario/CEEA.html>. 2007.
340. Hackbarth H, Kuppers N, Bohnet W. Euthanasia of rats with carbon dioxide--animal welfare aspects. *Lab Anim* 2000 Jan;34(1):91-6.

341. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Cuyo [Página principal en internet]. Washington DC: Institute of Laboratory Animal Resources Edición Mexicana; c1996 [actualizado 29 Jun 2013; citado 29 Jun 2013]. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio; [aprox. 3 pantallas]. Disponible en: <http://www.fcm.uncu.edu.ar/joomla/>. 2013.
342. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000 Oct;25(2):169-93.
343. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002 Jun;30(6):503-12.
344. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
345. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005 Oct;109(4):365-79.
346. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997 Jan;22(1):130-8.
347. Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van WO, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* 2009;60(2):487-93.
348. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1(3):1559-82.
349. Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 2008 Jul;20(7):1736-7.
350. De Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005 Jan;85(1):154-9.
351. Lossos IS, Czerwinski DK, Wechser MA, Levy R. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia* 2003 Apr;17(4):789-95.
352. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Jan 23;313(4):856-62.
353. Schmid H, Cohen CD, Henger A, Irrgang S, Schlondorff D, Kretzler M. Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int* 2003 Jul;64(1):356-60.
354. Kobzdej MM, Leppanen A, Ramachandran V, Cummings RD, McEver RP. Discordant expression of selectin ligands and sialyl Lewis x-related epitopes on murine myeloid cells. *Blood* 2002;100: 4485-94.

355. Xia L, McDaniel JM, Yago T, Doeden A, McEver RP. Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. *Blood* 2004;104: 3091–6.
356. Hidalgo A, Frenette PS. Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow. *Blood* 2005;105:567–75.
357. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007 Aug;47(8):1436-46.
358. Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ, Rifón J, Muntion S, Campelo MD et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):1072-6.
359. Sánchez-Guijo FM, López-Villar O, López-Anglada L, Villarón EM, Muntión S, Díez-Campelo M et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for refractory cytopenias after hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion*. 2012 May;52(5):1086-91.
360. Ma LJ, Hu XX, Zhou H, Gao L, Qiu HY, Wang JM. [Hematopoietic reconstitution by co-transplantation of human BM-MSCs and UCB CD34+ cells at various times in NOD/SCID mice]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2008 Apr;16(2):355-9.
361. Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE, Rinder HM, Civin C, Cheng L et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2003 May;31(5):413-20.
362. Schweitzer KM, , Dräger AM, Van der Valk P, Thijsen SF, Zevenbergen A, Theijssmeijer AP et al. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol*. 1996 Jan;148(1):165-75.
363. Carrancio S, Blanco B, Romo C, Muntion S, Lopez-Holgado N, Blanco JF et al. Bone marrow mesenchymal stem cells for improving hematopoietic function: an in vitro and in vivo model. Part 2: Effect on bone marrow microenvironment. *PLoS One*. 2011;6(10):e26241.
364. Aranguren XL, Luttun A, Clavel C, Moreno C, Abizanda G, Barajas MA et al. In vitro and in vivo arterial differentiation of human multipotent adult progenitor cells. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2634-42.
365. Vilalta M, Dégano IR, Bagó J, Gould D, Santos M, García-Arranz M et al. Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev*. 2008 Oct;17(5):993-1003.
366. Sensebé L, Fleury-Cappellesso S. Biodistribution of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in a Preclinical Setting. *Stem Cells Int*. 2013;2013:678063. Epub 2013 Oct 10. Review.

367. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009 Jul 2;5(1):54-63.
368. Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell JJ, Conget PA. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*. 2004 Aug 27;78(4):503-8.
369. Toupet K, Maumus M, Peyrafitte JA, Bourin P, van Lent PL, Ferreira R et al. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis Rheum*. 2013 Jul;65(7):1786-94.
370. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003Dec;5(12):1028-38.

ANEXO I: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS GENÉTICOS Y DE INVESTIGACIÓN.

