

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIRURGIA

*ESTUDIO CLINICO DE TERAPIA CELULAR
AUTOLOGA CON CÉLULAS MADRE ADULTAS
EXPANDIDAS EX VIVO, EN EL TRATAMIENTO DE
LA OSTEONECROSIS DE LA CABEZA FEMORAL*

Memoria presentada por Alejandro Jorge Hernández Martínez

Para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Directores:

Dr. Marius Aguirre i Canyadell

Dr. Joan Nardi Vilardaga

Barcelona

2015

AGRADECIMIENTOS

Al Hospital Universitario Vall D´Hebron, el institut de Recerca y la Universitat Autònoma de Barcelona, centros en los cuales he trabajado o trabajo y en donde se desarrolló la investigación.

Al Dr. Marius Aguirre i Canyadell que me dio la oportunidad de realizar este ilusionante proyecto y le ha dado el impulso necesario para llevarlo a término.

Al Dr. Joan Nardi Vilardaga, mi jefe de servicio durante muchos años, co-director de este trabajo y quien me dio la oportunidad de trabajar en este hospital.

A la Dra. Rosa Domínguez, por su participación en la realización de los estudios de imagen de este estudio. Siempre me dio facilidades para la realización de los mismos.

Al Dr. Roberto Vélez Villa, por sus consejos, ayudas y orientaciones de cómo realizar el proyecto.

Al Dr. Diego Collado Gastalver, por su ayuda clave en el reclutamiento de los pacientes.

A Alba López Fernández, por su ayuda en la actualización bibliográfica y en el diseño y relleno de las bases de datos.

A mis compañeros de la Unidad de Cadera del Vall d'Hebron especialmente al Dr. Luis Azorín Zafrilla, mi maestro, por apoyarme y liberarme el tiempo necesario para realizar este trabajo.

Al Dr. Ferrán Pellisé Urquiza, gracias a él adquirí el hábito de la investigación.

A la división de terapias avanzadas del Banc de Sang i Teixits, XCELIA, por su necesaria colaboración en los cultivos celulares y su aportación al diseño y consecución de éste proyecto.

A mis padres, Antonio y María Luz, porque ellos me enseñaron a ser persona.

A Anna, mi mujer, y a mis hijos, Martí y Jan. Ellos son mi única razón y a ellos les robé la mayor parte del tiempo que dediqué a este proyecto.

JUSTIFICACIÓN	13
INTRODUCCIÓN.....	19
Epidemiología de la osteonecrosis de la cabeza femoral.....	21
Etiopatogenia de la osteonecrosis de la cabeza femoral.....	23
Historia Natural de la osteonecrosis de la cabeza femoral.....	29
Diagnóstico de imagen en la osteonecrosis.....	31
Clasificación de la osteonecrosis de la cabeza femoral.....	37
Tratamiento de la osteonecrosis de la cabeza femoral.....	43
Tratamiento quirúrgico.....	49
Descripción y tipos de células madre mesenquimales.....	57
Aplicaciones en cirugía ortopédica de las células madre mesenquimales.....	59
Aplicaciones en Osteonecrosis de las células madre mesenquimales.....	61
Complicaciones asociadas a la terapia celular con células madre.....	69
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	71
<i>HIPOTESIS</i>	73
<i>OBJETIVOS</i>	73
Objetivo Principal	73
Objetivos secundarios.....	74
MATERIAL Y METODOS	75
Tipo de Estudio.....	77
Población de referencia	77
Población elegible	77
Criterios de inclusión y exclusión.....	77
Aleatorización de los pacientes	79
Número de pacientes	79
Tratamiento grupo de estudio.....	81

Tratamiento y procedimientos del grupo control.....	95
Seguimientos.....	97
Estudios radiológicos	97
Estudios de resonancia magnética	97
Estudios de laboratorio.....	98
Estudio exploratorio TEP.....	99
Estudio anatomopatológico	99
Evaluaciones clínicas.....	100
Esquema de las visitas de seguimiento realizadas	100
Variables principales de valoración	102
Variables secundarias de valoración.....	103
Estudio exploratorio TEP.....	103
Métodos de análisis.....	105
Software	105
RESULTADOS	107
Demografía	109
Clasificación	113
Causas.....	115
Situación clínica preoperatoria.....	117
Extracción Médula ósea.....	119
Producto implantado.....	121
Resultados clínicos	123
Resultados radiológicos y Resonancia magnética dinámica	133
Resultados del PET-TC F18	137
Anatomía patológica.....	139
Reacciones Adversas.....	143
DISCUSIÓN	145
Fundamentos de la terapia celular en la ONCF.....	147
Fuente para la obtención de CMM	149
Concentración o cultivo de las CMM	151
Procedimientos quirúrgicos asociados a la implantación de CMM.....	155

Supervivencia de la CMM asociadas a DC	159
Regeneración ósea.	165
Evolución clínica.	169
Reacciones adversas.	173
Limitaciones del estudio	175
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA.....	181

JUSTIFICACIÓN

La Osteonecrosis de la cabeza femoral (ONCF) es una enfermedad de etiopatogenia no bien conocida en la que en última instancia se produce la interrupción del flujo sanguíneo a un segmento de la cabeza del fémur, provocando la muerte de sus elementos celulares (1). A la aparición de la necrosis le sigue un proceso de reparación que consiste en el desarrollo de una neovascularización desde los tejidos sanos vecinos a la lesión, en la resorción del hueso necrótico por los osteoclastos y en la formación de hueso nuevo por los osteoblastos. En algunas ocasiones este proceso de reparación falla, la integridad de la masa ósea se altera definitivamente y se produce una estructura mineral débil, que tiende a colapsarse ante la presencia de cargas. La progresión de la ONCF conlleva deformidad de la cabeza femoral e incongruencia articular con la aparición de dolor intenso y el desarrollo último de degeneración articular avanzada. Todo ello genera una alteración severa en la calidad de vida de los pacientes y produce un impacto socioeconómico importante (2).

Los tratamientos no quirúrgicos utilizados en la ONCF han sido múltiples y sus resultados poco satisfactorios. En la actualidad existe poca evidencia científica que avale su utilización (3–6).

Los tratamientos quirúrgicos utilizados en la ONCF, sin embargo, se han mostrado eficaces administrados en las fases iniciales de la enfermedad, previos a la presencia de colapso de la cabeza femoral (7). La base de los distintos tratamientos quirúrgicos propuestos en la ONCF son el desbridamiento del tejido necrótico y la

estimulación de la regeneración vascular y ósea desde los tejidos sanos circundantes a la lesión. La descompresión central de la cabeza femoral propuesta por Ficat y col. (8), con algunas modificaciones posteriores, se considera en la actualidad el patrón oro en el tratamiento de la ONCF (9).

La capacidad multipotencial de las células madre mesenquimales ha impulsado su aplicación en la cirugía ortopédica y traumatología con el objetivo de activar y potenciar la regeneración tisular (10). Estudios preclínicos han demostrado la utilidad de éstas células para regenera tejido nativo en un entorno tisular adverso como es la osteonecrosis de cabeza femoral (11). Sin embargo no existe en la actualidad evidencia suficiente sobre su utilidad clínica en ONCF.

El concentrado a partir de un aspirado de médula ósea ha sido hasta el momento la forma más común de obtención de células madre mesenquimales, el cual es aplicado in situ una vez realizada la descompresión central de la cabeza femoral. El número de células obtenidas por este método es muy variable dependiendo de las características del paciente y la habilidad del equipo extractor. Los resultados obtenidos con esta modalidad de tratamiento han sido variables y discretos (12–14).

La utilización de células madre cultivadas permite la multiplicación controlada del número de células obtenidas mediante la aspiración medular, potenciando la capacidad regenerativa del producto implantado en la zona necrótica (10,15). Vélez y col., en un estudio preclínico en ovejas, demostraron que la descompresión

central, asociada a la implantación de un constructo de matriz ósea colonizado con células madre de la médula ósea, estimula la regeneración ósea (16). En la actualidad no existe ningún estudio clínico publicado sobre la utilización de un constructo de matriz ósea colonizado con células madre de la médula ósea en la ONCF.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología de la osteonecrosis de la cabeza femoral.

La mayor parte de los estudios publicados sobre la epidemiología de la ONCF se han realizado en relación con alguna patología específica como el lupus eritematoso sistémico (LES) o la enfermedad de las células falciformes (ECF) (17–19). Los estudios más fiables para estimar la incidencia global de ONCF provienen de los datos extraídos del registro nacional de ONCF de Japón. En Japón la ONCF está considerada como una enfermedad incurable. Aquellos pacientes que presenten la enfermedad son incluidos en un registro específico y reciben un subsidio. Basados en estos datos Yamaguchi y col., en un estudio realizado en la prefectura de Fukuoka, estimaron una tasa de incidencia bruta de 2.58 casos/100.000 habitantes-año, con un ratio mujer/hombre de 1.6. La tasa estandarizada por edad y sexo arrojó una incidencia de 2.51 casos/100.000 habitantes-año en Japón. En los hombres la mayor incidencia se observó entre los 40 y los 59 años, mientras en las mujeres presentó una distribución bimodal entre los 50 y los 59 años y entre los 70 y 79 años (20). Ikeuchi y col. revisaron los datos clínicos y radiológicos de los pacientes de la prefectura de Aichi que habían sido incluidos en el registro nacional de pacientes con ONCF y observaron que la estimación de la incidencia a través de los datos del registro podría estar sobreestimada en algunos casos, ya que incluiría pacientes afectados de osteoartrosis y fractura subcondral por insuficiencia, e infraestimada en otros casos pues solo un 29% de los pacientes que presentaban ONCF concomitantemente con alguna enfermedad específica habían sido incluidos en el registro. Realizando una revisión

de cada uno de los casos incluidos en la prefectura de Aichi, Ikeuchi y col. estimaron una incidencia de ONCF en Japón de 1.91 casos/100.000 habitantes-año (21). No obstante, la existencia de importantes variaciones entre las distintas regiones del país y la asociación entre ONCF y algunas enfermedades de distribución geográfica heterogénea, sugieren que los datos publicados no son exportables a nuestro medio (21,22). En Gran Bretaña, basado en los datos de sus registros nacionales se estimó una incidencia global de osteonecrosis de 3 casos por 100.000 habitantes-año en el año 2003. De éstos casos 75.9% correspondían a ONCF (23). Finalmente, en Los Estados Unidos de América, se estima que un 10% de las prótesis totales de cadera anuales colocadas son secundarias al desarrollo de una ONCF (2).

Etiopatogenia de la osteonecrosis de la cabeza femoral.

Las causas y los mecanismos que producen la aparición y el desarrollo de la ONCF no son completamente conocidos. En algunos casos la ONCF puede ser secundaria a causas claramente identificables como es una fractura del cuello femoral, la enfermedad de Caisson o la anemia de células falciforme, pero en la mayoría de los casos no se puede identificar una causa concreta como etiología de la enfermedad. La mayor parte de los estudios publicados apuntan a la presencia de una predisposición genética (24) sobre la que actúan una serie de factores de riesgo como son el uso de corticoides y el consumo de alcohol a dosis elevadas (17,25–27). Otros factores conocidos son la dislipemia y trastornos de la coagulación (28–32). Por otro lado entre los mecanismos etiopatogénicos implicados en el desarrollo de la ONCF se encuentran las alteraciones del flujo sanguíneo a la cabeza femoral, la toxicidad celular directa y los trastornos en la diferenciación de las células madre mesenquimales locales (33–35).

Los corticoides y el alcoholismo son los factores etiológicos que más claramente han sido relacionados con la aparición de ONCF. Los corticoides son utilizados frecuentemente en el tratamiento de múltiples patologías inflamatorias como la artritis reumatoides, el lupus eritematoso sistémico o el síndrome respiratorio agudo severo (SRAS) entre otros, administrándose, en ocasiones, a dosis elevadas y durante largos periodos de tiempo (36–39). Algunos autores han tratado de demostrar la relación entre la dosis y el tiempo durante el cual son administrado los corticoides y la aparición de ONCF con resultados

contradictorios (36,38,40,41). Colwell y col. en un trabajo prospectivo realizado en pacientes con asma o artritis inflamatoria tratados con corticoides no encontró relación entre el tiempo o la dosis de administración y la aparición de ONCF en 1420 caderas-año seguidas durante 10 años (36) . Igualmente Wing y col. tampoco encontraron un aumento de la incidencia de ONCF en un estudio de cohortes prospectivas realizado en pacientes atendidos de lesión medular aguda que eran tratados regularmente con dosis altas de corticoides para reducir el edema medular (40) . Sin embargo Griffith y col. encontró que el riesgo de desarrollar una ONCF era del 13% en pacientes con SRAS tratados con más de 3 g de prednisona frente al 0.6% de aquellos tratados con una dosis inferior (38). Por último algunos autores apuntan que aunque la dosis y el tiempo de exposición a los corticoides aumentan el riesgo de ONCF, ésta se puede producir a cualquier dosis, en cualquier periodo de tiempo y administrados por cualquier vía (42). Desde el punto de vista etiopatogénico, la administración de corticoides a dosis altas se ha relacionado con la alteración del metabolismo de los lípidos, la vasoconstricción de las arterias epifisarias y la disminución de la capacidad de proliferación celular (43–45). Yin y col. demostraron en un estudio *in vitro* que las células de la médula ósea mostraban un aumento de la expresión del gen adipogénico 422 (aP2) y una disminución de la capacidad de proliferación celular cuando se eran expuestas a dexametasona (43). Descher y col. comprobaron como aumentaba la respuesta vasoconstrictora a la endotelina 1 de las arterias epifisarias en cerdos a los que se les administraba metilprednisolona (45).

El consumo habitual de alcohol ha sido señalado por algunos autores como un factor de riesgo para el desarrollo de ONCF (25,46,47). Hirota y col. demostraron en un estudio observacional una relación estadística entre el consumo de alcohol y la ONCF con un aumento del riesgo relativo en función del consumo de alcohol. El riesgo relativo de presentar ONCF se estimó en 3.2 (IC al 95% 1.1-9.2) para bebedores ocasionales y de 13.1 (IC al 95% 4.1-42.5) para bebedores habituales (46). Por otro lado, no se ha encontrado un efecto aditivo o multiplicativo del riesgo de ONCF en pacientes bebedores de alcohol tratados con dosis altas de corticoides (25). Estudios de laboratorio han demostrado que el alcohol, como los corticoides, estimula la diferenciación de las células estromales de la cabeza femoral en adipocitos con disminución de la capacidad de osteogénesis (48,49).

Algunos autores han estudiado la asociación entre el tabaco y el estilo de vida con la ONCF (46,47). Hirota y col. encontraron que el riesgo relativo en fumadores habituales era de 4.7 (IC al 95% 1.5-14.5) aunque el efecto acumulativo desaparecía a partir de los 20 paquetes de cigarrillos al año. Sin embargo no se ha demostrado una relación entre el trabajo físico y la ONCF (46).

Los trastornos congénitos de la coagulación relacionados con la trombofilia o la hipofibrinólisis también han sido relacionados con la aparición de ONCF (50–53). Los datos publicados sugieren que estos trastornos de la coagulación producirían una trombosis venosa en la cabeza femoral que llevaría a un aumento de la presión venosa, disminución del flujo arterial, hipoxia celular y necrosis (50,52). Glueck y

col. demostraron que tanto los pacientes con ONCF idiopática como ONCF secundaria a la administración de corticoides presentaban un aumento significativo de trombofilias, alteraciones del factor VIII, hipofibrinólisis Lpa, factor V Leiden y deficiencia para activar la proteína C, en comparación a voluntarios sanos en un estudio 1: 1 de casos y controles sobre 133 pacientes con ONCF (54). Jones y col. encontraron que un 82.2% de los pacientes con osteonecrosis presentaban al menos una anormalidad de la coagulación, inhibidor-1 del activador del plaminógeno, estimulador del activador del plasminógeno, lipoproteína (a), resistencia a la activación de la proteína C, anticuerpos anticardiolipinas (aCL IgG, IgM), proteína C, proteína S, y homocisteína, frente al 30% de voluntarios sanos en un estudio de cohortes para determinar la relación entre trombofilias y ONCF (55).

La predisposición genética al desarrollo de una ONCF parece jugar un papel determinante ante la exposición a otros factores de riesgo (24). Distintos polimorfismos genéticos han sido descritos asociados a pacientes con ONCF (29,56). El conocimiento de estos polimorfismos, asociados en ocasiones a una herencia autosómica dominante, nos permitirá identificar a aquellos pacientes con un riesgo potencial más alto e instaurar tratamientos específicos. Entre estos polimorfismos han sido identificadas las alteraciones del metabolismo del colágeno tipo II secundarias a una mutación genética autosómica dominante en el cromosoma 12q13 en 3 familias por Liu y col (29). Koo y col., por su parte, relacionaron la alteración congénita del gen de la sintetasa del óxido nítrico

endotelial con el desarrollo de ONCF(56). Baldwin y col. encontraron una asociación entre polimorfismos en la proteína morfogénica ósea 6, la anexina A2 y en el klotho, fundamentales para la formación ósea, la actividad metabólica y la vascularización, y la ONCF en la anemia de células falciformes (31). Asano y col. demostraron que los pacientes sometidos a trasplante renal que tenían el genotipo ABCB1 3435TT presentaban menos incidencia de ONCF (57).

Historia Natural de la osteonecrosis de la cabeza femoral.

La evolución de la ONCF dependerá del estadio radiológico, del tamaño de la lesión, de su localización y de los factores de riesgo subyacentes (58,59). La mayoría de los estudios sugieren que la ONCF progresa hacia el colapso de la cabeza femoral en ausencia de tratamiento incluso en pacientes asintomáticos (60–63). Hernigou y col. publicaron que un 88% de 40 caderas con ONCF asintomática que afectaba a menos de un 10% de la cabeza femoral, progresaban a sintomáticas. Además 73% presentaban colapso radiológico (60). Lee y col estudiaron la historia natural de la ONCF en 100 pacientes en estadio precolapso durante 31 meses de media (rango de 6 a 202 meses). La tasa de colapso fue del 78% a los 2 años. La tasa de colapso varió en función de los factores de riesgo subyacentes pasando del 83% en las de origen alcohólico, al 78.6% en las de origen corticoideo hasta el 68.8% en las de origen idiopático (64). Mont y col. realizaron una revisión sistemática de la literatura, encontrando que la prevalencia global de progresión de la ONCF a enfermedad sintomática y/o colapso era del 59% en un periodo medio de seguimiento de 88 meses (rango entre 2 a 240 meses). El tiempo medio para la aparición de los síntomas fue de 39 meses (rango entre 1 a 134 meses). Se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de colapso en función del tamaño de la lesión, su localización, el estadio radiológico y los factores de riesgo asociados. Las lesiones grandes, de localización lateral y en estadio III presentaron mayor prevalencia de colapso, con un 84%, 59% y 96% respectivamente, respecto a las lesiones pequeñas, de localización medial y en estadio I, con un 7%, 9% y

55% respectivamente. La prevalencia de colapso fue mayor en la ONCF relacionada con el consumo de alcohol o la enfermedad de células falciforme, 47% y 73% respectivamente, que en la ONCF relacionada con el lupus eritematoso sistémico o el virus de la inmunodeficiencia humana, 7% y 15% respectivamente (59). (Ilustración 1)

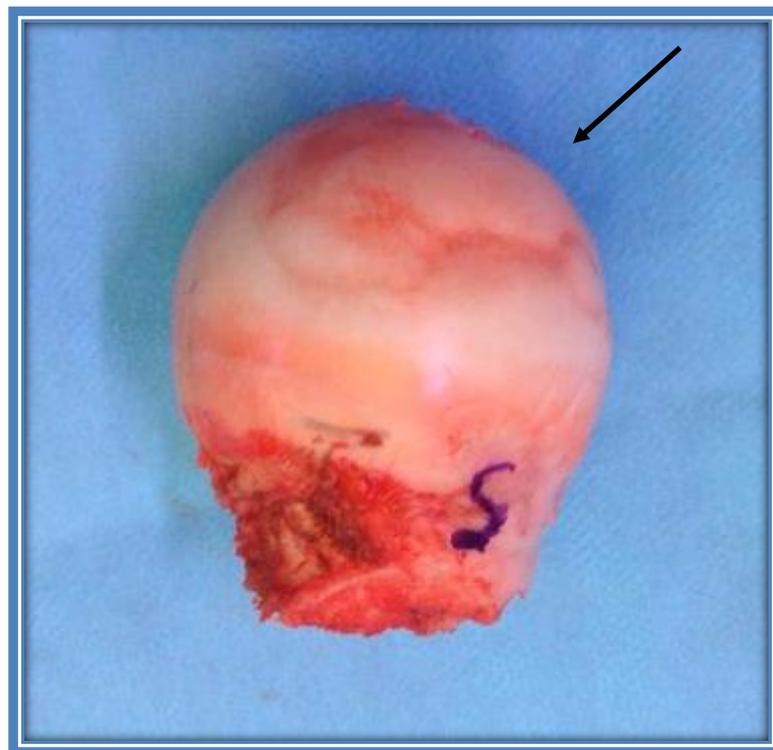


Ilustración 1 Cabeza Femoral con colapso. Observese la depresión de la superficie femoral. (flecha)

Diagnóstico de imagen en la osteonecrosis.