Nº HISTORIA

Don/Doña de años de edad.
(Nombre y dos apellidos del paciente)

con domicilio en y D.N.I. nº

Don/Doña de años de edad.
(Nombre y dos apellidos)

con domicilio en y D.N.I. nº

en calidad de de
(Representante legal, familiar o allegado) (Nombre y dos apellidos del paciente)

DECLARO

Que el DOCTOR/A
(Nombre y dos apellidos del facultativo que facilita la información)

me ha informado del procedimiento relativo a la DONACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE, TEJIDOS Y/O CÉLULAS PARA UTILIZARLOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN.

Me ha explicado que la investigación científica requiere hoy día obtener el mayor número posible de muestras de sangre, tejidos, células y/o fluidos procedentes de donantes sanos y personas que padecen ciertas enfermedades, con objeto de estudiar en ellas determinadas variantes genéticas así como otras características biológicas específicas. El estudio en profundidad de estas muestras biológicas puede ser beneficioso para los pacientes donantes de las mismas y para sus familiares por generar datos directamente relacionados con su salud. Además, este tipo de investigación es de un gran valor para la sociedad, por permitir el avance de la Medicina y lograr con ello una mayor prevención y curación de las enfermedades en el futuro.

Se me ha informado que la finalidad de este procedimiento es recoger, procesar y almacenar una o varias muestras biológicas, de entre aquellas que se obtendrán mediante los procedimientos diagnósticos y terapéuticos del manejo médico habitual de mi enfermedad. La donación de estas muestras es totalmente altruista, ha sido autorizada en su protocolo por el comité ético correspondiente y no supone ningún riesgo especial añadido para mi salud. Una vez extraídas mis muestras, éstas serán registradas y almacenadas en el Biobanco de Tumores de, Allí todas las muestras indicadas serán procesadas para realizar diversos estudios genéticos y celulares, pudiendo incluir la experimentación con modelos animales de enfermedad, bien al momento, o bien en el futuro, en cuyo caso serán conservadas durante el tiempo que la ley determine.

¿CÓMO SE ESCOGEN LOS DONANTES?

Se les propone donar una muestra de médula ósea de 10-20 ml a pacientes de traumatología que vayan a ser intervenidos quirúrgicamente bajo anestesia general o raquianestesia, de forma que la obtención de médula no les supone ningún dolor ni interfiere con el manejo habitual de su patología quirúrgica. Se seleccionarán pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 18-85 años, con serología viral negativa y sin enfermedad infecciosa ni neoplásica activa. La obtención de la muestra sólo se realizará si las condiciones de trabajo en quirófano lo permiten.

¿CÓMO SE REALIZA LA EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA?

La extracción se realizará en el quirófano de traumatología, una vez anestesiado el paciente y preferentemente antes de la intervención quirúrgica, si las condiciones de quirófano lo permiten. La extracción será realizada por hematólogos de la Unidad de Terapia Celular o por el propio traumatólogo que realiza la intervención, mediante una punción de la cresta ilíaca (hueso de la pelvis), totalmente indolora para el paciente anestesiado. La cantidad de médula ósea que se extrae será de 10-20 ml. Los riesgos que comporta la extracción son muy pequeños, menos del 0.5 por 100 y podrían incluir aparición de un pequeño hematoma en el sitio de punción, posibilidad de infección en el sitio de punción y raramente la lesión de algún tejido local. El organismo no advierte ningún síntoma por la carencia de esta médula, que se recupera inmediatamente. No es necesario tomar ninguna medida adicional en el tratamiento excepto el que le prescriba el traumatólogo por su patología de base.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Me han informado que las muestras serán registradas de forma privada y anónima, y sólo podrán correlacionarse con cada paciente mediante unos códigos confidenciales, que tan sólo conocerá el personal autorizado, responsable del fichero. De esta manera queda garantizada la privacidad y confidencialidad de mis datos, obtenidos a raíz de las investigaciones realizadas, de acuerdo con la legislación vigente.