Las radiografías convencionales siguen siendo en la actualidad la primera prueba de imagen en la valoración de un paciente con sospecha de ONCF y han sido la base de la mayoría de las clasificaciones publicadas (65). Kerboul y col. desarrollaron uno de los primeros métodos para la medición de la extensión de la osteonecrosis, sumando los grados de superficie femoral afectada, desde el centro de la cabeza femoral, en proyección frontal y sagital. Un ángulo superior a 200° fue considerado indicativo de una lesión grande. Aunque inicialmente el ángulo de Kerboul fue utilizado en radiografías convencionales, actualmente es utilizado principalmente en estudio de resonancia magnética (66,67). En el examen radiológico convencional las lesiones necróticas pueden ser clasificadas como escleróticas o quísticas. La presencia de lesiones escleróticas ha sido identificado como un signo de estabilidad y por lo tanto de buen pronóstico (68). (Ilustración 2)



Ilustración 2 Imagen radiológica ONCF bilateral. En la cadera derecha se observan imágenes quísticas y esclerosis típica de a ONCF. En la cadera izquierda se observan

A pesar de que las radiografías convencionales son solicitadas de forma habitual en el diagnóstico de los pacientes con ONCF, múltiples estudios han confirmado que tienen una baja sensibilidad en el diagnóstico de los estadios iniciales de la enfermedad, lo cual es muy importante ya que un diagnóstico precoz se relaciona con un pronóstico más favorable (69,70).

La resonancia magnética (RM) es el mejor método de diagnóstico en todas las fases, pues tiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 98% para la ONCF (71–74). El refinamiento de esta técnica ha permitido la mejoría en la caracterización de las lesiones osteonecróticas. Esto tiene implicación en la identificación de la historia natural de la enfermedad, la valoración del riesgo de colapso de la cabeza femoral y la respuesta de la enfermedad a tratamientos conservadores que preservan la cabeza femoral (75). Una doble franja de baja intensidad en T1 rodeando un área de lesión es considerado patognomónico de la ONCF (69,76). Junto con la doble franja de baja intensidad hoy en día es discutido si el edema de la médula ósea es indicativo de isquemia. Ragab y col. evaluaron un grupo de pacientes a los que se les había realizado una RM después de la aparición de dolor en la cadera. De ellos el 29% fue diagnosticado de ONCF y todos ellos presentaban en la RM edema de la médula ósea (77). En el estudio de Ito y colaboradores, se mostró por RM que la presencia de edema óseo se correlacionaba con empeoramiento clínico (dolor) y que era el factor pronóstico más importante asociado a la progresión de los síntomas (78). Aunque se ha encontrado una asociación entre el edema óseo y la ONCF, la mayoría de los

trabajos señalan que el edema óseo no es patognomónico de la ONCF (65). Como se ha señalado previamente la RM ha sido utilizada para valorar el pronóstico de la ONCF. Ha y colaboradores utilizaron la RM para la predicción del colapso de la cabeza femoral en los estadios iniciales de la enfermedad. Se certificó que aquellas caderas con un ángulo necrótico de 190 grados o menos (método de Kerboul modificado) no presentaron colapso mientras que las caderas con un ángulo mayor o igual que 240 grados se colapsaron. La mitad de las caderas con ángulos entre 190 y 240 grados presentaron colapso. Estos datos sugieren que la estimación del área de la lesión mediante la medición del ángulo necrótico modificado de Kerboul es una herramienta predictiva útil en la valoración del riesgo de colapso (79). (Ilustración 3 e Ilustración 4)

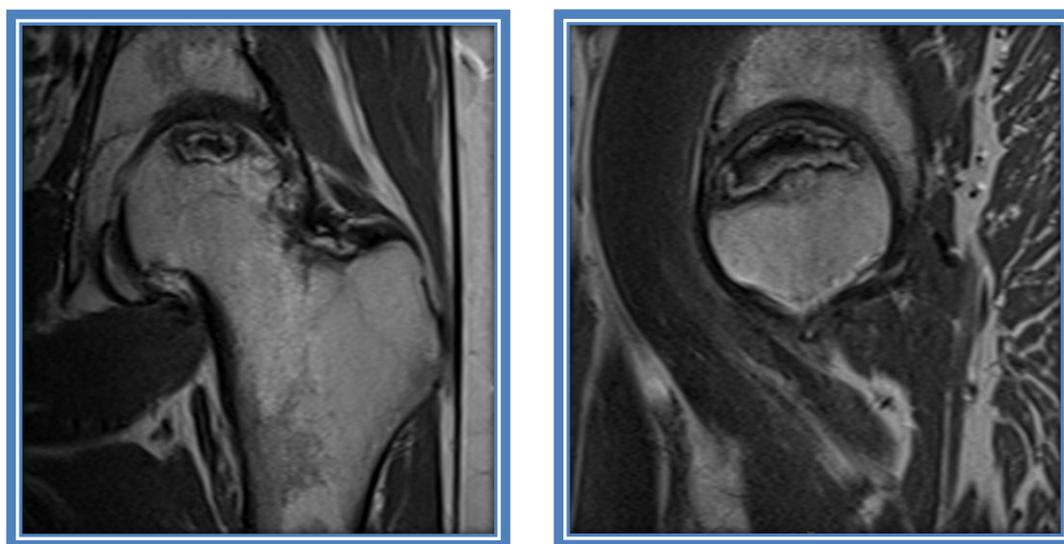


Ilustración 3 Imagen en T1 de RM – proyección coronal y sagital - . Se puede observar la doble línea de baja intensidad – Flecha gruesa – que rodea a la lesión necrótica – Flecha fina.

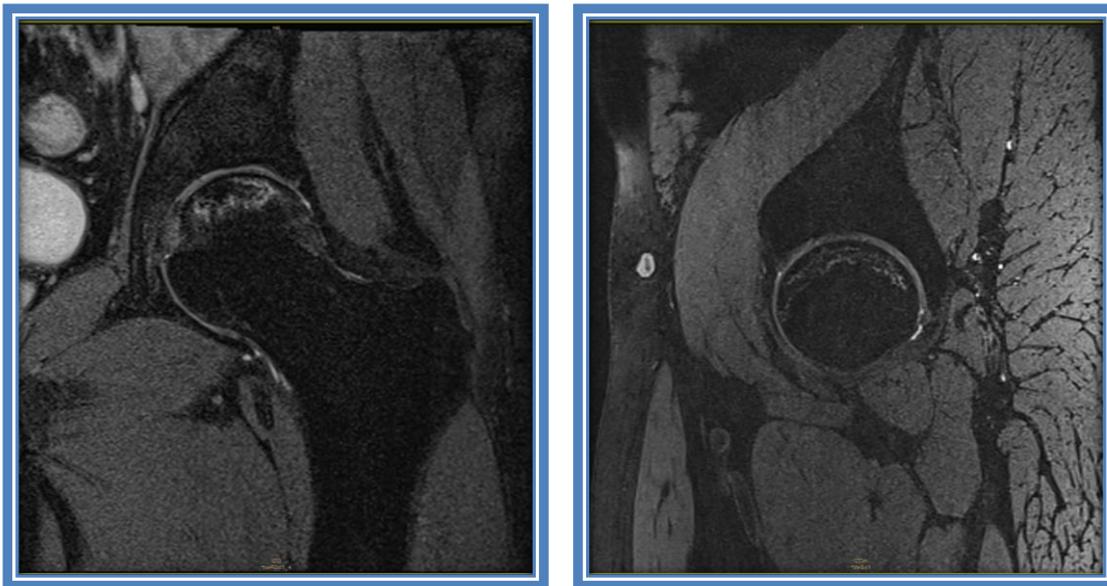


Ilustración 4 Imágen en T2 de RM -proyección coronal y sagital -.

La tomografía computerizada (TC) no se usa habitualmente en el diagnóstico de la ONCF. Su papel fundamental se encuentra en la detección de fracturas subcondrales (65). Stevens y col. compararon la capacidad de la TC y la RM en la detección de fracturas subcondrales y observaron que la RM tenía una baja sensibilidad y alta especificidad (38% y 100% respectivamente) frente a la TC que tenía una alta sensibilidad y alta especificidad (100% y 100% respectivamente) (80)

El papel de la gammagrafía en el diagnóstico por imagen de la ONCF no se encuentra avalado por la literatura científica. En 2008, Mont y col. compararon la sensibilidad y la especificidad de la RM frente a la gammagrafía en un grupo de pacientes con sospecha de ONCF. La RM mostró una sensibilidad del 100% comparada con un 56% de la gammagrafía. Por lo tanto su utilización como herramienta habitual no está recomendada (81).

Estudios recientes han investigado el papel de la tomografía de emisión de positrones (PET-TC-F18) en el diagnóstico de la ONCF. Se basa en la utilización de fluorina 18 marcada radiactivamente y en el alto nivel de metabolismo de la glucosa de las células inflamatorias que están presentes en la ONCF. Dasa y col. en un estudio comparativo entre el TEP, la gammagrafía y la RM encontraron que el PET era más sensible en el diagnóstico precoz de la ONCF (82). (Ilustración 5)

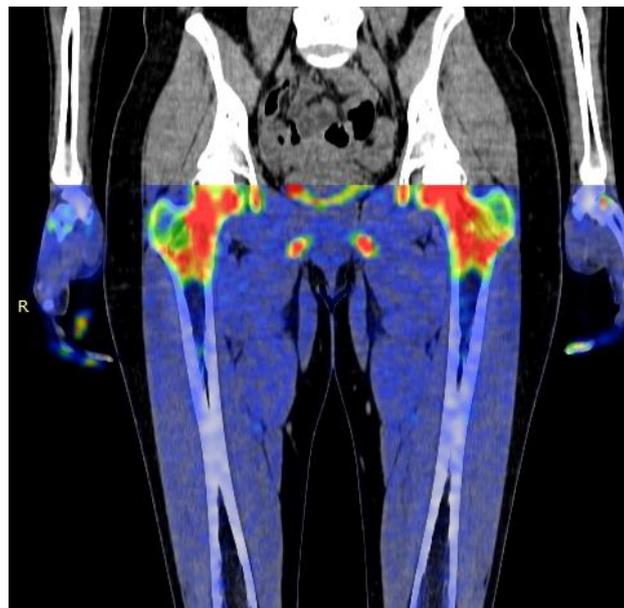


Ilustración 5 Imagen de PET en Osteonecrosis bilateral de cadera.

Clasificación de la osteonecrosis de la cabeza femoral.

No existe un método de clasificación universalmente aceptado para valorar la severidad de la lesión y establecer un pronóstico acerca de la ONCF. Además tampoco existe una uniformidad en la colección de los datos entre los distintos centros lo que dificulta los análisis y las comparaciones (83). A lo largo de la historia se han utilizado distintos sistemas de clasificación de la ONCF. En los años 60, antes del advenimiento de la resonancia magnética, Ficat y Arlet publicaron una de las primeras clasificaciones de la ONCF en 3 estadios. Esta clasificación ha sido modificada en varias ocasiones para incluir, entre otros, los hallazgos de la resonancia magnética y otros 3 estadios (8,84)8,74). Las principales desventajas de la clasificación de ficat es que la descripción de algunos estadios es ambigua y solapada, pero sobretodo la ausencia de un sistema para cuantificar la lesión (83). (Tabla 1)

ESTADIO	DOLOR	RADIOLOGIA	RM
I	+	Normal	+
II	+	Esclerosis y Quistes	+
III	+	Fractura subcondral (Signo medialuna creciente; con o sin colapso de la cabeza)	+
IV	+	Colapso cabeza femoral, afectación acetabular y destrucción articular.	+

Tabla 1 Clasificación de Arlet y Ficat

Steimberg y col. en la Universidad de Pennsylvania propusieron una clasificación basada en la primigenia de Ficat y Arlet. Su principal aportación es la utilización de las imágenes de resonancia magnética y la clara identificación de 7 estadios. Además fue la primera clasificación en introducir el tamaño de la lesión como método para predecir el pronóstico de la lesión (73). (Tabla 2)

ESTADIO	RADIOLOGIA	RM	EXTENSION
0	Normal	-	NO
I	Normal	+	Leve (< 15% cabeza femoral)
II	Quistes y esclerosis	+	Moderada (15% a 30% cabeza femoral)
III	Colapso subcondral sin aplanamiento. (Media luna creciente)	+	Severa (> 30% cabeza femoral)
IV	Aplanamiento cabeza femoral	+	
V	Pinzamiento interlinea articular	+	NO
VI	Artrosis avanzada	+	NO

Tabla 2 Clasificación de Steinberg

En los años 90, a partir de la clasificación de la Universidad de Pennsylvania, la asociación para el estudio de la circulación ósea (ARCO) intentó consensuar un sistema de clasificación que actualmente no cuenta con el necesario consenso y soporte de la comunidad científica. Su principal aportación se concreta en la reducción del número de estadios a 4 y la inclusión de una subclasificación en función de la localización de la lesión (24,83). (Tabla 3)(Ilustración 6 e Ilustración 7)

Por último en Japón se utiliza una clasificación desarrollada por asociación ortopédica de Japón y su ministro de salud. Esta clasificación se basó inicialmente en la clasificación de Ficat y Arlet pero posteriormente los estadios II y III fueron subdivididos en función de la localización y el tamaño de la lesión y los estadios I y IV no fueron incluidos (68).

ESTAD IO	RADIOLOGI A	R M	LOCALIZAC ION	EXTENSION
0	Normal	-	NO	NO
I	Normal	+	Medial Central Lateral	Leve (< 15% cabeza femoral) Moderada (15% a 30% cabeza femoral) Severa (> 30% cabeza femoral)
II	Quistes, esclerosis, porosidad focal	+		
III	Media luna creciente y/o aplanamiento	+		
IV	Artrosis avanzada	+	NO	NO

Tabla 3 Clasificación de la Asociación para el estudio de la circulación ósea ARCO



Ilustración 6 Osteonecrosis grado III de ARCO. Obsérvese el aplanamiento de la cabeza femoral en ambas proyecciones.



Ilustración 7 Osteonecrosis grado IV de ARCO. Obsérvese el colapso masivo de la cabeza femoral y artrosis avanzada.

Tratamiento de la osteonecrosis de la cabeza femoral.

Tratamiento no quirúrgico.

Los tratamientos no quirúrgicos publicados en la literatura incluyen la simple monitorización, la terapia física, la terapia farmacológica, las ondas de choque y la estimulación electromagnética (85).

Como se ha señalado con anterioridad, la historia natural de la ONCF sin tratamiento provoca el colapso de la cabeza femoral en la mayoría de los pacientes (59–62,85). El pronóstico depende del estadio radiológico en el que se encuentre, de la localización, de su extensión y de la concurrencia de factores de riesgo. De esta manera solo estaría justificada la monitorización de los pacientes sin tratamiento en casos de ONCF en estadios precolapso, de extensión inferior al 15% y localización medial. (59) Cheng y col. publicaron la resolución espontánea de 3 ONCF de tamaño inferior al 25% de la cabeza femoral y en estadio I, en un estudio prospectivo sobre 13 caderas asintomáticas (86).

En el tratamiento farmacológico de la osteonecrosis se han utilizado antilipemiantes, anticoagulantes, análogos de las prostaciclina y bifosfonatos.

El uso de fármacos antilipemiantes en el tratamiento de la ONCF se basa en estudios preclínicos sobre los efectos positivos de los antilipemiantes en el tratamiento de la ONCF asociada a la administración de corticoides (43,87–93). Cui y col. demostraron los efectos de la lovastatina en la prevención de la

adipogénesis inducida por corticoides en la ONCF en pollos (87). Sakamoto y col. demostraron los efectos de la simvastatina en la supresión de la secreción del inhibidor 1 activador del plasminógeno (IAP-1) inducida por dexametasona en los adipocitos de la médula ósea (91). Jiang y col. publicaron que la Pravastatina previene la ONCF inducida por corticoides en ratas (89). Estudios clínicos también sugieren el efecto protector de los antilipemiantes en la ONCF inducida por corticoides. Pritchett y col. en un estudio sobre 284 pacientes en tratamiento con altas dosis de corticoides que recibieron concomitantemente tratamiento con antilipemiantes, publicaron que solo un 1% de los pacientes desarrollaron una ONCF, incidencia claramente inferior a la publicada para esa población sin tratamiento con antilipemiantes que se sitúa entre el 3% y el 20% (5). Aunque los resultados de los estudios con terapia con antilipemiantes han arrojado resultados prometedores, faltan evidencias clínicas que confirmen los datos de laboratorio. Por otro lado algún estudio no demuestra una reducción clara del riesgo de ONCF inducida por corticoides en pacientes trasplantados renales. Ajmal y col. publicaron que el riesgo de ONCF en esta población era del 4.4% en pacientes que habían recibido tratamiento con antilipemiantes frente al 7% de los pacientes que no lo habían recibido (94).

El uso de anticoagulantes ha sido sugerido en el tratamiento de la ONCF asociada a trombofilias hereditarias y/o hipofibrinólisis (50,55). En un estudio preclínico en conejos Beckmann y col. observaron que el grupo tratado con enoxiparina presentaba una disminución significativa de los signos histopatológicos

de osteonecrosis en comparación al grupo de pacientes sin tratamiento (95). Glueck y col. estudiaron los efectos de la administración de enoxiparina durante 12 semanas en el tratamiento de pacientes que tenían ONCF en estadio precolapso asociada trombofilia o hipofibrinólisis. A los 2 años de seguimiento 89% de las caderas no habían necesitado cirugía y no habían presentado progresión radiológica (3). Resultados similares han sido publicados por otros autores(96).

Las prostaglandinas han sido utilizadas por su efecto vasodilatador en la disminución del edema óseo asociado a la ONCF. Disch y col. publicaron una mejoría clínica y radiológica en un grupo de 17 pacientes afectados de ONCF tratados con prostaglandinas endovenosas durante 1 año de seguimiento (6). Beckmann y col. en un estudio a un año de seguimiento encontraron una respuesta clínica y radiológicamente favorable en el grupo de pacientes con ONCF tratados con una combinación de descompresión central más prostaglandinas (97). Kemper y col. demostraron en un estudio de laboratorio que las prostaglandinas eran capaces de inhibir el efecto supresor de la indometacina sobre la diferenciación de las células mesenquimales en su linaje osteoblástico, sugiriendo un posible mecanismo de acción de las prostaglandinas en la ONCF (98).

El uso de bifosfonatos en el tratamiento de la ONCF se basa en la capacidad del fármaco para inhibir la actividad osteoclástica y por lo tanto la reabsorción ósea en la cabeza del fémur (99–102). Estudios preclínicos en animales han mostrado una disminución en la prevalencia de colapso después del tratamiento con

bifosfonatos (103,104). Argarwala y col. demostraron la eficacia del tratamiento con 10 mg/día de alendronato durante 1 año en la ONCF. Solo 6 de los 60 pacientes tratados requirieron cirugía (99). Lai col. compararon los resultados del tratamiento con 70mg de alendronato durante 25 semanas frente a un grupo control. Tras un mínimo de 24 meses de seguimiento, 2 de 29 caderas en el grupo de alendronato habían presentado colapso frente a 19 de 25 caderas en el grupo control (102).

Entre las modalidades de tratamiento biofísico se incluyen la estimulación electromagnética, las ondas de choque y el oxígeno hiperbárico.

El uso de ondas electromagnéticas en el tratamiento de la ONCF viene avalado por estudios experimentales en animales que sugieren un aumento de la perfusión y una disminución de frecuencia de ONCF en aquellos sujetos tratados con ondas electromagnéticas (105–107). Ishida y col. publicaron que la exposición a ondas electromagnéticas antes de la administración de corticoides podría reducir el riesgo de ONCF. En un estudio en conejos observaron que la frecuencia de osteonecrosis era inferior en el grupo tratado con ondas electromagnéticas, aunque no encontraron un claro efecto de las ondas electromagnéticas sobre el número, localización, extensión y reparación de las lesiones necróticas en los conejos afectados (107). Existen, sin embargo pocos estudios clínicos al respecto que se presentan en forma de series de casos. Massari y col. afirman que las ondas electromagnéticas aplicadas a pacientes con ONCF en estadio I y II evitaron en un 94% de los casos

la progresión a estadio III. El dolor desapareció en el 53% de los pacientes después de 6 días de tratamiento y fue moderado en el 26% (108). (Ilustración 8)



Ilustración 8 Cámara hiperbárica

Tratamiento quirúrgico.

La descompresión central (DC) fue uno de los primeros tratamientos quirúrgicos propuestos para el tratamiento de las estadios iniciales de la ONCF (8). Inicialmente fue utilizada como herramienta diagnóstica en las fases iniciales, cuando el paciente tenía una cadera dolorosa pero radiológicamente normal, formando parte de lo que se conocía como exploración funcional del hueso (EFH). La EFH consistía en una primera fase en la medida de la presión en la médula ósea mediante una cánula colocada en la zona intertrocanterica o en la cabeza femoral bajo anestesia local. En una segunda fase se realizaba una venografía intramedular mediante la introducción de contraste a través de la cánula utilizada para la medición de la presión de la médula ósea. Si estas pruebas permitían establecer un diagnóstico probable de ONCF, se realizaba la DC en una tercera fase para establecer un diagnóstico de certeza. Para ello se introducía una trefina entre 6 y 8 mm. siguiendo el cuello femoral hasta la cabeza del fémur, a través de una apertura en el trocánter mayor. El cilindro óseo obtenido era enviado a anatomía patológica que establecía el diagnóstico de certeza (8). El uso de la DC en el tratamiento de la ONCF se fundamenta, según Ficat y col. en el aumento de la presión intraósea observado en la ONCF secundario al bloqueo de la microcirculación con estasis intramedular. Este aumento de la presión endomedular en la cabeza femoral actúa como un verdadero síndrome compartimental que provoca la necrosis de la cabeza femoral. La DC produce una reducción de la hiperpresión medular, con disminución del dolor y la activación de un proceso de revascularización (8). Los

resultados de la DC se han mostrado claramente superiores a los del tratamiento conservador aplicados en los estadios precolapso de la enfermedad. Los resultados de la DC en el tratamiento de la ONCF fueron revisados en un metaanálisis sobre 1206 caderas por mont y col. Los mejores resultados fueron obtenidos en los pacientes en estadio precolapso ,I y II de Ficat, con un 84% y un 65% de éxito respectivamente (109). Castro y Barrack en un metaanálisis posterior compararon los resultados de 22 estudios de DC con 8 estudios en los cuales los pacientes habían sido tratados de forma conservadora, encontrando una tasa de éxito significativamente superior en los pacientes tratados mediante DC (110). Resultados similares han sido publicados en otros estudios. (Ilustración 9 e Ilustración 10)

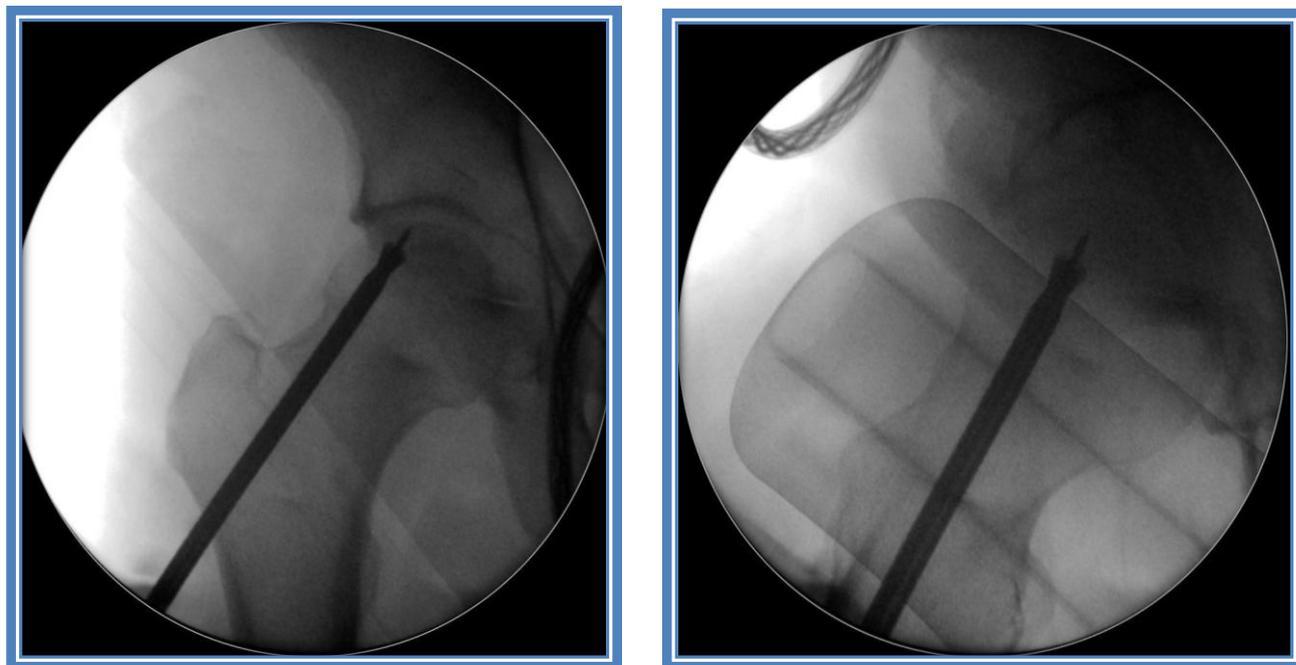


Ilustración 9 Descompresión Central cabeza femoral derecha. Imagen de escopia.

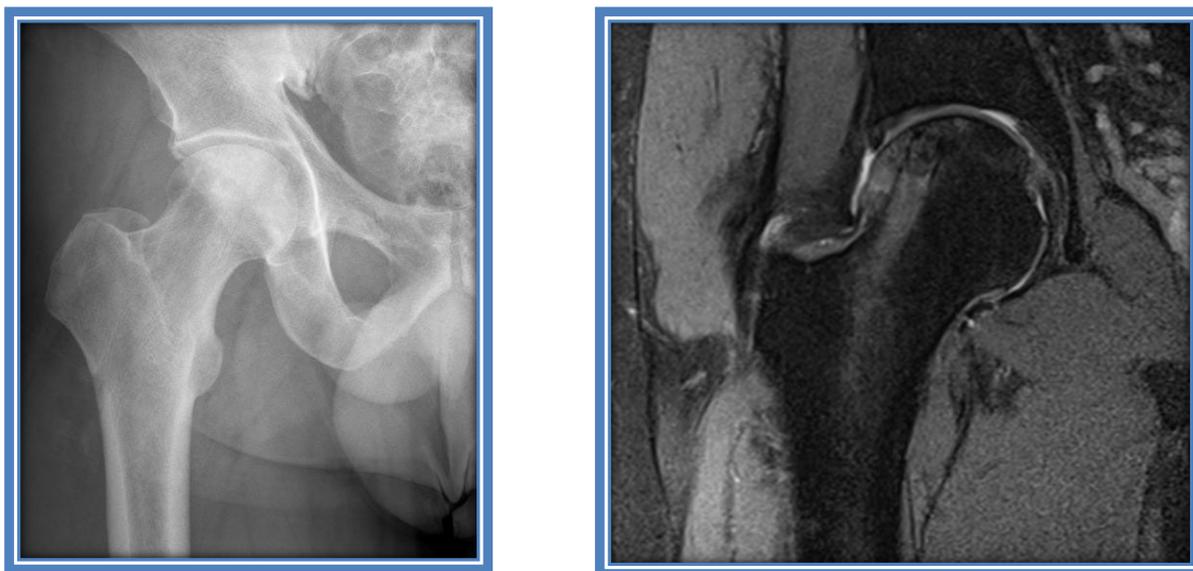


Ilustración 10 Imagen radiológica y de RM de una DC aislada. Se puede observar el trayecto del túnel desde la cortical lateral del fémur hasta la lesión necrótica de la cabeza femoral.

Se han introducido algunas variantes técnicas en la realización de la DC en la ONCF en relación al diámetro del túnel femoral y a la utilización o no de injerto para rellenar el defecto femoral creado (9,85).

Mont y col. describieron una variante técnica que consiste en la realización de múltiples perforaciones de pequeño diámetro (3.2 mm) (111). Las principales ventajas que presentaría la técnica son la accesibilidad a lesiones de localización muy periférica en la cabeza femoral y la disminución del riesgo de colapso iatrogénico y/o fractura stress subtrocantérica (9). Los resultados de Mont y col. fueron similares a los resultados publicados de la DC con trefinas de diámetro superior con mínimas complicaciones. Los resultados exitosos fueron del 80% para el estadio I y del 57% para el estadio II (111). Marker y col. demostraron que la DC

es una técnica que ofrece muy buenos resultados cuando se realiza en estadios precolapso y lesiones pequeñas y que la técnica de perforaciones múltiples de diámetro pequeño es capaz de producir resultados similares a otras variantes de la DC (9).

La utilización de injerto no vascularizado para rellenar el trayecto de la DC tiene las ventajas teóricas de aportar osteoconducción, es decir, soporte estructural y andamiaje para favorecer la reparación y remodelación del hueso subcondral (112–114). Existe, sin embargo, una gran variabilidad en la literatura en relación a la forma de introducción del injerto no vascularizado, el tipo de injerto, y la utilización concomitante de sustancias osteoinductoras. El injerto no vascularizado puede ser introducido mediante técnicas quirúrgicas diferentes a la DC. Se han descrito 3 métodos para la introducción del injerto no vascularizado: Colocación a través del trayecto de una DC, colocación a través de una ventana en el cartílago articular – light bulb - o la colocación a través de una ventana en el cuello femoral – trap door - (24). Por otro lado se han publicado algunas variantes referidas al tipo de injerto utilizado en el relleno de la cavidad femoral. Entre las distintas variedades de osteoconductores lo más utilizado han sido el auto o aloinjerto óseo en forma de chips de esponjosa o en forma de láminas corticales. Otros osteoconductores utilizados han sido la matriz ósea desmineralizada o distintos tipos de fosfatos cálcicos. Entre los osteoinductores utilizados destaca la proteína morfogenética humana o los factores de crecimiento. Rosenwasser y col. publicaron una tasa de éxito del 87% a 12 años utilizando autoinjerto de esponjosa

a través de una ventana en el cuello femoral (114). Mont y col. utilizando una técnica quirúrgica similar publicaron un tasa de éxito del 86% a 4.5 años con una combinación de matriz ósea desmineralizada, aloinjerto de esponjosa y un material termoplástico (113). Rijnen y col. publicaron una tasa de éxito del 71% utilizando una combinación de auto y aloinjerto a través de un DC tradicional. Lieberman y col. publicaron el uso de proteína morfogenética humana combinada con aloinjerto óseo a través de un DC obteniendo una tasa de éxito del 82.4 % en 17 caderas (112).

La utilización de injerto vascularizado se desarrolló con el objetivo de añadir a la DC el soporte estructural del injerto óseo y restablecer la circulación de la cabeza femoral (115–127).

Se han descrito 2 tipos de injerto vascularizado: Injerto procedente de cresta ilíaca e injerto procedente de peroné. Este procedimiento, sin embargo es técnicamente difícil pues requiere de sutura microquirúrgica, un tiempo quirúrgico prolongado y se asocia a distintos grados de morbilidad en la zona dadora (128,129). Tang y col. publicaron que el 42% de los pacientes intervenidos de injerto de peroné vascularizado refería síntomas subjetivos de inestabilidad y el 37% de debilidad en la zona dadora. El primer dedo del pie presentaba objetivamente una disminución de la fuerza en flexión y en extensión en el 29% y el 43% de los pacientes respectivamente (129). Vail y col. en un estudio sobre 198 pacientes observaron que la prevalencia de debilidad muscular en la zona dadora

era baja a los 5 años – 2.7% - , mientras que las alteraciones sensitivas y el dolor aumentaban con el tiempo alcanzando una prevalencia del 11.8% y del 17.6% (130). Aldridge y col. publicaron que la tasa de supervivencia era del 64.5% a los 4.3 años en 224 pacientes con lesiones poscolapso (121). Algunos estudios han comparado los resultados del tratamiento mediante injerto vascularizado frente a la DC, concluyendo que no existen diferencias significativas en las tasas de éxito en los estadios I y II de Ficat. Sin embargo los resultados han sido significativamente superiores en estadios III de Ficat, lo cual justificaría en estos casos su uso a pesar de la morbilidad asociada en la zona dadora. (117). (Ilustración 11)

Los mejores resultados publicados sobre el uso de injertos vascularizados se han publicado para lesiones en estadio precolapso y de pequeño o mediano tamaño. Urbaniak y col. publicaron que la tasa de conversión a prótesis total de cadera a los 5 años era del 11% en las lesiones precolapso frente al 23% en las lesiones poscolapso (128).

El objetivo de las osteotomías es trasladar el segmento de hueso necrótico lejos de la zona de carga de la articulación. Se han descrito 2 tipos de osteotomía: Osteotomías angulares intertrocantéricas en varo o valgo y osteotomías rotacionales transtrocantéricas. Las osteotomías rotacionales permiten un mayor rango de desplazamiento pero son técnicamente más difíciles y presentan un mayor prevalencia de complicaciones. Los resultados publicados sobre las osteotomías

son variables con tasas de éxito que oscilan entre el 40% al 96% entre los 3 y los 26 años, según los estudios.

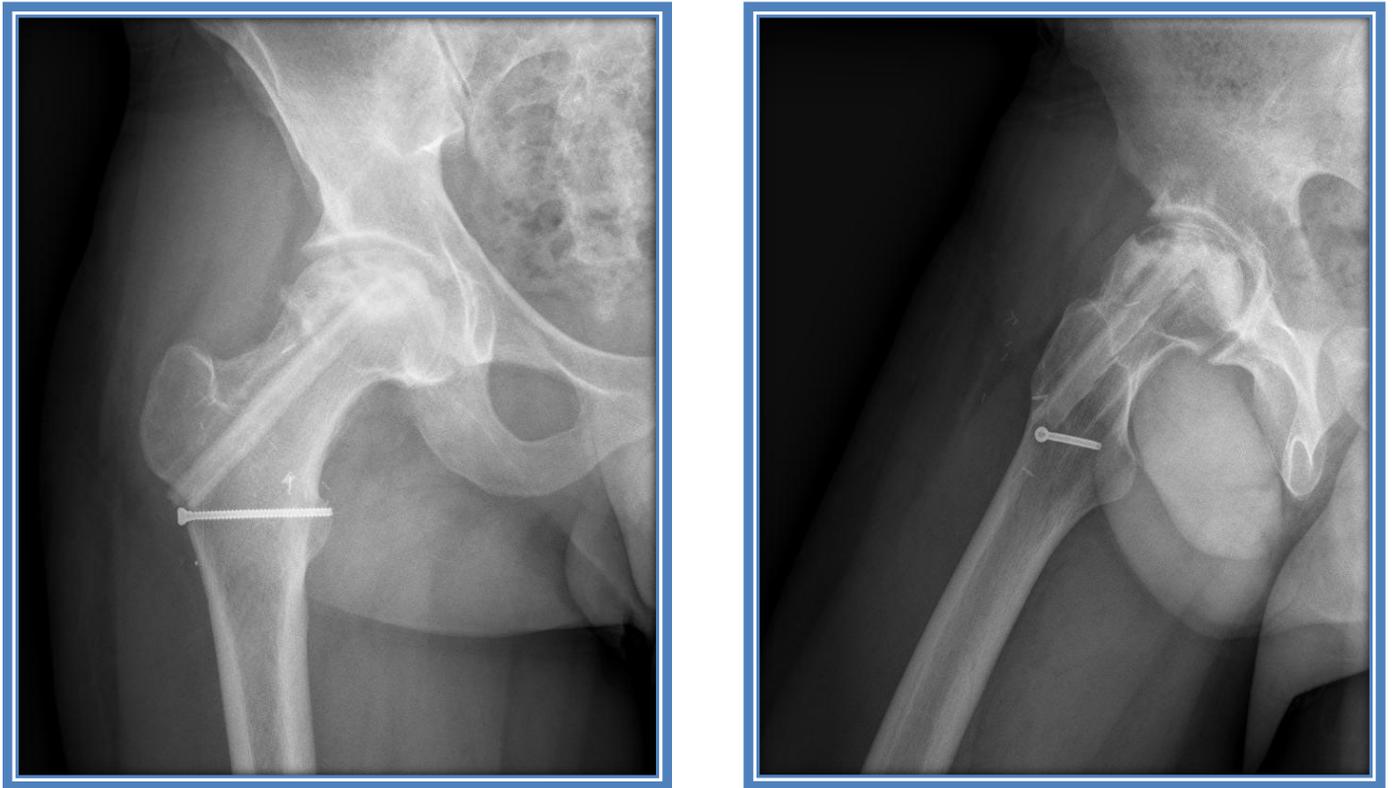


Ilustración 11 Radiografía simple. Peroné Vascularizado en ONCF grado III

Descripción y tipos de células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales adultas (CMM) son células de fácil obtención que asientan en distintos tejidos mesenquimales del cuerpo tales como la médula ósea o la grasa periférica. Se caracterizan por su gran capacidad de multiplicación sin perder sus características moleculares específicas y diferenciación potencial en cualquier célula de linaje mesenquimal como el osteoblasto, el condrocito o el adipocito. El fenotipo que las caracteriza ha sido definido como STRO-1, CD73, CD146 Y CD106 positivo y CD11b, CD45, CD34, CD31 y CD117 negativo (131).

Las CMM se caracterizan por presentar una actividad claramente regenerativa, inhibiendo el tejido cicatricial y la apoptosis, estimulando la angiogénesis y potenciando la mitosis celular del tejido intrínseco en el que asienta. Además son potentes moduladores de la respuesta inmune, exhibiendo capacidad antiproliferativa sobre los linfocitos T y B. Esta actividad inmunosupresora está inducida por una combinación de citoquinas inflamatorias tales como el interferón-gamma, factor de necrosis tumoral –alfa, interleuquina 1 alfa y 1 beta (132,133)

Las CMM pueden utilizarse en suspensión o adheridas a distintas matrices que actúan como transportadores. Existen diferentes tipos de de matrices. Las matrices de origen natural como el colágeno, la fibrina, el hialurónico o el condroitin sulfato tienen la ventaja de mimetizar ciertos aspectos de la matriz extracelular facilitando la adherencia celular, la migración y diferenciación mientras presentan una biocompatibilidad y biodegradabilidad óptima. Entre sus desventajas figura que

requieren unos protocolos de purificación amplios y a la potencial capacidad para la transmisión de enfermedades cuando son obtenidos de animales u otros seres humanos. Por otra parte los biomateriales sintéticos como las cerámicas ofrecen la ventaja de una gran estabilidad primaria y mayor capacidad para la formación de micro y macroestructuras (10). (Ilustración 12)

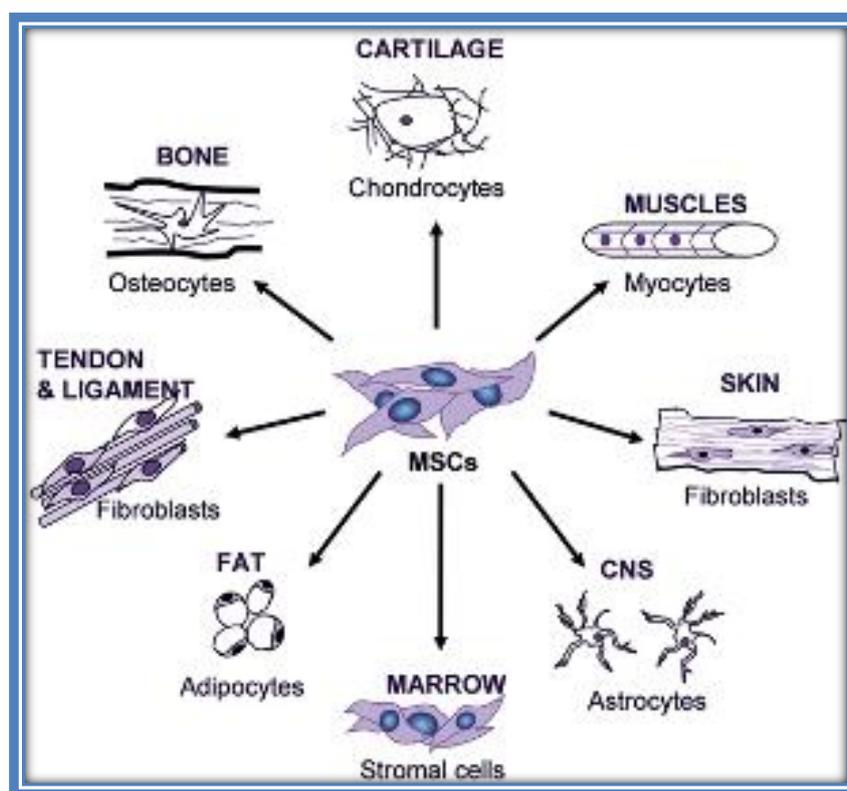


Ilustración 12 Células Madre Mesenquimales

Aplicaciones en cirugía ortopédica de las células madre mesenquimales.