Asimismo, se me ha advertido que es posible que se obtenga información de especial relevancia para mi salud y la de mis familiares, en cuyo caso seré debidamente informado y asistido en el debido consejo genético, salvo que exprese mi preferencia contraria a dicha comunicación.

En el caso de que la información sea relevante para mis familiares, se me ha indicado la necesidad de informar a estos y la conveniencia de transmitirles yo personalmente dicha información.

También se me ha comunicado el derecho que me asiste a conocer los resultados que se obtengan a partir de los análisis de las muestras donadas, en el momento en que lo solicite, incluso aunque no fueran relevantes para mi salud o el tratamiento de mi enfermedad.

Me ha informado asimismo de que las muestras biológicas almacenadas no serán cedidas o distribuidas a terceros con fines comerciales o distintos a los que expresamente quedan autorizados por medio de este consentimiento, tal y como la ley establece.

Las muestras sólo podrán ser cedidas a grupos cooperativos de investigación científica u otros biobancos siempre que se cumplan los requisitos de confidencialidad que marca la legislación vigente en materia de investigación biomédica y protección de datos personales, de manera que se mantenga su anonimato y no sea, por tanto, posible mi identificación personal.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto y sin que eso pudiera repercutir bajo ningún concepto en la asistencia sanitaria que deba recibir. He comprendido las explicaciones que me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo y el facultativo que me ha atendido me ha dado la oportunidad de formular todas las observaciones que he considerado oportunas, y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho/a con la información recibida y que comprendo adecuadamente el alcance de la donación de muestras biológicas objeto de este consentimiento. En vista de lo cual...

CONSENTIMIENTO

En DONAR MUESTRAS DE MI SANGRE, TEJIDOS, FLUÍDOS Y/O CÉLULAS PARA UTILIZARLOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.

En.....(Lugar y fecha)

Fdo: El/la Médico

Fdo: El Paciente

Fdo: El representante legal,
familiar o allegado

REVOCACIÓN

Don/Doña de años de edad.
(Nombre y dos apellidos del paciente)

con domicilio en y D.N.I. nº

Don/Doña de años de edad
(Nombre y dos apellidos)

con domicilio en y D.N.I. nº

en calidad de de
(Representante legal, familiar o allegado) (Nombre y dos apellidos del paciente)

REVOCO el consentimiento prestado en fecha, y no deseo proseguir
el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En.....(Lugar y fecha)

Fdo: El/la Médico

Fdo: El Paciente

Fdo: El representante legal,
familiar o allegado

ANEXO II: DICTAMEN FAVORABLE DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEEa) DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA.



CeeA - Arrixaca
Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca"



Página 1 de 1

Comité de Ética de Experimentación Animal. Animalario Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca
Ctra. Madrid- Cartagena, s/n. 30120 El Palmar, Murcia
Tfno: 968.36.94.93. E-mail: ceea.arrixaca@cam.es

El Comité Ético de Experimentación Animal (CEEa) del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

1º Que una vez recibida la documentación del investigador **D. José María Moraleda**, ha evaluado la propuesta referida al proyecto: *"Infusión sistémica de células mesenquimales de médula ósea humanas fucosiladas en un modelo murino inmunodeprimido. Estudios preclínicos de seguridad y eficacia"*.

2º Que considera que el proyecto presentado respeta los principios éticos básicos recogidos en la legislación actual vigente* sobre protección de animales utilizados en investigación y otros fines científicos.

3º Por lo que emite un **INFORME FAVORABLE** teniendo éste una validez que se corresponderá con la duración prevista en la memoria, siendo el máximo de 3 años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho procedimiento**

Lo que firma en Murcia a 27 de Abril de 2012.

Dr. Dña. Olga Mª Fernández Rodríguez.
Secretaria del CEEa.
Asesor en Salud y Bienestar Animal, Categoría D-FELASA.

*RD 1201/2005 de 10 de Octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, Ley 32/2007 para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

** En caso de que el investigador modificara de forma relevante su procedimiento deberá efectuar una nueva comunicación, o solicitud de autorización al CEEa. RD 1201/2005: Modificación relevante:

I) Aumento en el número de animales que se vayan a utilizar, en el caso de especies protegidas.
II) Empleo de una nueva especie protegida.
III) Aumento significativo en el número de animales que se vayan a utilizar de especies no protegidas.
IV) Aumento del dolor o del sufrimiento del animal.
V) Cambios en el lugar en el que se prevé realizar el procedimiento.

ANEXO III: PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO PARA LA FASE DE RECEPCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS RATONES AL ANIMALARIO.

HOJA DE TRABAJO DE LOS DÍAS DE ACONDICIONAMIENTO DE LOS RATONES NOD/SCID

1. Imprimir hoja de trabajo del día y coger las fichas identificativas de los ratones.
2. Colocación de calzas, bata estéril, guantes y mascarilla para entrar a la zona del animalario.
3. Conectar la campana del animalario y encender las luces de la misma. Esperar durante 15 minutos a la ventilación de la misma.
4. Coger la balanza del animalario, desinfectar con alcohol e introducir en la campana.
5. Coger el perforador, desinfectar con alcohol e introducir en la campana.
6. Coger las jaulas con los ratones NOD/SCID que estarán debidamente identificadas con la siguiente etiqueta: Valentín. NOD/SCID, número de jaula identificativa, número de animales y sexo de los mismos.
7. Introducir la jaula en la campana y proceder a coger cada ratón NOD/SCID para ser evaluado de forma independiente en el menor plazo de tiempo posible, para disminuir el tiempo de exposición fuera de la jaula.
8. Con guantes estériles se coge al ratón y sujetándolo con la mano izquierda de la cola lo apoyamos en la rejilla y posteriormente lo sujetamos por los omóplatos para inmovilizarlo y girarlo para facilitar la perforación de la oreja.
9. Con el perforador realizaremos un agujero en la oreja del ratón con el objetivo de identificarlos. Al ratón que le perforemos la oreja izquierda, se le asignará la letra A en la ficha identificativa. Al que le perforemos la oreja derecha, se le asignará la letra B y al que no se perfore la letra C.
10. Se procederá al examen de los mismos, comprobando los siguientes ítems para anotar el score (Anexo en ficha de cada ratón):
 - a. Aspecto externo mediante inspección visual de cada uno:
 - i. Normal
 - ii. Muy sucio (implica no lavado por parte del animal)
 - iii. Secreciones nasales, oculares, óticas.
 - iv. Piloerección o pelo encorvado.

- b. Ingesta de comida (Pesar al ratón en la balanza, tras realizar previamente la tara) :
 - i. Normal
 - ii. Incierta: disminución del peso del 5% con respecto al peso a la recepción.
 - iii. Poca ingesta: disminución del peso del 5-15% con respecto al peso a la recepción.
 - iv. No ingesta de agua ni comida: signos de deshidratación + disminución del peso del 5-15% con respecto al peso a la recepción.
- c. Signos clínicos:
 - i. Afebril con respiración y frecuencia cardíaca normales.
 - ii. Cambios sutiles en algunos de los parámetros anteriores que no lleguen a los criterios de los siguientes ítems.
 - iii. Temperatura $>1^{\circ}\text{C}$ con respecto a normal o aumento de FC o FR de un 30% con respecto a la normalidad.
 - iv. Temperatura $>2^{\circ}\text{C}$ con respecto a normal o aumento de FC o FR de un 50% con respecto a la normalidad.
- d. Comportamiento espontáneo:
 - i. Normal.
 - ii. Leve disminución en movilidad y alerta.
 - iii. Poca movilidad y alerta. Aislado del resto de ratones.
 - iv. Temperatura $>2^{\circ}\text{C}$ con respecto a normal o aumento de FC o FR de un 50% con respecto a la normalidad.
- e. Comportamiento espontáneo:
 - i. Normal.
 - ii. Leve disminución en movilidad y alerta.
 - iii. Poca movilidad y alerta. Aislado del resto de ratones.
 - iv. Signos de automutilación o inquietud muy manifiesta o ausencia total de movimiento.
- f. Comportamiento provocado:
 - i. Normal.
 - ii. Respuesta algo exagerada o disminuida a la estimulación.
 - iii. Cambios moderados en comportamiento (no movilidad a la estimulación).