La capacidad regenerativa de las CMM han sido probadas en múltiples procedimientos en cirugía ortopédica y traumatología, fundamentalmente en lesiones focales de cartílago, artrosis, defectos óseos, pseudoartrosis, lesiones ligamentosas, tendinopatías, fusiones vertebrales y osteonecrosis (10,15).

Wakitani y col. publicaron los resultados de la utilización de CMM colonizadas en un hidrogel de colágeno para el tratamiento de lesiones focales de cartílago en la rótula de 3 pacientes. Un año después del procedimiento los paciente habían mejorado clínicamente y presentaban un relleno fibrocartilaginoso a nivel de la lesión (134). Por otra parte Kuroda y col. encontraron cartílago hialino like en el examen histológico de un defecto en el cóndilo femoral tratado con CMM (135).

En contraste con las lesiones focales del cartílago, la artrosis afecta en la mayoría de las ocasiones a un compartimento articular completo lo que dificulta enormemente su manejo con una terapia celular. Las CMM, introducidas mediante inyección intraarticular se distribuye por el espacio articular e interactúan con receptores celulares de la articulación. El tejido sinovial, altamente celular, se cree que es el primer tejido en interactuar con las CMM (10). Muy pocos estudios han sido publicados sobre los resultados de las CMM intraarticulares en el tratamiento de la artrosis. Murphy y col. observaron una disminución de la degeneración

articular y una marcada regeneración meniscal en cabras tratadas con inyección intraarticular de CMM para el tratamiento de una artrosis inducida (136).

Las CMM han sido utilizadas en diferentes modelos animales para la restauración de grandes defectos óseos asociada a diferentes biomateriales observándose una tasa de curación significativamente superior en los casos tratados con CMM (137–140). Quarto y col. publicaron buenos resultados en el tratamiento con CMM expandidas de 3 pacientes con un defecto óseo entre 4 y 7 cm. Los 3 pacientes presentaron una consolidación clara 2 meses después de la cirugía (138).

Las CMM se han mostrado efectivas en la curación de lesiones tendinosas tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in vivo*. Awad y col. observaron una mejora significativa de las propiedades mecánicas de tendones patelares de conejo tratados con un hidrogel rico en células madre frente a un hidrogel acelular, 4 semanas después de la cirugía (141,142). Young y col. observaron una mejoría significativa tanto desde el punto de vista biomecánico como histológico en tendones Aquiles de conejo tratados con CMM (143).

Aplicaciones en Osteonecrosis de las células madre mesenquimales.

Las CMM han sido utilizadas en el tratamiento de la osteonecrosis para potenciar el efecto angiogénico y osteogénico de la DC.

Estudios preclínicos han demostrado que las MSC son capaces de sobrevivir, multiplicarse y diferenciarse en osteoblastos en la ONCF (144,145). Las MSC pueden ser obtenidas mediante aspiración de la médula ósea o de la grasa periférica y sometidas a un proceso de concentración mediante centrifugación que separa las células madre del plasma y las células sanguíneas (12). Algunos estudios han demostrado que el uso del concentrado de las células mesenquimales es superior al uso del aspirado de médula sin concentrar en la osteonecrosis de cadera. El número y la calidad de las células mesenquimales aspiradas desde la médula ósea dependen de la edad, el sexo o patologías concomitantes como puede ser el uso de corticoides. Una de las limitaciones en su utilización se deriva del desconocimiento a priori de la cantidad y calidad de las células presentes en el concentrado ya que su recuento se hace en el laboratorio una vez el paciente ha sido intervenido. Por otro lado no existe evidencia sobre la cantidad mínima requerida de células mesenquimales en el tratamiento de la osteonecrosis de cabeza femoral.

Hernigou y col. fueron los primeros en utilizar el concentrado de médula ósea en el tratamiento de la ONCF en 189 casos (116 pacientes) con un seguimiento medio de 7 años. El concentrado de CMM fue aplicado directamente, instilado, a

través de una DC. Aunque los resultados clínicos fueron aceptables, un 25,39% y un 31,4% de los pacientes en estadio I y II de Steimberg presentaron progresión radiológica de la enfermedad respectivamente. De ellos 6,21% requirieron la colocación de una prótesis total de cadera, la mayoría durante los primeros 3 años de seguimiento. El porcentaje de pacientes con evolución radiológica aumentó hasta el 100% de los pacientes en estadio III y IV de Steimberg. De ellos 56,82% precisaron de la colocación de una prótesis de cadera. (12) En una serie posterior con 534 casos en estadio I y II con un seguimiento medio de 13 años el porcentaje de pacientes que precisaron una prótesis total de cadera ascendió a 17,6 % (146).

Otros autores han publicado resultados similares instilando células mesenquimales a través de descompresiones del núcleo de 3 mm (147). Gangji y col. En un estudio controlado y randomizado comparó los resultados de la descompresión central aislada frente a la combinación de descompresión central más concentrado de médula ósea en pacientes en estadio I y II de ARCO. 10% de los pacientes del grupo de estudio presentaron una progresión radiológica a estadio III frente al 62,5 % de los pacientes del grupo control (148). Más recientemente el mismo grupo publicó los resultados a 5 años de seguimiento de 24 casos en un estudio randomizado a doble ciego. El porcentaje de pacientes con progresión radiológica en el grupo de estudio aumentó hasta el 23,08% frente al 72,73% del grupo control (13). Kumar Sen y col. en un estudio comparativo entre descompresión central con y sin células mesenquimales mediante perforaciones múltiples de 4 mm. , tomando como punto final la necesidad de una nueva cirugía,

encontraron que la supervivencia media a los 12 meses era significativamente superior en el grupo que recibió el concentrado de células mesenquimales (46,72 +/- 2,34 semanas Vs 51,85 +/- 0,15 semanas). Sin embargo no hubo diferencias significativas en la mejora radiológica entre los 2 grupos (149).

Otros autores han utilizado el concentrado de células mesenquimales asociado a una matriz osteogénica con el objetivo de rellenar el defecto necrótico, aportar resistencia biomecánica y transportar las células mesenquimales (22,150,151). Liu y col. Realizaron un estudio comparativo en pacientes con ONCF utilizando concentrado + implantación de partículas de hidroxapatita frente a partículas de hidroxapatita aisladas. Aunque ambos tratamientos fueron efectivos la tasa de colapso fue inferior en el grupo en el que se utilizó células mesenquimales (150). Por su parte Kang y col. utilizaron injerto autólogo de cresta ilíaca asociado al concentrado de células mesenquimales para el relleno de la cavidad desbridada. 65,7% de los pacientes en estadio 2 presentaron un resultado clínico exitoso (151).

El desarrollo de la ingeniería tisular y los resultados de estudios sobre los posibles orígenes celulares de la ONCF han impulsado al desarrollo de la terapia celular de la enfermedad a nivel experimental. Para superar los problemas derivados del tratamiento utilizando concentrados de MSC de la MO en los cuales tanto el número como la actividad de estas células puede estar disminuido, es fundamental cultivar y expandir *in vitro* las MSC, con el objetivo de optimizar la eficacia de este tratamiento en la regeneración ósea (152,153). Tang y

colaboradores realizaron un estudio de terapia celular en ONCF en cabras utilizando una modificación de la inducción de osteonecrosis publicada por Conzemijs (154,155). En el estudio los autores indujeron la osteonecrosis bilateral mediante ligadura vascular y modificaron la lesión criogénica realizando una administración por goteo intracefálico de nitrógeno líquido. Tras 3 semanas de la inducción de la osteonecrosis se les realizaba una descompresión central bilateral implantando un cilindro poroso de β -TCP (trifosfato cálcico) cargado con cultivo de MSC modificados genéticamente (células transducidas con el gen BMP-2 lado izquierdo y el gen β -galactosidasa lado derecho). Los autores compararon los grupos a las 16 semanas de los cuales solo las cabras del grupo control presentaban colapso de la cabeza femoral. Independientemente que los dos grupos con tratamiento fueron capaces de reparar las lesiones necróticas, el grupo con BMP-2 mostró mejores resultados histológicos y biomecánicos. Yang y colaboradores realizaron un estudio en cabras de características similares al de Tang y compararon el tratamiento con la utilización de matriz ósea desmineralizada contra la implantación de una jaula de biomaterial relleno de matriz ósea desmineralizada encontrando mejores resultados radiológicos, histológicos y biomecánicos en el segundo grupo (156). Asada y colaboradores publicaron los resultados de la inyección de cultivos de MSC derivados de la MO en la prevención de la osteonecrosis inducida por corticoides en conejos. Tras 2 días los conejos eran separados en diferentes grupos que incluían el grupo control (sin tratamiento), el grupo descompresión (perforación lateral femoral de 1,2mm), el grupo salino

(inyección directa de solución salina), y el grupo BMC (inyección directa de cultivo celular). Los autores concluyeron que la inyección directa de MSC tenía un efecto protector en osteonecrosis femoral inducida por la administración de altas dosis de corticoides al tener una incidencia de 0% de osteonecrosis comparado con 70% aproximado en los otros grupos (157).

Nuestro grupo de investigación realizó un estudio preclínico terapéutico utilizando un modelo animal de ONCF de ovejas propio. Se utilizaron 12 ovejas que tras una inducción de osteonecrosis mediante criosonda de nitrógeno líquido y ligadura vascular de la epífisis proximal del fémur se distribuyeron de la siguiente manera: 2 ovejas eran tratadas con descompresión central aislada, 5 ovejas eran tratadas mediante descompresión central asociada a la implantación de un constructo de matriz ósea, y 5 ovejas eran tratadas mediante descompresión central asociada a la implantación de un constructo de matriz ósea colonizado con cultivo de células madre derivadas de la MO, (XCEL-MT-OSTEO-ALPHA). Se realizó un seguimiento clínico mediante resonancia magnética (RM) y anatomía patológica. Ninguna de las ovejas del grupo de descompresión central o del grupo de descompresión central asociado al constructo de matriz ósea sin células, demostró regeneración ósea en el área de isquemia severa. Dos de las ovejas, 40% de las muestras, del grupo de descompresión central asociado a la implantación de un constructo colonizado con cultivo de células madre presento evidencia de regeneración ósea en el área isquémica. En el área de transición todas las muestras del grupo de células madre mostraron nuevamente regeneración ósea. Se concluyó

del estudio terapéutico que la descompresión central aislada o asociada a la implantación de un constructo de matriz ósea no estimula la regeneración ósea en un modelo ovino de ONCF. Sin embargo la descompresión central, asociada a la implantación de un constructo de matriz ósea colonizado con células madre de la MO, estimula la regeneración ósea en un modelo ovino de ONCF. En el marco de la investigación traslacional desde laboratorio a la práctica clínica era necesario el diseño de un ensayo clínico en fase I-II para la evaluación de la viabilidad de la técnica quirúrgica y la seguridad del producto (XCEL-MT-OSTEO-ALPHA) utilizado el modelo preclínico, así como proporcionar información preliminar sobre la eficacia del tratamiento. Dado que en nuestro modelo preclínico de ONCF, la aplicación de un constructo colonizado con células madre (XCEL-MT-OSTEO-ALPHA) ha estimulado la regeneración ósea, se plantea un nuevo enfoque terapéutico en el contexto de la ONCF en la clínica humana (16).

(Ilustración 13 e Ilustración 14)

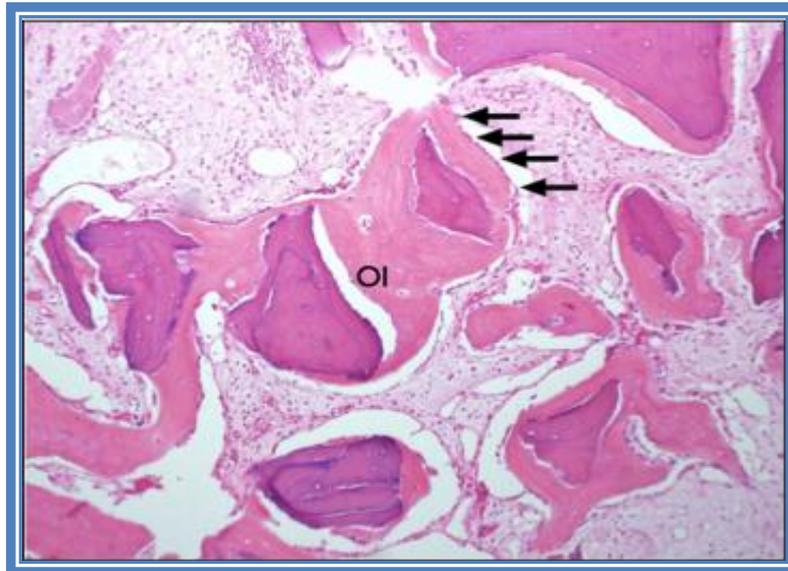


Ilustración 13 *n* ósea con osteoide inmaduro (OI), con osteocitos y rodeado por osteoblastos alineados (flechas). Grupo ovejas tratadas con células cultivadas HE 40x

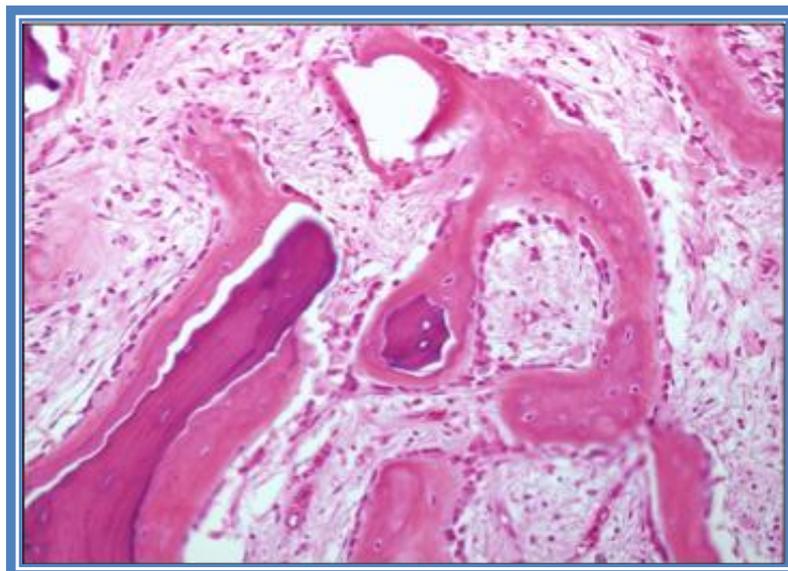


Ilustración 14 Microscopio de luz enfocado en área 1 (isquémica) donde se visualiza osteoide inmaduro rodeado por una capa de osteoblastos en un tejido de fibrosis medular. Grupo de ovejas tratadas con células cultivadas HE 100x

Complicaciones asociadas a la terapia celular con células madre.

Existe poca experiencia sobre la seguridad del uso de CMM en experimentación clínica por lo que no se pueden sacar conclusiones definitivas sobre las complicaciones asociadas. En general la terapia con CMM es bien tolerada en la mayoría de los estudios con ausencia de efectos adversos, aunque unos pocos estudios reportan leves y transitorias molestias en el lugar de la inyección. Además las CMM han sido asociadas con la promoción del crecimiento tumoral (158,159).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La implantación de células madre mesenquimales expandidas “ex vivo” (XCEL-MT-OSTEO-ALPHA) asociadas a la descompresión central en la ONCF estimula la regeneración ósea y previene el colapso de la cabeza femoral.

OBJETIVOS

Objetivo Principal

- Evaluar la eficacia de la descompresión central asociada a la implantación de un constructo de matriz ósea colonizado con cultivo de células madre mesenquimales expandidas “ex vivo”, (XCEL-MT-OSTEO-ALPHA), mediante la medición de la captación de contraste y la reducción del ángulo de Kerboul en las imágenes de RM con contraste, después de 6 y 12 meses.

Objetivos secundarios.

1. Evaluar la viabilidad del procedimiento y la seguridad de la implantación de XCEL-MT-OSTEO-ALPHA al aplicarse vía percutánea tras una descompresión central para la ONCF, registrando los posibles acontecimientos adversos (AA) relacionados con esta terapia celular.
2. Determinar la evolución clínica mediante la EVA del dolor y la puntuación WOMAC a los 3, 6 y 12 meses de haberse efectuado el tratamiento.
3. Determinar la supervivencia mediante estudio radiológico convencional tomando como evento final la aparición de colapso.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de Estudio

Ensayo clínico aleatorizado en fase I-II de dosis única.

Población de referencia

Pacientes diagnosticados de ONCF en el área geográfica de Cataluña.

Población elegible

Pacientes procedentes de la población de referencia anteriormente descrita que se encontraban en un estadio evolutivo grado I o II de la clasificación de la asociación para el estudio de la regeneración ósea - ARCO – y cumplieran con los criterios de inclusión y no con los criterios de exclusión.

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

1. Pacientes de 18 a 50 años de edad.
2. Osteonecrosis de la cabeza femoral estadio I-II de ARCO.
3. Ausencia de proceso séptico local o sistémico.
4. Análisis hematológicas y bioquímicas sin alteraciones significativas que contraindiquen la intervención.
5. Consentimiento Informado por escrito del paciente.
6. El paciente es capaz de entender la naturaleza del estudio.

Criterios de exclusión

1. Osteonecrosis de la cabeza femoral secundarias a fracturas del cuello
2. Paciente con cartílagos de crecimiento abiertos
3. Presencia de implantes a nivel de la cabeza femoral
4. Artritis séptica.
5. Pacientes que presenten serología positiva frente a HIV 1 y 2, Hepatitis B (HBsAg), Hepatitis C (Anti-HCV-Ab) o Lúes.
6. Mujeres embarazadas o que pretenden estarlo en los siguientes 12 meses a la firma del consentimiento informado y mujeres en periodo de lactancia.
7. Enfermedad neoplásica detectada en los últimos cinco años o sin remisión completa.
8. Estados inmunodepresivos
9. Paciente legalmente dependiente
10. Participación simultánea en otro ensayo clínico o tratamiento con otro producto en fase de Investigación en los 30 días previos a la inclusión en el estudio.
11. Otras patologías o circunstancias que puedan comprometer la participación del paciente en el estudio según criterio médico.

12. Portador de marcapasos, alergia al contraste, insuficiencia renal severa o cualquier otra contraindicación para realizar RM con contraste.

13. Negación del paciente a ser seguido por un periodo que podría exceder el ensayo clínico en sí.

Aleatorización de los pacientes

Para asegurar que los 2 grupos de pacientes fueran homogéneos se realizó una aleatorización mediante una tabla de bloques de 4.

Número de pacientes

El estudio estuvo constituido por 16 caderas en 14 pacientes. Ocho caderas fueron incluidas en el grupo de estudio y 8 caderas fueron incluidas en el grupo control.