- iv. Reacción muy violenta a la provocación, estado precomatoso, debilidad muy manifiesta.
- g. Una vez identificado cada uno de los ítems, calcularemos el score y lo anotaremos en la ficha identificativa del ratón.
- h. Al concluir con todos los ratones, volveremos a colocar las jaulas en su ubicación anterior.

Elaborado por: Dr. Valentín Cabañas

Autorizada la emisión por: Dr. José María Moraleda

ANEXO IV: FICHA IDENTIFICATIVA DE RATONES NOD/SCID.

RATON NOD/SCID	
A = orificio oreja izq, B= orificio oreja derecha, C:= sin orificio en oreja.	
DATOS DE RECEPCIÓN	
ID/ JAULA	PESO
SEXO	MOVILIDAD
CÓDIGO	ASPECTO EXTERNO
DÍAS DE ACONDICIONAMIENTO	
MOVILIDAD	
ASPECTO EXTERNO	
PESO PREVIO A INFUSIÓN (g)	
SCORE PREVIO A INFUSIÓN ANEXO	
INFUSIÓN	
MSCh-fucosiladas o SSF 0.9%	
Número de MSCh-f infundidas	
VOLUMEN INFUNDIDO	
PUNCIÓN	
COMPLICACIONES	
SCORE TOXICIDAD AGUDA (ANEXO)	
5 MIN	2 HORAS
10 MIN	3 HORAS
15 MIN	4 HORAS
30 MIN	1 DÍA
1 HORA	2 DÍAS
SCORE TOXICIDAD CRÓNICA (ANEXO)	
1 SEMANA	7 SEMANAS
2 SEMANAS	9 SEMANAS
5 SEMANAS	12 SEMANAS

PESO	
1 DÍA	5 SEMANAS
2 DÍAS	7 SEMANAS
1 SEMANA	9 SEMANAS
2 SEMANAS	12 SEMANAS
SACRIFICIO	
DÍA SACRIFICIO +	
ANÁLISIS BIOQUÍMICO HEMATOLÓGICO	
Glucosa	Hb
Urea	Plaquetas
Creatinina	Leucocitos
GOT	Neutrófilos
GPT	Linfocitos
Calcio	Monocitos
Fósforo	Eosinófilos
FA ósea	Basófilos
C-Txo Beta Cross	
MUESTRAS OBTENIDAS qPCR	
Sangre intracardiaca (0)	Riñón (5)
Corazón (1)	Gónada (6)
Pulmón (2)	Cerebro (7)
Hígado (3)	Médula ósea (8)
Bazo (4)	Calota (9)
MUESTRAS OBTENIDAS HISTOLOGÍA	
Sangre intracardiaca (0)	Riñón (5)
Corazón (1)	Gónada (6)
Pulmón (2)	Cerebro (7)
Hígado (3)	Médula ósea (8)
Bazo (4)	Calota (9)

RESULTADOS qPCR	
<i>Sangre intracardíaca (0)</i>	<i>Riñón (5)</i>
<i>Corazón (1)</i>	<i>Gónada (6)</i>
<i>Pulmón (2)</i>	<i>Cerebro (7)</i>
<i>Hígado (3)</i>	<i>Médula ósea (8)</i>
<i>Bazo (4)</i>	<i>Calota (9)</i>
RESULTADOS HISTOLOGÍA	
<i>Sangre intracardíaca (0)</i>	<i>Riñón (5)</i>
<i>Corazón (1)</i>	<i>Gónada (6)</i>
<i>Pulmón (2)</i>	<i>Cerebro (7)</i>
<i>Hígado (3)</i>	<i>Médula ósea (8)</i>
<i>Bazo (4)</i>	<i>Calota (9)</i>
Comentarios:	

ANEXO V: PROTOCOLO DE INFUSIÓN DE PRODUCTO EN RATONES NOD/SCID.

HOJA DE TRABAJO DÍA INFUSIÓN DE CSM-f DE LOS RATONES NOD/SCID

1. Imprimir hoja de trabajo del día y coger las fichas identificativas de los ratones.
2. Colocación de calzas, bata estéril, guantes y mascarilla para entrar a la zona del animalario.
3. Conectar la campana del animalario y encender las luces de la misma. Esperar durante 15 minutos a la ventilación de la misma.
4. Entregar al operador el resto de material a introducir en la campana:
 - a. Paño estéril. Éste se pegara a la base de la misma mediante fiso para impedir los movimientos de la misma.
 - b. Gasas secas.
 - c. Gasas empapadas en alcohol.
 - d. Aguja de tamaño 25G.
 - e. Aguja de punción lumbar negra, amarilla (22-24G)
 - f. Jeringas de insulina.
 - g. 2 ampollas de 100 mL de SSF al 0.9%.
5. Desinfección del cepo con alcohol y entrega al operador (en situación estéril) para su introducción a la campana. El cepo tendrá que sujetarse con fiso al paño estéril y a la base de la campana.
6. Coger las jaulas con los ratones NOD/SCID debidamente identificadas.
7. Para facilitar la infusión cada jaula ha de situarse con luz infrarroja para dilatación de las venas laterales de la cola de ratón un tiempo de 10-15 minutos.
8. Introducir la jaula en la campana y proceder a coger cada ratón NOD/SCID para ser evaluado de forma independiente en el menor plazo de tiempo posible, para disminuir el tiempo de exposición fuera de la jaula.
9. Recepción de jeringas estériles con 1.5×10^6 CSM humanas fucosiladas resuspendidas en 0,4 mL de SSF estéril alicuotado previamente, para cada animal. En el caso de los controles se recepcionará una jeringa con 0,4 mL de SSF sin CSM.
10. Colocamos una aguja de punción lumbar aguja en la jeringa con las CSM o con el SSF. Previamente a la infusión hay que realizar los siguientes pasos con la jeringa cargada con la aguja:
 - a. Resuspender y “pipetear” las CSM humanas fucosiladas de forma vigorosa, sin realizar burbujas, para evitar la formación de agregados.

- b. Cargar la jeringa con el volumen de CSM humanas deseado y quitar la aguja de punción lumbar para colocar una aguja de 25 G de insulina.
 - c. Purgar la jeringa, eliminando todo el aire del contenido de la misma (prevención primaria de embolismos gaseosos).
11. Con la jeringa totalmente preparada y colocada encima del paño estéril, coger de la jaula a cada ratón sosteniéndolo por la cola (1/3 más distal de la misma) para el proceso de la infusión.
 12. Identificación del ratón en función del número de jaula y la perforación que presente (por ejemplo en la jaula 3 y perforación en oreja derecha → Ratón 3B)
 13. Una vez tenemos cogido al ratón lo introducimos en el cepo y lo cerramos.
 14. Aplicamos un masaje suave en la cola del ratón con las gasas empapadas en alcohol.
 15. A continuación, tirar de la cola del roedor y girar 90° a izquierda o derecha, donde identificaremos las venas laterales de la cola del ratón (color oscuro).
 16. sujetamos con la mano no dominante la cola del ratón a nivel distal con nuestro pulgar y dedo índice.
 17. Introducimos la aguja con la mano dominante LO MÁS PARALELO la superficie de la piel de la cola del ratón unos 2-3 mm, procurando que sea lo más distalmente posible (así evitaremos el colapso de la vena, por si no conseguimos canalizarla). En el caso de colapso deberemos en primer lugar intentar el acceso por la misma vena pero más proximalmente y en última instancia lo intentaremos en la vena del otro lado iniciando el proceso lo más distal posible.
 18. Podemos identificar que hemos canalizado la vena por uno o ambos de los siguientes signos: presencia de reflujo sanguíneo en jeringa y/o aguja junto a la ausencia de resistencia a la hora de infundir el producto. En caso de resistencia deberemos retirar la aguja e intentar canalizar en un plano (la mayoría de ocasiones se habrá entrado con un ángulo demasiado elevado).
 19. Una vez canalizado procedemos a la infusión del producto, identificando previamente si se trata de SSF o CSM-f, en un tiempo de 5 segundos. Se deberá registrar en la ficha de identificación del ratón el volumen infundido para poder calcular el número de CSM-f infundidas o en su caso el volumen de SSF administrado.
 20. Tras la administración se deberá comprimir con gasa estéril impregnada en clorhexidina el lugar de la punción para realizar hemostasia correcta y se devolverá el ratón a su jaula, para el seguimiento estrecho de toxicidad aguda.
 21. Entre la infusión de ratón y ratón el operador tiene que limpiar el cepo con alcohol para facilitar el acceso de los roedores al cepo.
 22. Conforme se vaya infundiendo a cada uno de los 22 ratones (18 con CSM-f y 4 con SSF) se iniciará el seguimiento de toxicidad aguda mediante los ítems del score anexo y se anotará en la ficha de cada roedor. Se deben evaluar y registrar los ítems del score a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos.
 23. Al concluir con todos los ratones, volveremos a colocar las jaulas en su ubicación anterior.