Tratamiento grupo de estudio

Método de obtención de la médula ósea por punción - aspiración

La punción-aspiración de MO se realizó en quirófano, en decúbito prono, acomodado con almohadas y bajo sedación o anestesia regional. Como instrumental para realizar el aspirado se utilizó (Ilustración 15):

- Jeringas de 20 ml y 50 m.
- Trocares de 11 G y 10 mm. de longitud.
- Heparina.
- Anticoagulante ACD-A.
- Suero fisiológico.
- Tubos y bolsas de recolección.



Ilustración 15 Set de extracción de médula ósea.

Seguidamente, se procedió a pincelado del campo quirúrgico con solución alcohólica de povidona yodada (clorhexidina si existen antecedentes de alergia al yodo) y delimitación con campos estériles dejando libres ambas crestas ilíacas posteriores. Con el trocar de 11 G se realizaron diversas punciones localizadas bajo la espina ilíaca posterosuperior en dirección a la articulación sacroilíaca (esta es la zona del ilíaco con mayor densidad trabecular). La técnica implica la perforación cortical y aspiración súbita de 1mL de médula ósea como máximo para evitar en lo posible el aspirado de sangre periférica. El material obtenido se inyectó en la bolsa suministrada para el transporte que previamente había sido heparinizada con dosis adecuada al volumen de sangre. Las 2 sucesivas aspiraciones se realizan rotando 90° en sentido de las agujas del reloj el trocar biselado. El mismo orificio de punción permite profundizar 1-2 mm unas dos veces, repitiendo la misma metodología de aspiración de 1 ml., cambio de jeringa, rotación del bisel 90° y nueva aspiración. Luego el trocar se retira ligeramente y deslizándolo unos pocos milímetros sobre la cortical de la pelvis puede repetirse la punción, continuando en ambos lados de la pelvis hasta conseguir el volumen necesario. (Ilustración 16) El tiempo de obtención del material celular es crítico. La contaminación puede invalidar todo el proceso. Por otra parte el procesado celular se realizará sobre la muestra obtenida. Si la cantidad recolectada de células progenitoras es baja, la expansión dará un producto de capacidad biológica limitada. Siguiendo los requisitos establecidos por la legislación, el material aspirado se transportó a XCELIA - División de Terapias Avanzadas del Banco de Sangre y Tejidos (BST)

en condiciones reglamentadas y temperatura ambiente (15 a 25 °C) en un máximo de 4 h. (Ilustración 17)

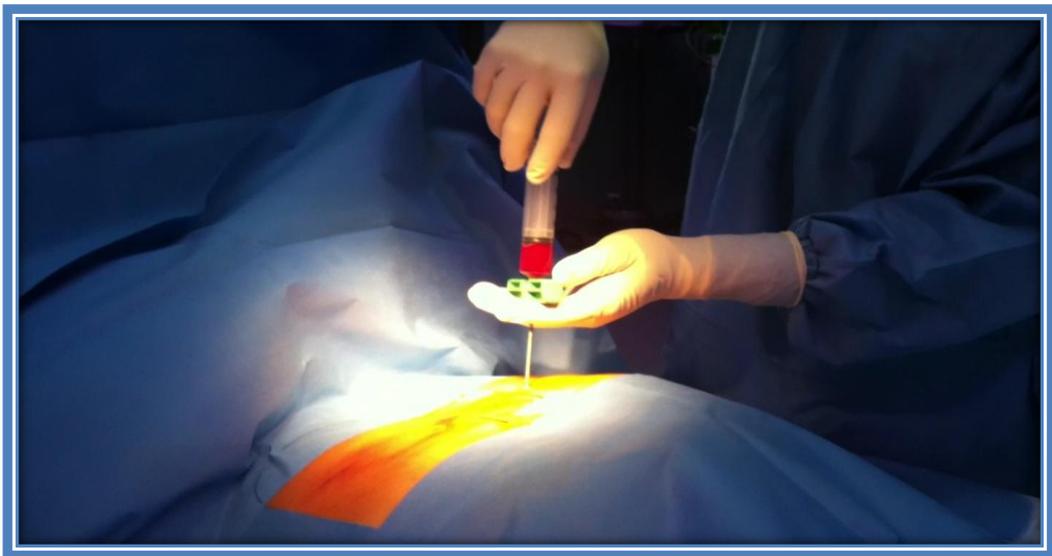


Ilustración 16 Aspirado de médula ósea cresta ilíaca posterior.



Ilustración 17 Bolsa de transporte aspirado de médula ósea

Descompresión central

Los pacientes se colocaron en decúbito supino en una mesa de tracción y bajo anestesia regional se realizó una incisión de 1 cm en la cara lateral justo por debajo del tubérculo adductorum de la cadera afectada. Bajo control con el intensificador de imágenes radiológicas se introdujo una aguja guía desde la cortical lateral y en dirección cefálica hasta llegar a 2-3 mm subcondrales atravesando la zona necrótica. La aguja guía fue colocada en el centro de la lesión necrótica tanto en la proyección anteroposterior como en la proyección axial con un ángulo de incidencia de 90° con respecto a la misma. A través de esta aguja guía se introdujo una broca de 8 mm. de diámetro, brocándose justo hasta la frontera de la lesión necrótica, perforando la resistente banda ósea que la rodea. (Ilustración 18) A través del orificio brocado se introdujo una trefina de 7 mm. profundizándola hasta 2-3 mm. subcondrales. El cilindro necrótico extraído a través de la trefina fue enviado para su estudio histológico y confirmación anatomopatológica del diagnóstico por la imagen. (Ilustración 19)



Ilustración 18 Labrado de un túnel femoral desde la cortical lateral hasta la zona necrótica en la cabeza femoral con broca 8 mm. Control de escopía



Ilustración 19 Biopsia de la zona necrótica con una trefina de de 7 mm. Control de escopía

Cultivo de las CMM

Se efectuó la selección de la fracción de células mononucleares y cultivo durante un periodo de 3 semanas con metodología GMP de XCELIA - División Terapias Avanzadas del BST para producir una dosis de 25 a 55 x10⁶ células mesenquimales (Ilustración 20). Se combinó dichas células mediante proceso de colonización a matrices de hueso humano alogénico procedente de banco de tejidos, obteniéndose XCEL-MT-OSTEO-ALPHA. (Ilustración 21)

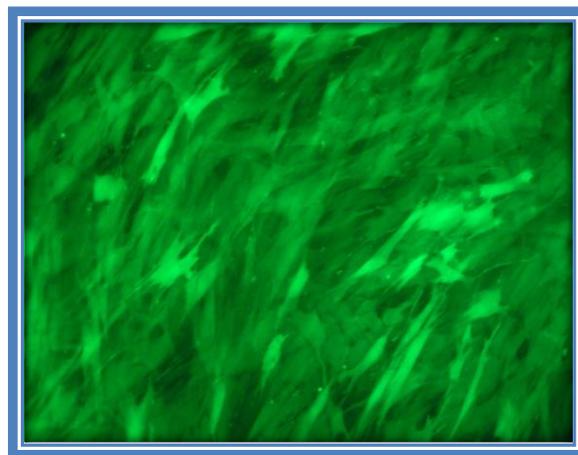


Ilustración 20 Cultivo de células mesenquimales



Ilustración 21 Colonización de partículas óseas con células

El producto o medicamento en estudio llamado XCEL-MT-OSTEO-ALPHA consiste en células mesenquimales de médula ósea autóloga expandidas “ex vivo” y combinadas mediante proceso de colonización a matrices de hueso humano heterólogo. El proceso de fabricación de este producto de Ingeniería Tisular se realiza por especialistas altamente cualificados bajo las Normas de Correcta Fabricación (GMP) en la División de Terapias Avanzadas del BST. Tal y como se ha mencionado el producto XCEL-MT-OSTEO-ALPHA posee un principio

activo (PA) consistente en células mesenquimales. Las células empleadas para la fabricación del producto presentan las características definitorias de Mesenchymal Stromal Cells (MSC) establecidas por la International Society for Cellular Therapy (ISCT).

El proceso de expansión de las MSC “ex vivo” empleado permite generar la cantidad necesaria de forma muy eficiente. En consecuencia las células realizan un reducido número de duplicaciones en cultivo hecho que favorece el mantenimiento de la capacidad multipotencial y la estabilidad genética del producto. Se trata por lo tanto, de una fuente celular bien caracterizada, segura y por otro lado ampliamente utilizada en el ámbito terapéutico. Una de las características definitorias de las MSC es la capacidad de diferenciarse para dar lugar a células de tejido óseo. Diferenciación que está condicionada a que estas células reciban los estímulos bioquímicos adecuados. En este sentido el segundo constituyente del PA, las matrices de hueso esponjoso, aportan propiedades de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis bien conocidas. Estas matrices se obtienen del Banco de Tejidos del Banc de Sang i Teixits y por lo tanto cumplen todos los requisitos legales vigentes.

Como fuente celular de obtención de las XCEL-MT-OSTEO-ALPHA se utiliza aspirado de médula ósea (MO) del propio paciente sometido al procedimiento anticoagulante protocolizado. Tras comprobar el perfecto estado del envío y comprobar la documentación que lo acompaña, se lleva a cabo el su procesado. El

procesado y multiplicación de las células recolectadas de MO usando el procedimiento de XCELIA - División Terapias Avanzadas del BST dura 21 días (desde la obtención de la MO hasta la obtención de XCEL-MT-OSTEO-ALPHA). Las células mononucleares (CMN) se separan mediante gradiente de densidad con Ficoll. Posteriormente y de forma previa a la siembra se lleva a cabo un estudio de viabilidad celular. Comprobado el buen estado de las células éstas se siembran en frascos de cultivo en medio DMEM suplementado con 10% de suero humano (SH). Durante el cultivo se efectúan 2 procesos de tripsinización o pases, que tienen como objetivo el multiplicar y purificar la estirpe celular. Al finalizar la etapa de cultivo se realiza la caracterización de las células obtenidas mediante estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo, utilizándose para ello los marcadores establecidos para este tipo de células debiendo resultar un fenotipo celular positivo para las células mesenquimales.

Tras la caracterización de las MSC se procede a colonizar las partículas de hueso esponjoso. Para realizar este proceso se adiciona la cantidad requerida de MSC a una bolsa de cultivo que contiene el hueso esponjoso y Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de SH. Tras el cultivo se elimina el medio y se lava exhaustivamente la bolsa con solución salina balanceada (PBS). Finalmente se acondiciona el producto con PBS y albúmina humana. Para la liberación en condiciones de seguridad del lote se realiza un test de endotoxinas, un test microbiológico y se determina el éxito del proceso de inmovilización de las células. (Ilustración 22)

XCEL-MT-OSTEO-ALPHA es estable a temperatura ambiente y se transporta mediante contenedor isotérmico. Las condiciones de esterilidad, limpieza y control de calidad de la unidad de producción celular se mantendrán siguiendo los pasos definidos en los Procedimientos Normalizados de Trabajo que establecen las normas GMP de XCELIA - División Terapias Avanzadas del BST.



Ilustración 22 Constructo fabricado con injerto óseo

Implantación de XCEL-MT-OSTEO-ALPHA

Una vez en quirófano, se adicionó una solución de trombina/fibrinógeno comercial (Tisucol, Baxter) a XCEL-MT-OSTEO-ALPHA y se modeló un cilindro de aproximadamente 6 cm de longitud x 0.7 cm de diámetro. (Ilustración 23, Ilustración 24 e Ilustración 25) Este cilindro se implantó percutáneamente en la cabeza femoral a través del túnel de 8 mm labrado previamente hasta el área necrótica con ayuda de un trocar. Una vez correctamente posicionado, se empuja el émbolo del trocar, introduciéndose el constructor con el cultivo de células madre dentro del área necrótica.

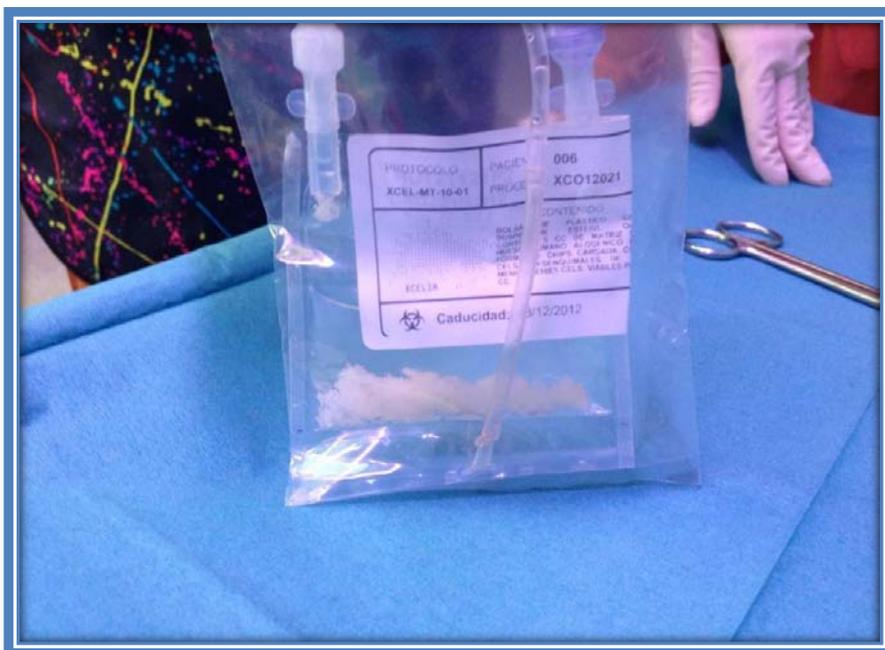


Ilustración 23 Bolsa de suministro del hueso esponjoso liofilizado una vez colonizado por células madre mesenquimales.



Ilustración 24 Preparación cilindro óseo en quirófano

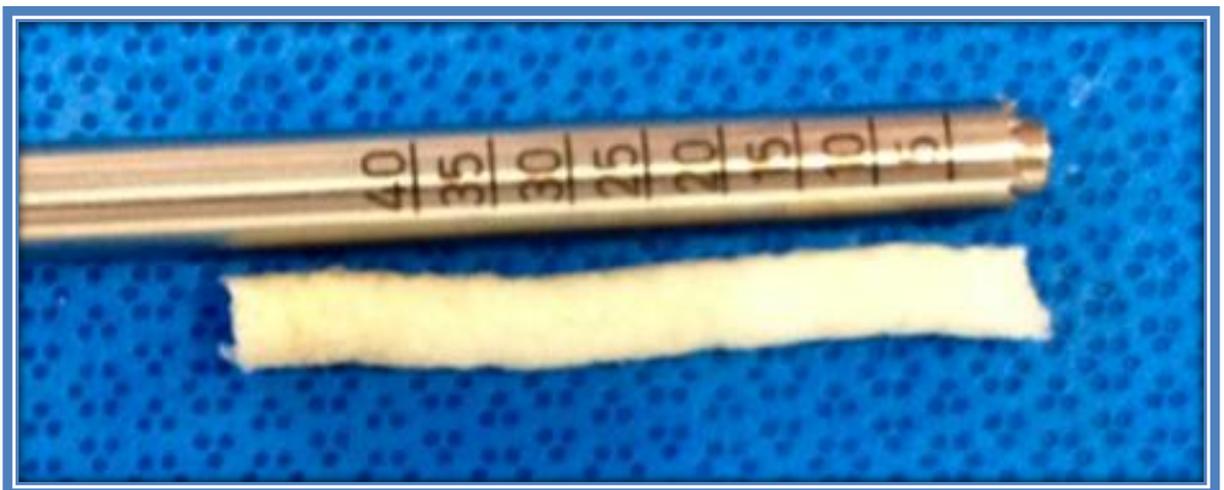


Ilustración 25 Aspecto macroscópico cilindro óseo

Tratamiento y procedimientos del grupo control

Descompresión Central

Los pacientes se colocaron en decúbito supino en una mesa de tracción y bajo anestesia regional se realizó una incisión de 1 cm en la cara lateral justo por debajo del tubérculo adductorum de la cadera afectada. Bajo control con el intensificador de imágenes radiológicas se introdujo una aguja guía desde la cortical lateral y en dirección cefálica hasta llegar a 2-3 mm subcondrales atravesando la zona necrótica. La aguja guía fue colocada en el centro de la lesión necrótica tanto en la proyección anteroposterior como en la proyección axial con un ángulo de incidencia de 90° con respecto a la misma. A través de esta aguja guía se introdujo una broca de 8 mm. de diámetro, brocándose justo hasta la frontera de la lesión necrótica, perforando la resistente banda ósea que la rodea. A través del orificio brocado se introdujo una trefina de 7 mm. profundizándola hasta 2-3 mm. subcondrales. El cilindro necrótico extraído a través de la trefina fue enviado para su estudio histológico y confirmación anatomopatológica del diagnóstico por la imagen.

Seguimientos

Todos los pacientes fueron seguidos durante un periodo de 1 año postoperatorio. Los pacientes fueron evaluados preoperatoriamente y a los 8 días, 3 meses, 6 meses y 1 año postoperatorio. Durante las evaluaciones se realizó una valoración mediante pruebas de imagen – radiografías y/o resonancia magnética -, pruebas de laboratorio y valoración clínica.

Estudios radiológicos

Fueron practicados preoperatoriamente y en cada una de las visitas postoperatorias anteriormente descritas. Consistieron en una radiografía de la cadera afecta en proyección antero-posterior y proyección de perfil.

Estudios de resonancia magnética

Fueron practicados preoperatoriamente y a los 6 meses y 1 año postoperatorio. En este estudio la resonancia magnética (RM) se evaluó mediante la siguiente técnica:

- 1- Equipo 3.0T Siemens con una antena de torso-phased-array y FOV grande que abarca desde las articulaciones sacroilíacas a la sínfisis púbica en plano coronal y desde cresta ilíaca hasta trocánter menor en axial abarcando ambas caderas. Se realizaron secuencias morfológicas en T1SE y STIR en coronal y TSET2 con o sin FATSAT en axial, para detectar posibles alteraciones de señal en medula ósea para valorar uni o

bilateralidad de la ONCF. Detectada la lesión se realizaron imágenes de mayor resolución localizadas con una antena de superficie sobre la cadera afecta con FOV pequeño, en secuencias 'T1SE, DP-FAT-SAT' en coronal, 3D GRE-T2 de alta resolución en sagital y planos radiales sobre cabeza femoral en secuencias DP y DP-FS para valorar mejor el área osteocondral.

- 2- Estudio dinámico con gadolinio (Gd) para valorar el mapa vascular de la cabeza femoral y la viabilidad de la zona necrótica pre y postratamiento. Consiste en un tren de secuencias de alta resolución temporal 3D (cada una de 11 segundos repetidas durante 3 a 5 minutos) que nos permiten obtener un mapa angiográfico y la curva de captación SI/tiempo del área de ONCF. Posteriormente se realizan secuencias en 'T1-FATSAT' post-contraste.

Estudios de laboratorio

Las pruebas de laboratorio practicadas consistieron en análisis hematológicos y bioquímicos. El objetivo fue detectar posibles efectos secundarios del tratamiento. Fueron realizados preoperatoriamente y en todos los controles postoperatorios antes mencionados.

Estudio exploratorio TEP

En 4 caderas, 3 pertenecientes al grupo de estudio y 1 perteneciente al grupo control se realizó un estudio exploratorio mediante TEP con F18 al año de seguimiento, previo consentimiento informado y con el objetivo de recabar información sobre la manera más eficaz para medir la regeneración ósea de cara a plantear en un futuro un ensayo clínico en fase 3.

Estudio anatomopatológico

Se propuso la realización de un estudio anatomopatológico de los cilindros óseos extraídos durante la realización de la DC en todos los pacientes. Así mismo se propuso la realización de un estudio anatomopatológico de las cabezas femorales de aquellos pacientes en los cuales, durante el seguimiento, fuera necesario la colocación de una prótesis total de cadera.

Evaluaciones clínicas

Consistió en una exploración física de la cadera intervenida y en la realización una valoración objetiva mediante test de medición del dolor –EVA- y de función articular – WOMAD -. Fueron realizados preoperatoriamente y en todos los controles postoperatorios antes mencionados.

Esquema de las visitas de seguimiento realizadas

Tratamiento A: Descompresión central asociado a XCEL-MT-OSTEO-ALPHA

- Visita MO (-21 d): Aspirado de MO
- Visita 1 (día 0): Descompresión central asociada e implantación de XCEL-MT-OSTEOALPHA en el día 21 del aspirado de MO.
- Visita 2 (+ 8 días de la implantación, \pm 2 días): Evaluación de seguridad, cuestionario EVA y analítica de control.
- Visita 3 (+ 3 meses de la implantación, \pm 7 días): Evaluación de seguridad, WOMAC, EVA y analítica de control.
- Visita 4 (+ 6 meses de la implantación, \pm 15 días): Evaluación de seguridad, evaluación clínica (RM), WOMAC, EVA y analítica de control.

- Visita 5 (+ 12 meses de la implantación, \pm 21 días): Evaluación de seguridad, evaluación clínica (RM), WOMAC, EVA y analítica de control.

Tratamiento B: Descompresión central aislada

- Visita 1 (día 0): Descompresión central asociada a la implantación de constructo colonizado con células madre en el día 21 del aspirado de MO.
- Visita 2 (+ 8 días de la implantación, \pm 2 días): Evaluación de seguridad, cuestionario EVA y analítica de control.
- Visita 3 (+ 3 meses de la implantación, \pm 7 días): Evaluación de seguridad, WOMAC, EVA y analítica de control.
- Visita 4 (+ 6 meses de la implantación, \pm 15 días): Evaluación de seguridad, evaluación clínica (RM), WOMAC, EVA y analítica de control.
- Visita 5 (+ 12 meses de la implantación, \pm 21 días): Evaluación de seguridad, evaluación clínica (RM, WOMAC, EVA y analítica de control.

Variables principales de valoración

Ángulo necrótico modificado de Kerboul

Variable cuantitativa continua. El ángulo de Kerboul modificado es la suma de los arcos mediosagitales y mediocoronaes de la superficie de la cabeza femoral con evidencia de osteonecrosis mediante resonancia magnética.

Estudio dinámico con gadolinio (Gd)

Variable cualitativa. Valora la captación de contraste en el área de la necrosis como signo de revascularización.

Escala visual analógica (EVA).

Variable cuantitativa discreta. La escala visual analógica es un instrumento que permite cuantificar numéricamente la intensidad de dolor que describe el paciente. Consiste en una línea de 10 centímetros, en la cual el extremo izquierdo significa nada de dolor y el extremo derecho el peor dolor imaginable. Se pide al paciente que marque en la línea el punto que indique la intensidad y se mide con una regla milimetrada. La intensidad se expresa en centímetros o milímetros.

Escala de valoración funcional Western Ontario Mc Master Universities

Index (WOMAC)

Escala que se utiliza para evaluar la limitación funcional en los procesos degenerativos de la cadera y de la rodilla. Se subdivide en 3 subescalas: Dolor, Rigidez y función.

Variables secundarias de valoración

Evaluación de la viabilidad de la técnica propuesta:

Variable cuantitativa continua. Representa el número de pacientes reemplazados en cada grupo de tratamiento

Evaluación de la seguridad

Variable cuantitativa continua. Representa el número de pacientes que han presentado un acontecimientos adverso grave (AAG) relacionado con la medicación del estudio.

Clasificación ARCO

Variable cualitativa. Se basa en la presencia de colapso, la localización de la lesión y su tamaño.

Estudio exploratorio TEP

En 4 caderas, 3 pertenecientes al grupo de estudio y 1 perteneciente al grupo control se realizó un estudio exploratorio mediante TEP con F18 al año de seguimiento, previo consentimiento informado y con el objetivo de recabar

información sobre la manera más eficaz para medir la regeneración ósea de cara a plantear en un futuro un ensayo clínico en fase 3.

Métodos de análisis

En todos los análisis descriptivos, las variables categóricas se resumieron mediante frecuencias y porcentajes de categoría. Para las distribuciones de variables continuas se calculó la media y su Desviación Estándar, la mediana y los percentiles 25 y 75 de la distribución, el número de casos, el valor mínimo y el máximo. Todos los contrastes de hipótesis fueron bilaterales, con un nivel de significación del 5%. El resultado de un contraste de hipótesis comprendió el Intervalo de Confianza del 95% de la(s) variable(s) analizada(s).

Se utilizó la T-Student para la comparación de variables cuantitativas y la prueba de χ^2 para la comparación de las variables categóricas. La prueba T, también se utilizó para datos apareados en los análisis de medida intrasujeto entre el preoperatorio y el postoperatorio.

El análisis de la supervivencia se realizó con el método de Kaplan- Meier. Se consideró como evento final la aparición de colapso radiológico.

Software

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico Statical Package for the Social Sciencies (SPSS), versión 23.

RESULTADOS

Demografía

16 caderas -14 pacientes- con ONCF grado I-II de ARCO fueron incluidos en el estudio. De ellos 8 caderas - 7 pacientes – constituyeron el grupo de estudio y otras 8 caderas – 8 pacientes – constituyeron el grupo control. Dos pacientes participaron en el estudio con una afectación bilateral: Una mujer en las que ambas caderas fueron introducidas en el grupo de estudio y un hombre, en el que una cadera fue introducida en el grupo de estudio y la otra cadera fue introducida en el grupo control. En cuanto a la distribución por sexos 83,33% de los pacientes fueron hombres. (Ilustración 26) La distribución por sexos en ambos grupos fue de 5 hombres y 2 mujeres en el grupo de estudio frente a 8 hombres en el grupo control. (Tabla 4)

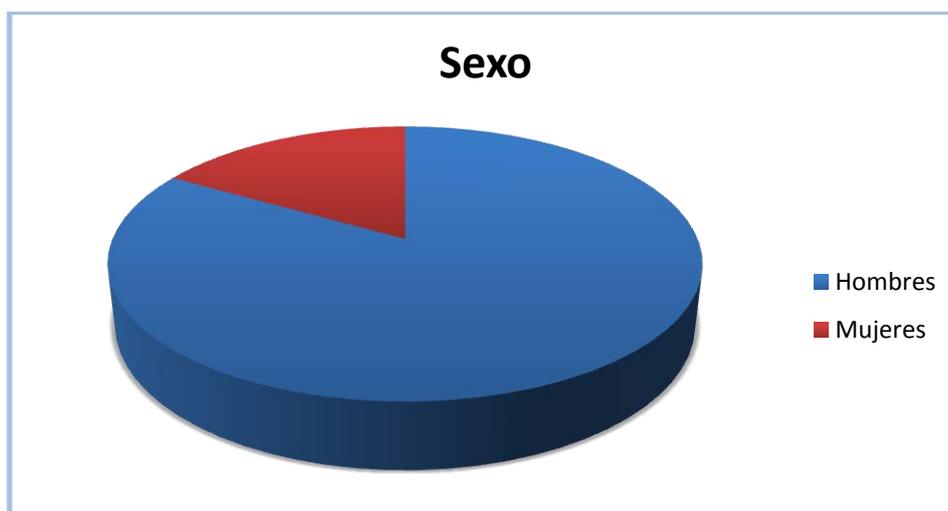


Ilustración 26 Distribución por sexo de los pacientes del estudio.

		Gr. Control	Gr. Estudio	Total
Sexo	Hombre	8	5	13
	Mujer	0	2	2
Total		8	7	15

Tabla 4 Distribución por sexo

No hubo diferencias significativas en la edad media en el momento de la cirugía entre los pacientes del grupo de estudio 38,16 (SD 8,28) años y los pacientes del grupo control 37,25 (SD 8,38) años. (Tabla 5)

Edad	Media	N	D E	Media na	
Gr. Control	37,25	8	8,3780	38,36	P=0,831
Gr. Estudio	38,16	8	8,2794	39,11	P=0,831
Total	37,70	16	8,0601	38,36	

Tabla 5 Edad media por grupos en el momento de la cirugía

En lo relativo al morfotipo de los pacientes del estudio no se observaron diferencias significativas relativas al peso, la talla o el índice de masa corporal entre los dos grupos. (Tabla 6)

		N	Media	DE	
IMC	Gr. Control	8	26,30	3,6943 0	P=0,921
	Gr. Estudio	8	26,57	6,7730 3	
Peso	Gr. Control	8	83,88	17,456	P=0,667
	Gr. Estudio	8	79,00	26,099	
Talla	Gr. Control	8	177,75	8,379	P=0,138
	Gr. Estudio	8	170,88	9,078	

Tabla 6 Distribución de peso, talla e IMC por grupos

Clasificación

Todas las caderas presentaron un estadio radiológico precolapso. Dos pacientes en el grupo control y 1 paciente del grupo de estudio fueron clasificados como estadio I de la clasificación de ARCO, mientras que los otros 6 pacientes del grupo control y los otros 7 pacientes del grupo de estudio fueron clasificados como estadio II de la clasificación de ARCO.

Atendiendo a la localización de la lesión, 1 paciente perteneciente al grupo control fue clasificado como tipo IA de la clasificación de ARCO, es decir de localización medial. 5 pacientes fueron clasificados como tipo IIB de la clasificación de ARCO, es decir de localización central. De ellos 3 pacientes pertenecían al grupo control y 2 pacientes pertenecían al grupo de estudio. Finalmente 7 pacientes fueron clasificados como tipo C de la clasificación de ARCO, es decir de localización lateral. De ellos 2 pacientes pertenecían al grupo control y 4 pacientes pertenecían al grupo de estudio. (Tabla 7)

		Gr. Control	Gr. Estudio
Clasificación ARCO	IA	2	0
	IC	0	1
	IIB	3	3
	IIC	3	4

Tabla 7 Clasificación ARCO preoperatoria por grupos

En relación al tamaño de la lesión, 7 pacientes fueron clasificados como grado 1 al presentar un ángulo de Kerboul post administración de contraste de menos de 200°. De ellos 4 pacientes pertenecieron al grupo control y 3 pacientes al grupo de estudio. Cuatro pacientes fueron clasificados como grado 2 al presentar un ángulo de Kerboul entre 200° y 249°. Los 4 pacientes pertenecieron al grupo de estudio. Un Paciente fue clasificado como grado 3 al presentar un ángulo de Kerboul entre 250° y 299°. El paciente perteneció al grupo control. Finalmente un paciente del grupo control fue clasificado como grado 4 al presentar un ángulo de Kerboul superior a 300°. (Tabla 8)

		Gr. Control	Gr. Estudio
Ángulo de Kerboul (post-contraste)	Grado 1 < 200°	4	3
	Grado 2 200-249°	0	4
	Grado 3 250-299°	1	0
	Grado 4 300°	1	0

Tabla 8 Tamaño de la lesión preoperatoria. Ángulo de Kerboul

Causas

La etiología de la ONCF en los pacientes del estudio fue mayoritariamente idiopática aunque alguno de los pacientes etiquetados como idiopáticos reconocieron un consumo moderado de alcohol. Dos pacientes, uno en cada grupo, pudieron ser relacionados con un uso elevado de corticoides para el tratamiento de su enfermedad de base. Se trató de un paciente en tratamiento de una granulomatosis de Wegener y de una paciente en tratamiento de una púrpura idiopática. Por último 1 paciente perteneciente al grupo de estudio pudo ser relacionado con un consumo elevado de alcohol. (Ilustración 27)

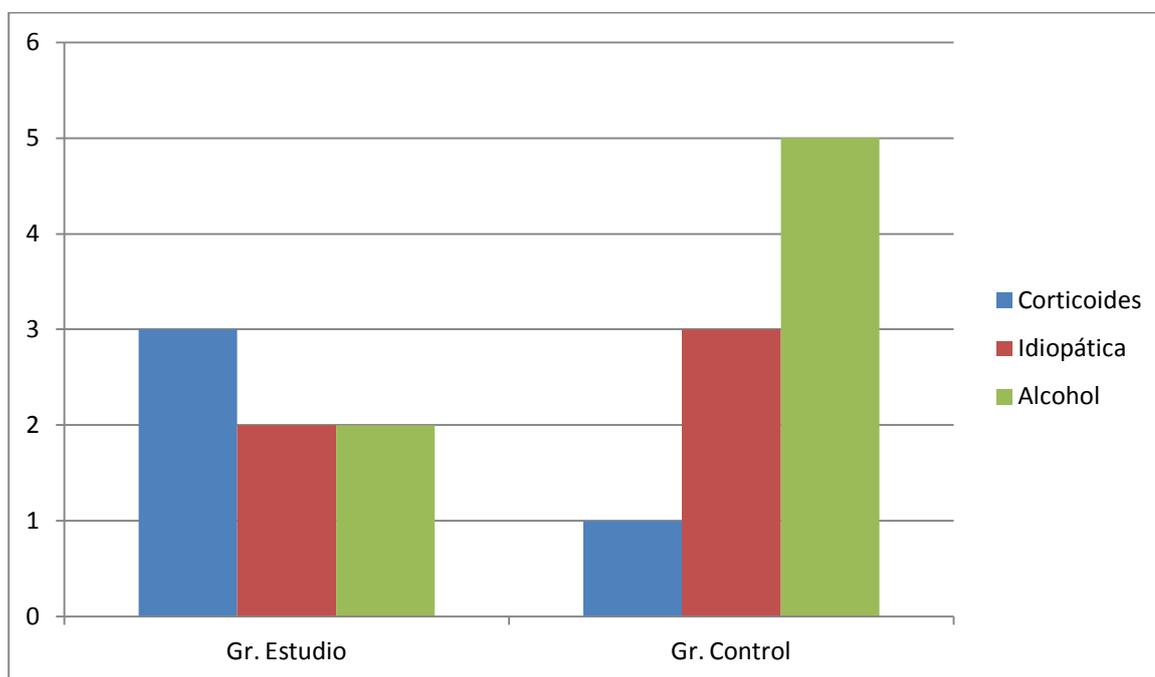


Ilustración 27 Etiología de la ONCF según grupos.

Situación clínica preoperatoria

Preoperatoriamente los pacientes de ambos grupos no presentaban diferencias significativas relativas. Antes del tratamiento 1 paciente de cada grupo no presentaba dolor en la cadera. La puntuación media del dolor medido en la escala EVA fue de 1,81 (de 1,84) en el grupo de estudio frente a 3,71 (de 2,16) en el grupo control (P=0,079). (Tabla 9)

		N	Media	DE	
EVA	Grupo Control	8	3,7125	2,16230	P=0,079
	Grupo Estudio	8	1,8125	1,84115	

Tabla 9 Escala Visual Analógica preoperatoria.

Tampoco hubo diferencias significativas en la escala de Womac. La escala del dolor del cuestionario Womac mostró una puntuación de 7,87 (de 5,14) en el grupo de estudio frente a 7,13 (de 4,36) en el grupo control (P=0,758). La escala de rigidez mostró una puntuación de 2,25 (de 2,05) en el grupo de estudio frente a 3,12 (de 2,23) en el grupo control (P=0,428). Por último la escala de la función mostró una puntuación de 26,12 (de 20,47) en el grupo de estudio frente a 22,88 (de 12,65) en el grupo control (P=0,708) (Tabla 10).

WOMAC		N	Media	DE	
DOLOR	Grupo Control	8	7,1250	4,35685	P=0,758
	Grupo Estudio	8	7,8750	5,13914	
RIGIDEZ	Grupo Control	8	3,1250	2,23207	P=0,428
	Grupo Estudio	8	2,2500	2,05287	
FUNCION	Grupo Control	8	22,8750	12,65405	P=0,708
	Grupo Estudio	8	26,1250	20,46905	

Tabla 10 Escala WOMAC preoperatoria.

Extracción Médula ósea

El volumen de médula ósea extraída de la cresta ilíaca posterior fue de media 129,98 cc. (117,1 – 150,9). (Tabla 11)

	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
Vol. (mL)	8	117,1	150,9	129,975	12,1935

Tabla 11 Volumen médula ósea

El número de elementos mononucleares (CN) por cc. de médula ósea osciló entre 165×10^5 y 523×10^5 con una media de 31.737.500 elementos mononucleares por cc. El porcentaje de viabilidad osciló entre el 80% y el 94% con una media del 87,86%. (Tabla 12)

	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
Celularidad (CN/mL)	8	165×10^5	523×10^5	317×10^5	11209936,600
Viabilidad (%)	8	80%	94%	87,86%	0,05736

Tabla 12 Celularidad y Viabilidad

Producto implantado

Finalmente el constructo implantado compuesto de hueso esponjoso liofilizado embebido en células madre mesenquimales presentó una concentración celular entre 76×10^4 y 95×10^4 por cc. con una media de 86×10^4 CN/cc. (Tabla 13)

	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
Concentración Celular (CN/cc)	8	76×10^4	95×10^4	86×10^4	68033,605

Tabla 13 Celularidad producto implantado.

Resultados clínicos

Supervivencia.

Un paciente perteneciente al grupo de estudio se perdió durante el seguimiento, por lo que finalmente para el análisis se pudo contar con 7 caderas en el grupo de estudio y 8 caderas en el grupo control.

Dos pacientes pertenecientes al grupo de estudio y 2 pacientes pertenecientes al grupo control presentaron un colapso de la superficie de la cabeza femoral, con aparición de dolor severo e incapacidad funcional. En el grupo de estudio se trató de 1 paciente cuyo estadio inicial fue IC con un ángulo de Kerboul entre 200° y 249° y otro paciente cuyo estadio inicial fue IIC con un ángulo de Kerboul < de 200°, mientras que en el grupo control se trató de 1 paciente en estadio inicial IIB con un ángulo de Kerboul entre 200° y 249° y otro en estadio inicial IIC con un ángulo de Kerboul > 300°.

Agrupados por estadios radiológicos, 1 colapso se produjo en un paciente en estadio I (1 de 3), perteneciente al grupo de estudio y los otros 3 colapsos se produjeron en pacientes estadio II (3 de 13), 1 perteneciente al grupo de estudio y los otros 2 pertenecientes al grupo control.

Según la localización de la lesión, 1 colapso se produjo en una lesión tipo B o central (1 de 5), perteneciente al grupo control y las otras 3 se produjeron en una

lesión tipo C o lateral (3 de 9), 2 pertenecientes al grupo de estudio y 1 perteneciente al grupo control. (Tabla 14 y Tabla 15)

GR.		COLAPSO	NO COLAPSO
ARCO I	SUBTIPO A	0	2
	SUBTIPO B	0	0
	SUBTIPO C	0	0
ARCO II	SUBTIPO A	0	0
	SUBTIPO B	1	2
	SUBTIPO C	1	2

Tabla 14 Clasificación ARCO según colapso en grupo control

GR.		COLAPSO	NO COLAPSO
ESTUDIO			
ARCO I	SUBTIPO A	0	0
	SUBTIPO B	0	0
	SUBTIPO C	1	0
ARCO II	SUBTIPO A	0	0
	SUBTIPO B	0	3
	SUBTIPO C	1	2

Tabla 15 Clasificación ARCO según colapso en grupo estudio

No hubo diferencias significativas en la función de supervivencia entre el grupo de estudio y el grupo control. Considerando como evento final el colapso radiológico de la superficie de la cabeza femoral, el tiempo medio de supervivencia en el grupo de estudio fue de 324,25 días (IC al 95% 243,20 a 405,30), mientras que en el grupo control fue de 347,43 días (IC al 95% 280,88 a 413,98). (Ilustración 28)

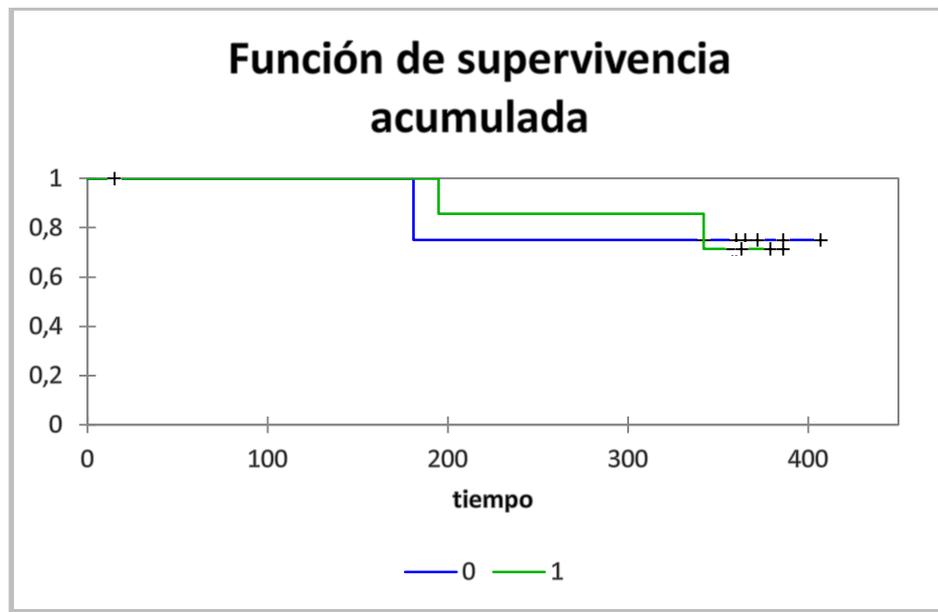


Ilustración 28 Supervivencia comparativa entre el grupo de estudio y el grupo control al año de seguimiento. (Grupo Control :Línea azul -0- ; Grupo Estudio : Línea Verde -1-)

Escala dolor EVA

No hubo diferencias significativas en la valoración del dolor postoperatorio en la escala visual analógica entre el grupo de estudio y el grupo control en el postoperatorio inmediato y a los 3, 6 y 12 meses postoperatorios. (Tabla 16)

	Grupo Estudio	Grupo Control	p
Postoperatorio	2,21 (de 2,160)	2,01(de 2,073)	0,853
3 meses	1,59 (de 1,805)	2,14 (de 2,117)	0,599
6 meses	4,21 (de 3,525)	3,22(de 2,890)	0,592
12 meses	2,95 (de 3,733)	3,05 (de 2,315)	0,959

Tabla 16 Escala dolor EVA. Comparativa postoperatoria entre el grupo de estudio y el grupo control.