ANEXO VI: PROTOCOLO DE SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE RATONES NOD/SCID.

HOJA DE TRABAJO DÍA SACRIFICIO DE CSM-f DE LOS RATONES NOD/SCID

1. Imprimir hoja de trabajo del día, coger las fichas identificativas de los ratones y las solicitudes de servicios del biobanco (una por cada animal).
2. Colocación de calzas, bata estéril, guantes y mascarilla para entrar a la zona del animalario.
3. Conectar la campana del animalario y encender las luces de la misma. Esperar durante 15 minutos a la ventilación de la misma.
4. Coger las jaulas con los ratones NOD/SCID que van a ser sacrificados y llevarlos a la sección de Cirugía Experimental del HUVA en coche con acompañante.
5. También hay que llevar

a. OCT (para conservación de los órganos una vez extraídos) b. Cazoletas para la inmersión. c. Eppendorf. d. Caja de corcho con hielo seco. e. Ficha de los animales a sacrificar.	f. Filtros para médula. g. Placa de Petri h. PBS. i. Tubos microvette seco y con EDTA. j. SSF.
--	--
6. Una vez allí, se procederá al sacrificio de los animales en cámara de CO₂.
7. Se rotularán las cazoletas identificativas (rotulador permanente) y los cassettes (Histología) con el código correspondiente del biobanco, añadiéndole al final un guión y un número del 1 al 10 para distinguir los órganos. Las cazoletas se depositarán sobre el hielo seco de la caja de corcho. El mismo órgano SIEMPRE tendrá el mismo número. A continuación se detalla:

a. N° 1: Corazón. b. N°2: Pulmón. c. N°3: Hígado. d. N°4: Bazo. e. N°5: Riñón.	f. N°6: Gónada. g. N°7: Cerebro. h. N°8: Médula ósea. i. N°9: Calota
--	---
8. Al mismo tiempo se rotularán 2 tubos microvette secos con el ID del ratón y 2 tubo microvette con EDTA (tapón rojo) para depositar en ellos la sangre intracardíaca para la realización de la RT-PCR en sangre y los análisis bioquímico-hematológicos.