El estudio intrasujeto de la evolución del dolor valorado mediante la escala EVA mostró que la intervención quirúrgica no produjo un cambio significativo del dolor en el postoperatorio inmediato ni a los 3, 6 y 12 meses postoperatorios en ninguno de los 2 grupos estudiados. (Ilustración 29)

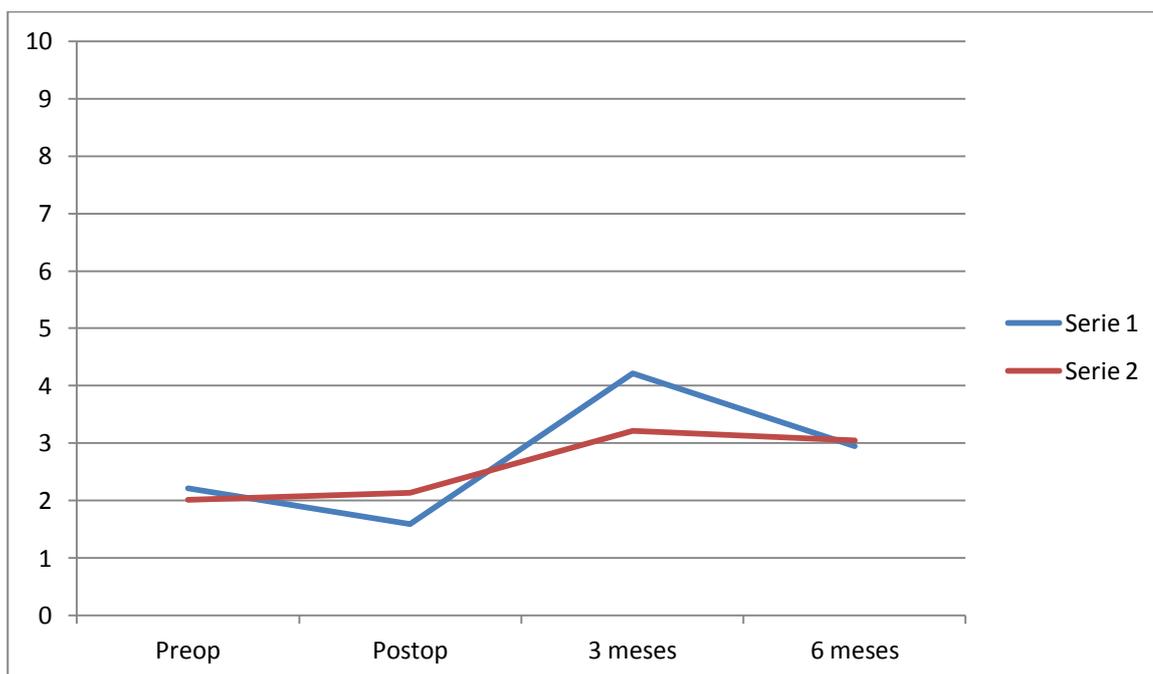


Ilustración 29 Evolución EVA intrasujeto

Escala WOMAC

No hubo diferencias significativas en la escala WOMAC respecto a las subescalas de dolor, rigidez y función entre los 2 grupos estudiados en el postoperatorio ni a los 3,6 y 12 meses (Tabla 17, Tabla 18 y Tabla 19).

Dolor	Grupo Estudio	Grupo Control	p
3 meses	6,14 (de 2,116)	6,14 (de 2,193)	1
6 meses	6,86 (de 4,180)	10,33 (de 5,854)	0,238
12 meses	8 (de 2,944)	9,50 (de 7,007)	0,655

Tabla 17 WOMAC. Subescala Dolor

Rigidez	Grupo Estudio	Grupo Control	p
3 meses	2 (de 1,915)	1,43 (de 0,976)	0,495
6 meses	1,29 (de 0,951)	2,50 (de 1,049)	0,051
12 meses	1,75 (de 0,957)	4 (de 2,530)	0,133

Tabla 18 WOMAC. Subescala Rigidez

Función	Grupo Estudio	Grupo Control	p
3 meses	21,67 (de 8,382)	21,86 (de 10,172)	0,972
6 meses	24,67 (de 11,057)	27,60 (de 15,437)	0,454
12 meses	21 (de 9,309)	35 (21,817)	0,205

Tabla 19 WOMAC. Subescala Función.

El análisis intrasujeto de la escala WOMAC no mostró cambios significativos del dolor la rigidez y la función después de la cirugía en ninguno de los 2 grupos, aunque se observó una tendencia a la estabilidad del dolor y mejoría de la rigidez y la función en el grupo de estudio y una tendencia al empeoramiento del dolor, de la rigidez y de la función en el grupo control a partir de los 3 meses de seguimiento.

(Ilustración 30, Ilustración 31 e Ilustración 32)

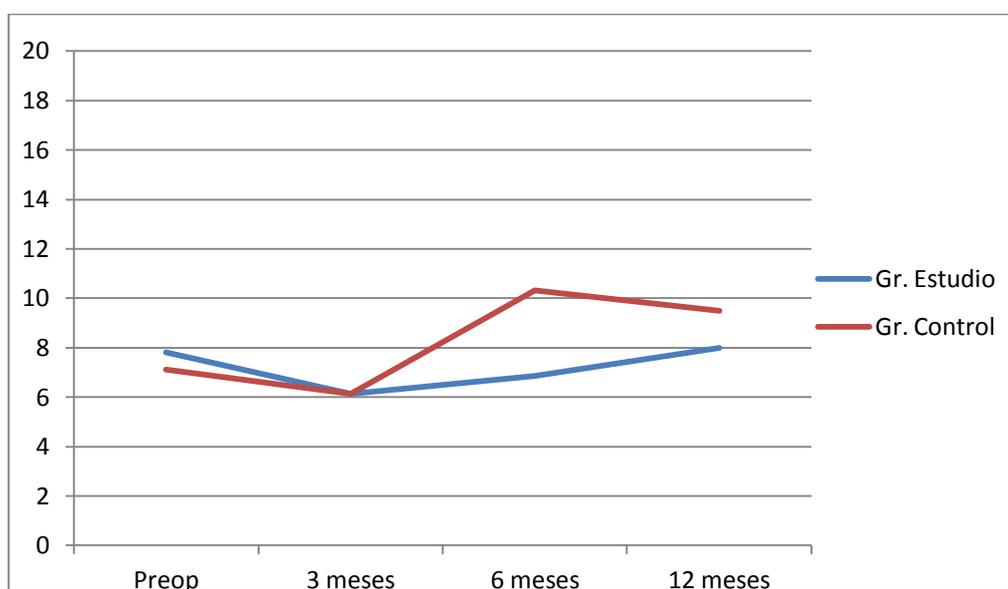


Ilustración 30 Evolución escala dolor WOMAC intrasujeto.

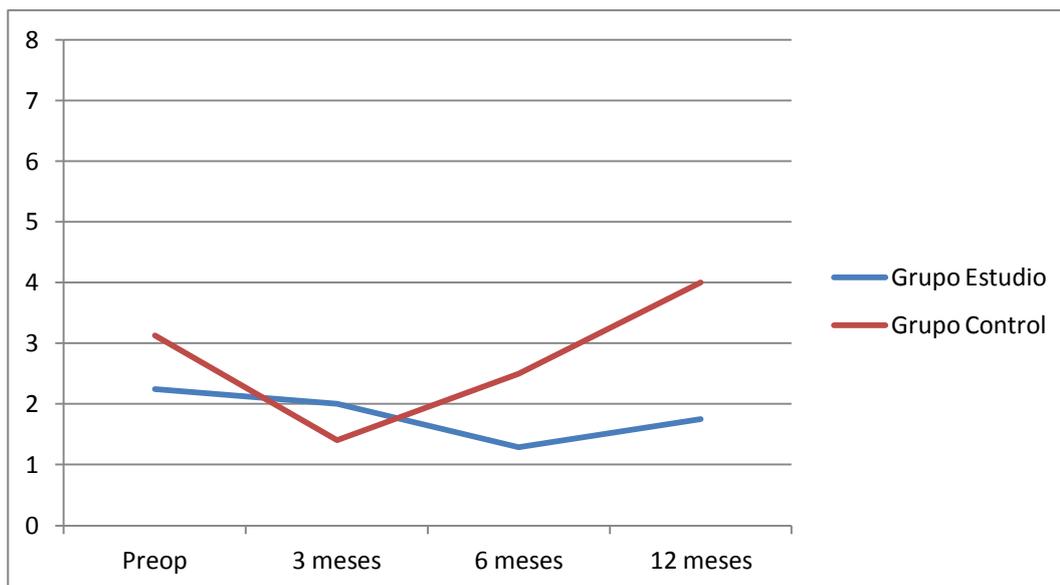


Ilustración 31 Evolución escala Rigidez WOMAC intrasujeto.

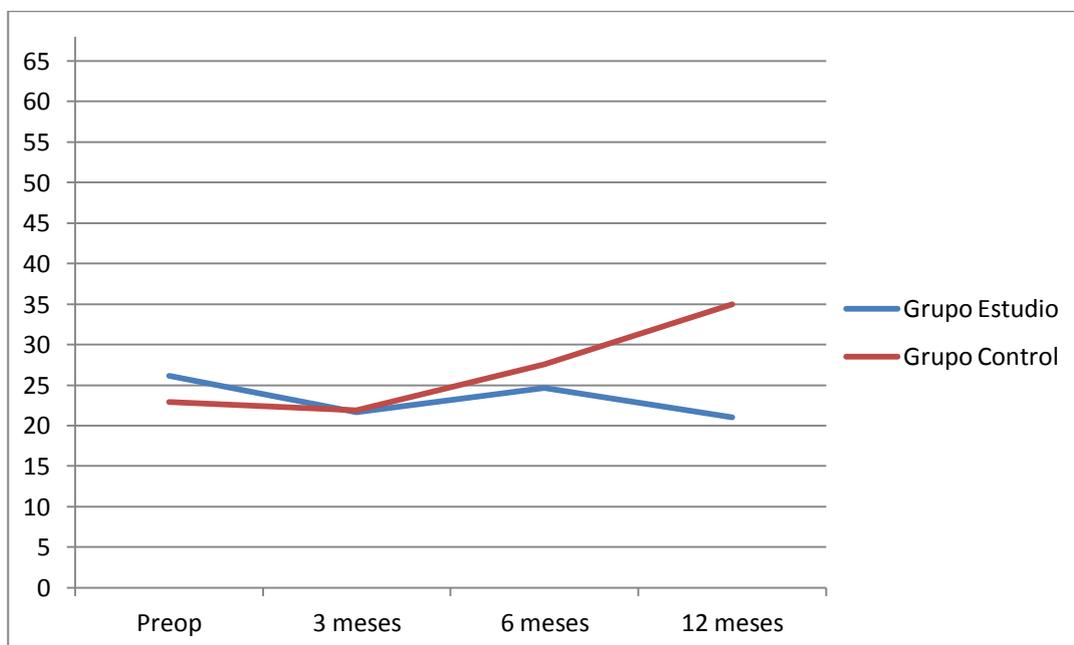


Ilustración 32 Evolución escala Función WOMAC intrasujeto.

Resultados radiológicos y Resonancia magnética dinámica

Cuatro de los 6 pacientes del grupo de estudio, que no habían presentado colapso en el preoperatorio, mostraron en la RM dinámica un aumento del contraste en la zona necrótica de la cabeza femoral lo que fue interpretado como signos de revascularización. La RM de 3 de éstos pacientes presentó una captación parcial de contraste. El paciente restante presentó una captación parcial de contraste a los 6 meses y una captación difusa de contraste a los 12 meses postoperatorio.

En el grupo control solo 2 de los 6 pacientes que no habían presentado colapso en el preoperatorio mostraron un aumento de contraste al año de seguimiento. En los 2 casos se pasó de una situación de no captación de contraste a una situación de captación parcial de contraste. (Tabla 20)

		No captación	Captación Parcial	Captación difusa
Gr. Estudio	Preoperatorio	8	0	0
	12 meses postop	1	3	1
Gr. Control	Preoperatorio	8	0	0
	12 meses postop	4	2	0

Tabla 20 Captación contraste en la resonancia magnética

Solo 1 paciente, perteneciente al grupo de estudio, presentó una disminución clara del área de necrosis con una mejoría del ángulo de Kerboul que pasó de grado 2 a grado 1.

(Ilustración 33)

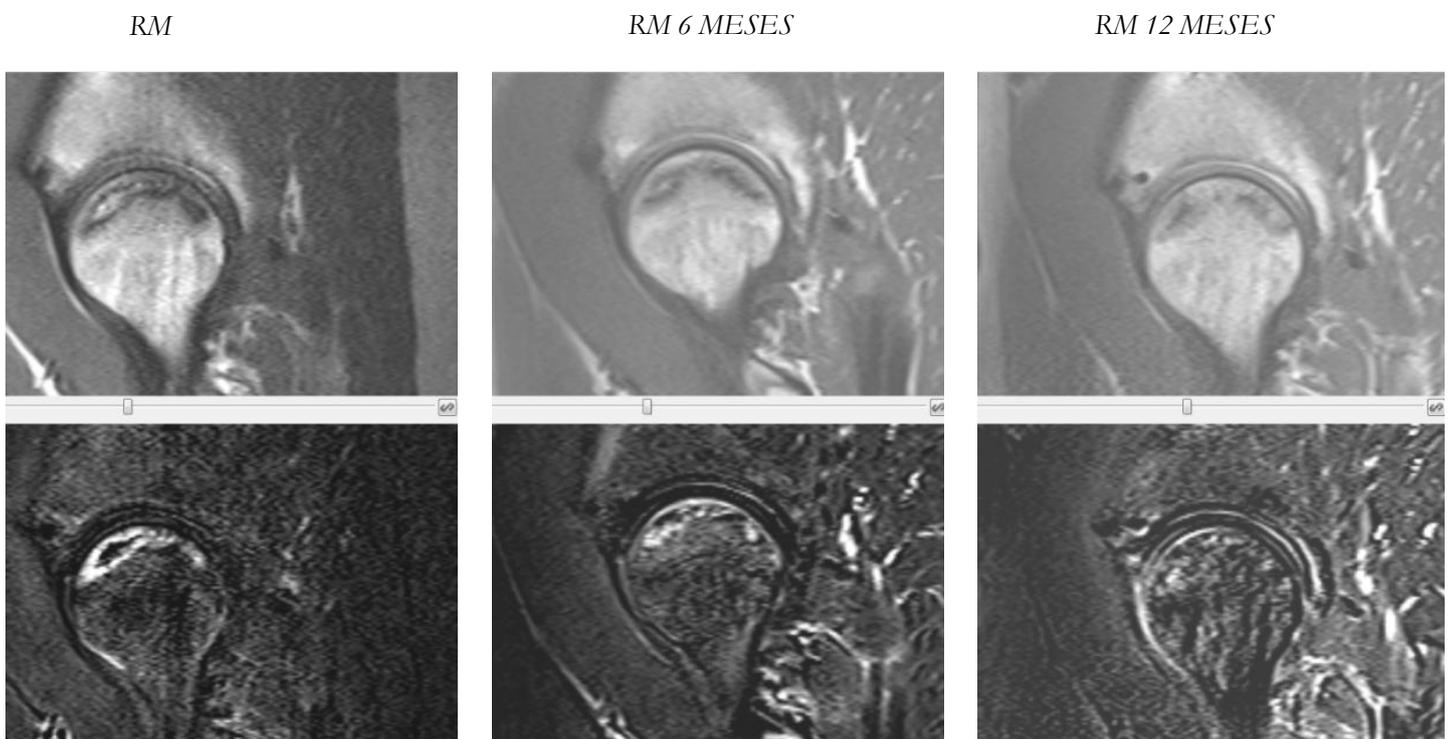


Ilustración 33 Secuencia de imágenes sagitales de RM en T1 (Arriba) y con substracción (abajo). Se puede observar los controles evolutivos del paciente n°6. Se produce un aumento progresivo del área de captación de contraste pasando de una situación de "no captación" – preop – a una "captación parcial" – 6 meses – y finalmente a una captación difusa – 12 meses –, y una disminución del área de necrosis.

Resultados del PET-TC F18

Los resultados del PET-TC con F18 practicados de forma exploratoria a 4 caderas del estudio mostraron en las 3 caderas pertenecientes al grupo de estudio una intensa actividad metabólica en el área de la osteonecrosis que señala actividad osteoblástica y una actividad más reducida alrededor del túnel de la DC. Por el contrario la cadera perteneciente al grupo control mostró una actividad metabólica que se distribuía solo alrededor del túnel de la DC y de manera puntiforme a nivel de la lesión necrótica. (Ilustración 34, Ilustración 35 e Ilustración 36)



Ilustración 34 TEP-TC F18 correspondiente a el paciente n°6. Osteonecrosis bilateral de cadera. Ambas caderas pertenecientes al grupo de estudio. Se observa una captación homogénea en ambas cabezas femorales.

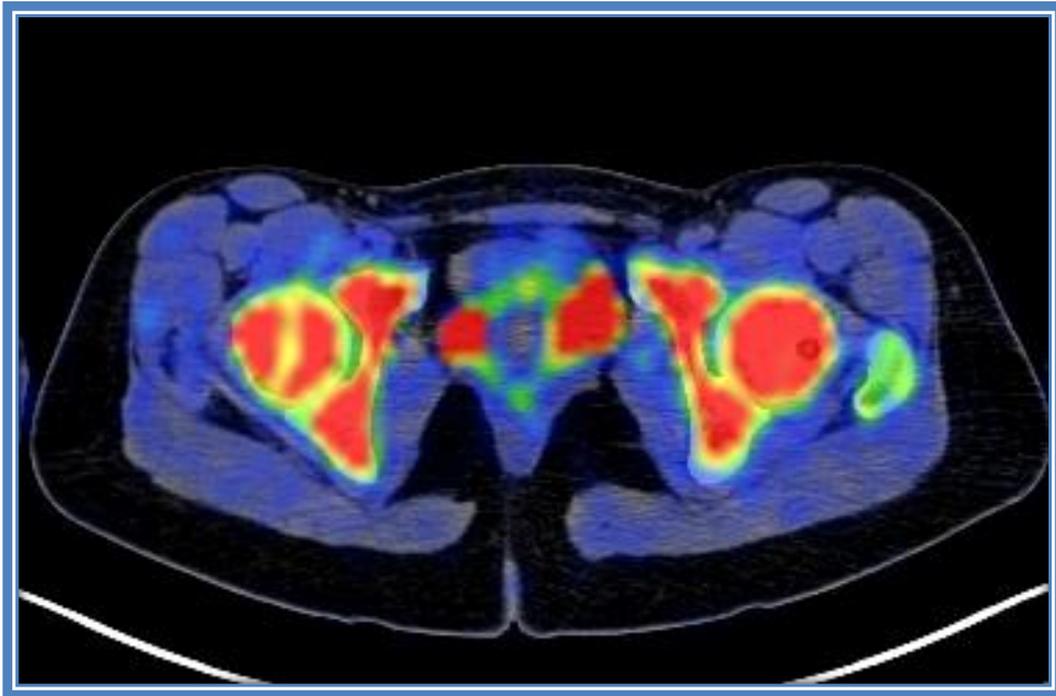


Ilustración 35 PET-TC-F18. Imagen del paciente con afectación bilateral. Captación homogénea bilateral.