9. Tras el sacrificio de los animales y previa a la disección se procederá a la identificación del ratón y colocación de su ficha en la mesa. Se apuntará el código de biobanco en la ficha identificativa de cada ratón.
10. Rellenar la solicitud del biobanco una vez hemos apuntado el código en la ficha del ratón.
11. Comienzo de la disección del animal, empezando en primer lugar por extracción de la sangre intracardiaca por aguja. La sangre recolectada se depositará en los tubos de análisis del siguiente modo:
 - a. Primero: Tubo EDTA
 - b. Segundo: Tubo Seco.
 - c. Tercero: Tubo EDTA.
 - d. Cuarto: Tubo Seco...
12. De un tubo de EDTA se cogerán 20 uL de sangre y se echarán en un eppendorf de 1,5 mL y se le añadirán 180 uL de SSD (dilución 1:10), y se llevará a Hematimetría para la realización del hemograma.
13. El otro tubo de EDTA más lo que quede del anterior si es que hay 2, se llevará la biobanco para su procesado.
14. Los tubos secos se centrifugaran para la obtención del suero y se almacenarán en cámara de -80° hasta su análisis.
15. Descripción macroscópica de los órganos y extracción.
16. Al extraer cada uno de los órganos del 1 al 9 excluyendo el 8, se dividirá con bisturí en dos mitades. Una de las mitades se colocará en el cassette identificado con su número correspondiente con formol para la realización de la histología y la otra mitad se depositará en la cazoleta que se encuentra en el hielo seco. A ésta se le añadirá inmediatamente el OCT cubriendo el órgano por completo. Procedimiento para extracción de MO:
 - a. Colocar tibia en placa de Petri con PBS.
 - b. Cortar tibia por los dos lados con corte transversal.
 - c. Introducir por uno de los extremos del fragmento resultante una aguja de 25G conectada a una jeringa con SSF y perfundir el hueso. De esta forma la MO saldrá por el otro extremo. El material que sale debemos cargarlos y soltarlo varias veces con la jeringa.
 - d. Tras cargar el material, lo pasamos por filtro para que retenga los segmentos óseos en una nueva placa de Petri con PBS.
 - e. Volvemos a cargar el material y lo echamos en una cazoleta o tubo de EDTA??¿?¿?.
17. Cada vez que recojamos cada muestra (órgano,sangre....) se pondrá una marca en la ficha identificativa del ratón.
18. Cuando tengamos todas las muestras las llevaremos a Anatomía Patológica (cassettes) y al Biobanco (caja de corcho con cazoletas), con las pertinentes hojas de solicitud de servicios al Biobanco.

ANEXO VII: SOLICITUD DE ESTUDIOS AL BIOBANCO EN RED DE LA REGIÓN DE MURCIA.



BIOBANC-MUR (Nodo 1)
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Solicitud de Servicios

Peticionario:	A rellenar Biobanco	A rellenar Biobanco
	Nº Solicitud	Petición Servicio
Unidad/Servicio/Departamento:		PV.....
Fecha:	BM.....	PC.....
		PCU.....

Tipo de Muestra:	☐ Derivado Hemático	☐ Tejido	☐ Fresco	☐ Otros.....
			☐ Parafinado	

☐ Técnicas de Biología Molecular

Obtención de Ácidos Nucleicos	Nº	Control de calidad de Ácidos Nucleicos	Nº	Estudios de Metilación	Nº
☐ ADN		☐ Concentración y Pureza (TECAM)		☐ Tratamiento con Bisulfito	
☐ ARN		☐ Integridad (Electroforesis)		☐ PCR	
☐ ADN complementario		☐ Funcionalidad (PCR)		☐ Pirosecuenciación	
PCR	Nº	Pirosecuenciación	Nº	Otras técnicas	Nº
☐ QPCR		☐ Detección de mutaciones			
☐ PCR a tiempo final		☐ Secuenciación de SNPs			

☐ Técnicas en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica (HUVA)

Proceso de Tejidos	Nº	Técnicas	Nº	Técnicas	Nº
☐ Inclusión en Parafina		☐ Histoquímica		☐ FISH	
☐ Formación de Bloques		☐ Inmunohistoquímica		☐ Hibridación in situ	
☐ Cortes Histológicos		☐		☐	

* Para más información contactar con Biobanc-Mur Nodo 1

Comentarios	