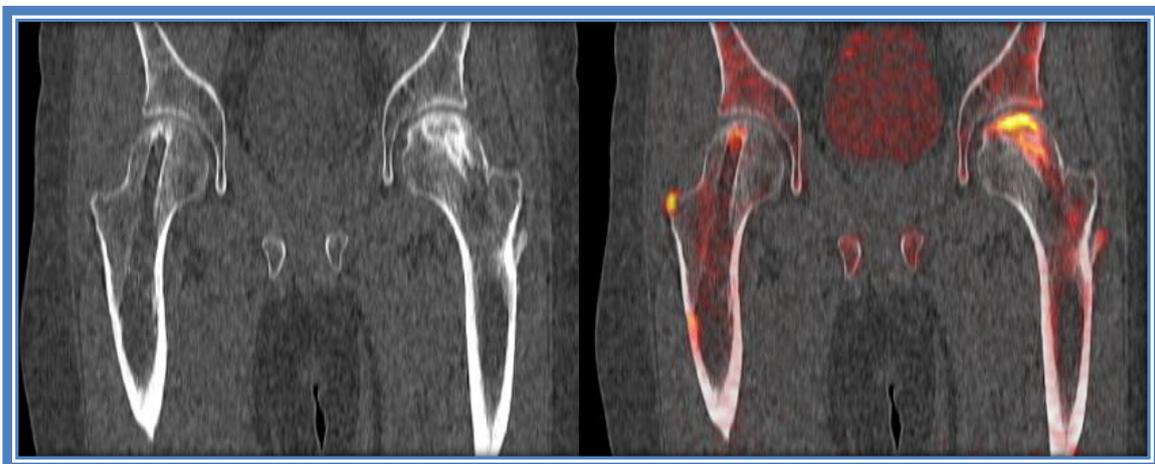


Ilustración 36 Imagen de TEP en Osteonecrosis bilateral de cadera. Se puede observar en color amarillo las zonas de hipercaptación de F18 que coincide con la zona de necrosis en el lado izquierdo. En esta zona de hipercaptación se está produciendo una intensa actividad metabólica.

Anatomía patológica

La anatomía patológica de los cilindros óseos extraídos de la cabeza femoral al realizar la DC confirmó, en todos los casos, la presencia de osteonecrosis.

La anatomía patológica de la cabeza femoral del paciente perteneciente al grupo de estudio al cual le fue colocada una prótesis total de cadera, debido a la presencia de colapso de la superficie articular, mostró múltiples focos de formación de hueso sobre trabéculas osteonecróticas. La anatomía patológica de la cabeza femoral perteneciente a los 2 pacientes del grupo control no presentó focos de formación ósea. (Ilustración 37, Ilustración 38 e Ilustración 39)

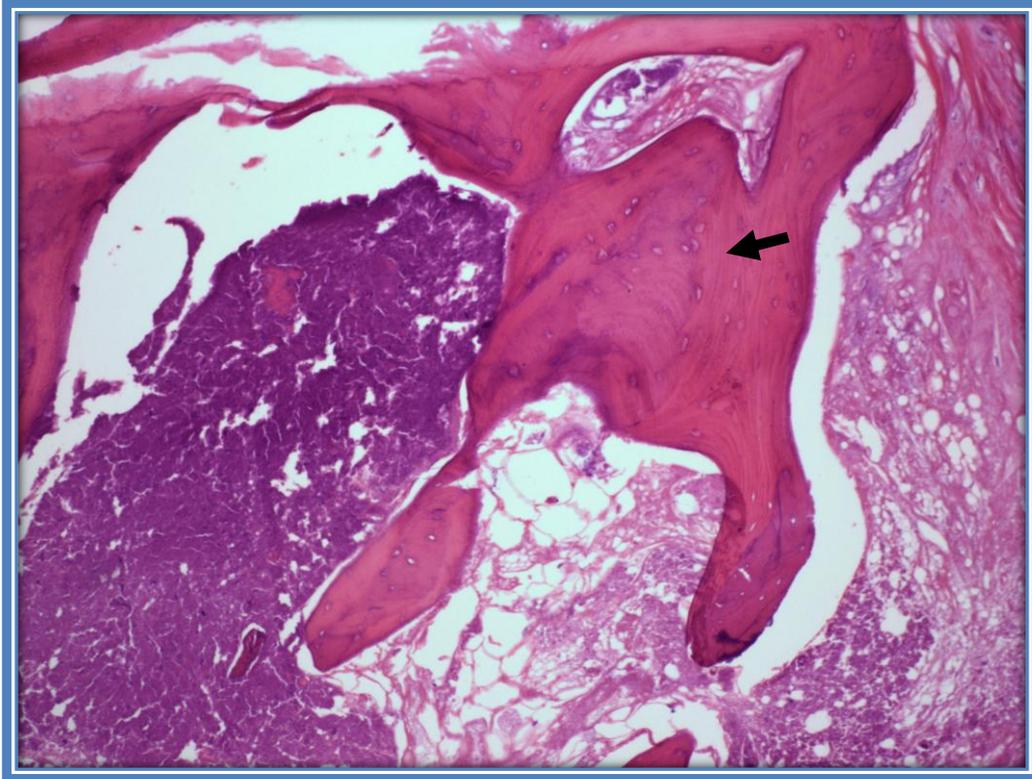


Ilustración 37 Biopsia cabeza femoral. Se puede observar osteoide necrótico en distintos estadios evolutivos – Osteoide Inmaduro -. Indicativo de neoformación ósea que posteriormente se ha necrosado. Ausencia de células nucleadas.

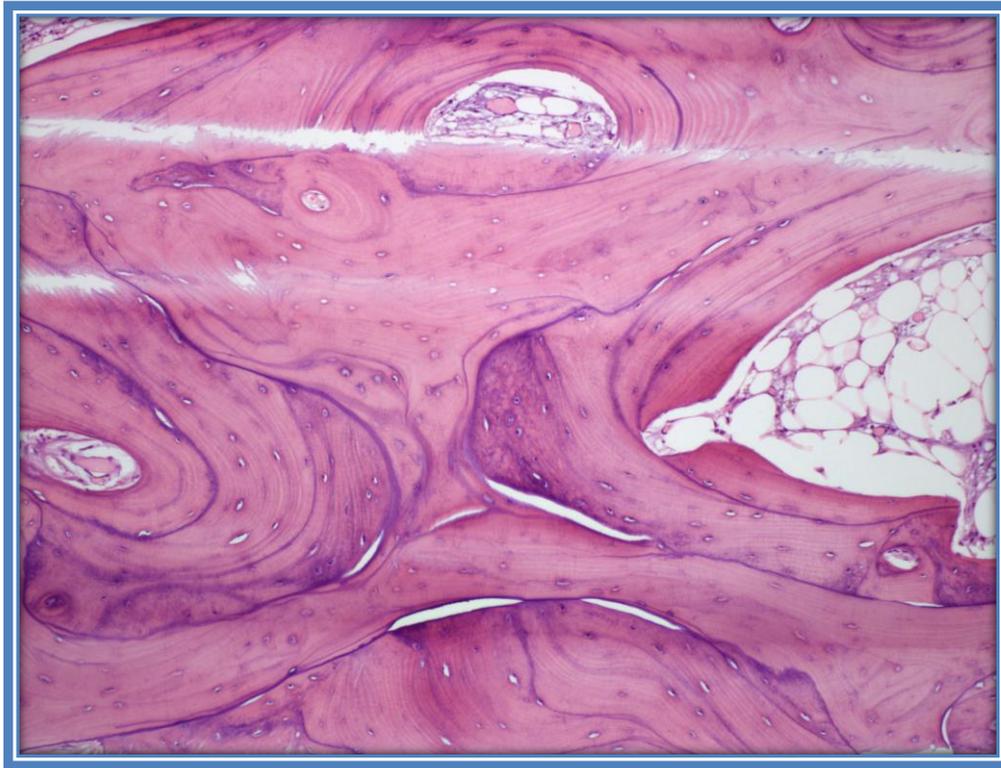


Ilustración 38 Biopsia cabeza femoral. Se pueden observar áreas de osteoide necrótico – lagunas sin núcleo -, alternando con áreas de regeneración ósea – osteoblastos con núcleo -

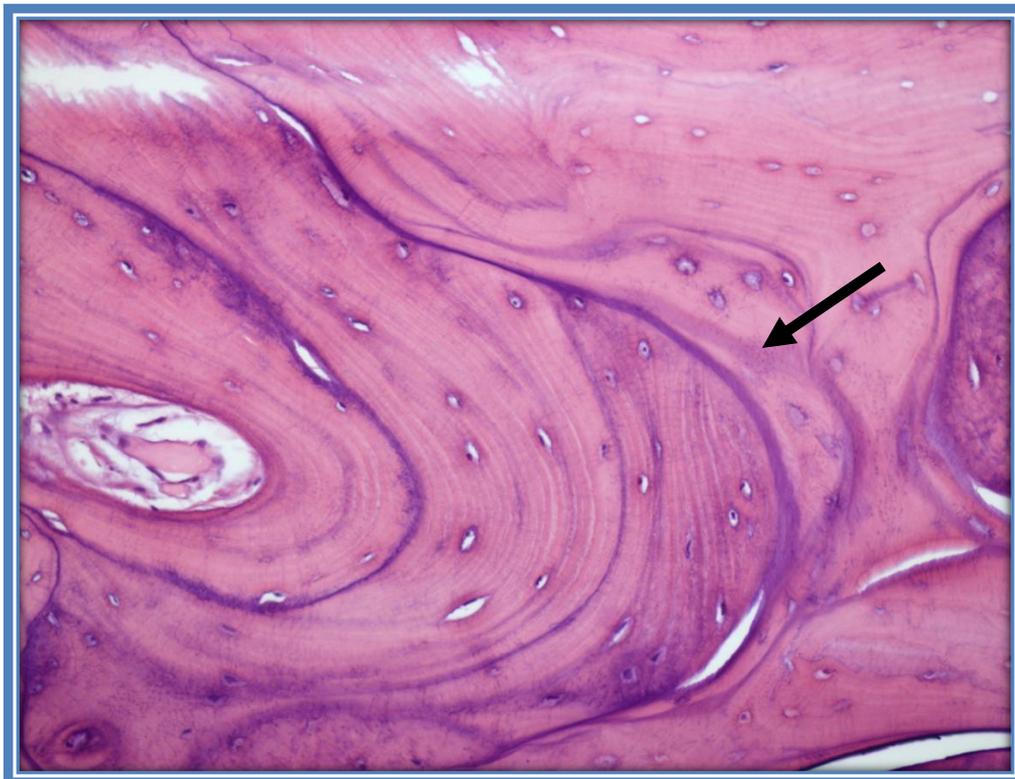


Ilustración 39 Biopsia cabeza femoral. Visto a mayor aumento las zonas de regeneración ósea. Observen la diferencia de tonalidad del osteoide y la presencia de núcleos en las lagunas.

Reacciones Adversas.

No se presentaron reacciones adversas relacionadas con la técnica quirúrgica ni con el producto en estudio en ninguno de los 2 grupos durante el seguimiento. Un paciente perteneciente al grupo de estudio presentó un derrame articular tras un traumatismo banal a los 12 meses poscirugía que requirió punción evacuadora, con resolución subsiguiente. La paciente no presentaba colapso de la cabeza femoral al final del seguimiento.

La tasa de reposición de los pacientes fue 0 por lo que el procedimiento puede considerarse viable.

DISCUSIÓN

Fundamentos de la terapia celular en la ONCF

La utilización de las terapias de base celular en la ONCF se basa en el conocimiento existente sobre la etiopatogenia de la enfermedad y en los resultados de algunos estudios que señalan una disminución de los mecanismos reparativos locales en los pacientes que desarrollan una ONCF. Aunque la ONCF es una enfermedad de etiopatogenia no bien conocida, se puede afirmar que en última instancia se produce la interrupción del flujo sanguíneo a un segmento de la cabeza del fémur, provocando la muerte de sus elementos celulares (32). A la aparición de la necrosis le sigue un proceso de reparación que consiste en el desarrollo de una neovascularización desde los tejidos sanos vecinos a la lesión, en la resorción del hueso necrótico por los osteoclastos y en la formación de hueso nuevo por los osteoblastos. En algunas ocasiones este proceso de reparación falla, la integridad de la masa ósea se altera y se produce una estructura mineral débil, que tiende a colapsarse ante la presencia de cargas (2). Se ha demostrado que en los pacientes afectados de ONCF secundaria a la administración de corticoides o el abuso de alcohol existe una disminución del número y una alteración de la función de las Células progenitoras endoteliales y de unidades formadoras de colonias en la esponjosa de la cabeza medular (152,153,160–162).

Las células madre se definen como células con la capacidad de dividirse indefinidamente durante la vida de un individuo y por lo tanto de autorenovarse. Si se dan las condiciones necesarias pueden diferenciarse en otras células con diferentes características y funciones (163). Las CMM pueden aislarse de distintos

tejidos adultos incluyendo la grasa, la médula ósea, la pulpa dental y el músculo (164–166). Las CMM tienen la habilidad de diferenciarse en distintos tipos de células tales como adipocitos, osteocitos y condrocitos dependiendo de la matriz extracelular que las envuelva y de distintos factores de crecimiento (167–169). Su atractivo radica en su facilidad de obtención, su elevada plasticidad y su capacidad para promover el crecimiento celular, la diferenciación celular, la reparación tisular y la regulación de los mecanismos inmunológicos (131,170–172). Además son muy seguras y no tienen tendencia a la formación de teratomas (173).

Fuente para la obtención de CMM

La médula ósea es la fuente más habitual de obtención de CMM y por lo tanto sobre la que hay mayor experiencia. Una de las limitaciones de la médula ósea como fuente de CMM es que requiere de medios invasivos para la obtención de las células lo que podría producir complicaciones como el sangrado o dolor. Por otro lado la cantidad y la calidad de las CMM obtenidas es variable disminuyendo con la edad de los pacientes. Además se ha identificado la existencia de un mecanismo de adipogénesis, y por lo tanto disminución del número de células progenitoras de la médula ósea relacionado con el alcoholismo y el uso prolongado de corticoides, siendo ambos factores muy prevalentes en los pacientes afectos de ONCF (173). Por este motivo en los últimos años se han promovido fuentes alternativas para la obtención de CMM, siendo la grasa periférica una alternativa atractiva dada su fácil accesibilidad y abundancia. Algunos autores han apuntado que el número de CMM obtenidos de la grasa periférica sería hasta 100 veces superior al número de CMM obtenidas de la médula ósea (167,174). En nuestro estudio decidimos utilizar un aspirado de médula ósea para la obtención de las CMM debido a la existencia de experiencia previa del equipo investigador en este tipo de procedimientos y a la posibilidad de multiplicar en el laboratorio el número de CMM obtenidas con lo que aseguramos un producto de una alta calidad biológica. Las CMM fueron obtenidas de la médula ósea de la cresta ilíaca posterior, mediante aspiración, cultivadas en un laboratorio durante 3 semanas y colonizadas en hueso esponjoso liofilizados para conseguir un producto con un número de CMM elevado y

conocido. El producto implantado, 5 cc. de hueso esponjoso liofilizado tenía adheridas una media de $4,4 \times 10^6$ CMM lo que garantizó un producto con un número muy elevado de células progenitoras.

Una de los problemas que podemos encontrar con la terapia con CMM es conocer si éstas son capaces de sobrevivir, formar colonias y multiplicarse en un ambiente de isquemia severa como es el de la ONCF. Estudios preclínicos han demostrado que las CMM son capaces de sobrevivir, multiplicarse y diferenciarse en osteoblastos en la ONCF (16,144,145). Hernigou y col. en el año 2002 demostraron mediante la utilización de un marcaje radioactivo en 2 pacientes con ONCF que, aunque algunos elementos celulares podrían morir, la mayoría de las CMM permanecían activas en el lugar de la lesión (12). No obstante los mecanismos que regulan la supervivencia, migración y diferenciación de éstas células en un ambiente patológico como el de la ONCF todavía no es del todo conocido y debe ser investigado (173).

Concentración o cultivo de las CMM

La mayoría de los trabajos publicados sobre el tratamiento de la ONCF con CMM utilizan células obtenidas mediante aspiración de la médula ósea y concentración in situ mediante centrifugación para separar las CMM del plasma y las células sanguíneas. Hay que considerar que las CMM representan solo el 0,001% de todas las células mononucleares de la médula ósea. Dado que el éxito de estos procedimientos dependen del número de células progenitoras disponibles se hace necesario recurrir a algún método para aumentar su número (12). Algunos estudios han demostrado que el uso del concentrado de las células mesenquimales es superior al uso del aspirado de médula sin concentrar en la ONCF. No obstante, el número y la calidad de las células mesenquimales aspiradas desde la médula ósea depende de la edad, el sexo o la presencia de patologías concomitantes como puede ser el uso de corticoides o el abuso del alcohol. Una de las limitaciones en su utilización se deriva del desconocimiento a priori de la cantidad y calidad de las células presentes en el concentrado ya que su recuento se hace en el laboratorio una vez el paciente ha sido intervenido. Por otro lado no existe evidencia sobre la cantidad mínima requerida de células mesenquimales en el tratamiento de la ONCF. Hernigou y col. estimaron en un estudio con resonancia magnética en pacientes con ONCF tratados con un concentrado de CMM que el producto implantado contenía 4.900 CMM/cc. y que eran capaces de producir una regeneración tisular en un área de 7 cm³ de la cabeza femoral en 1 año (12). Existen diferentes métodos para medir el número de CMM en un preparado: Número total

de células mononucleares, número de células con el fenotipo CD34+, número de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UFC-F), y número de células madre mesenquimales (NCMM). Los 3 primeros son una estimación indirecta del número de CMM que no permiten conocer el número exacto de las mismas. El Número total de células mononucleares es una medida de todas las células mononucleares incluyendo las CMM. CD 34+ es un marcador de células precursoras hematopoyéticas. UFC-F es una medida del número de CMM porque cada UFC-F proviene de una expansión clonal de una CMM. Las medidas indirectas del número de CMM son el método utilizado en la mayoría de los estudios que utilizan CMM obtenidas mediante centrifugación in situ. Gangji y col. en un estudio controlado no randomizado comparando la DC con la DC asociada a un concentrado de CMM reportaron un Número total de células mononucleares de 19×10^8 , un número de CD34+ de $1,9 \times 10^7$, y un número de UFC-F de $1,76 \times 10^4$ (13). Sen y col. en un estudio similar controlado y randomizado comparando DC con DC asociada a un concentrado de CMM reportaron un número total de células mononucleares de 5×10^8 y un número de CD34+ de 5×10^7 (149). Wang y col. por su parte en un publicación de una serie de 50 casos, reportaron un número total de células mononucleares de $15,5 \times 10^8$ (175). Hernigou y col. publicaron un número de $2,4 \times 10^4$ UFC-F(146). En nuestro estudio el número total de células mononucleares en el aspirado de médula ósea fue de $31,7 \times 10^7$, lo que da cuenta de la variabilidad en la calidad del producto obtenido. (Tabla 21)

	Número Cel. mononucleares	CD 34+	UFC-F
Hernigou y col.			24×10^4
Wang y col.	$15,5 \times 10^8$		
Gangji y col.	19×10^8	$1,9 \times 10^7$	$1,76 \times 10^4$
Sen y col.	5×10^8	5×10^7	
Hernández y col.	$31,7 \times 10^7$		

Tabla 21 Cuantificación indirecta número de células mesenquimales en aspirado de médula ósea

Otro de los inconvenientes de los estudios que utilizan concentrado de CMM es que la medición del número de elementos celulares y por lo tanto de la calidad del producto implantado no es conocida hasta después de intervenir al paciente ya que el aspirado, el centrifugado y la implantación del producto son realizados en un único acto quirúrgico.

Frente al concentrado de aspirado de médula ósea, el cultivo de CMM se presenta como una alternativa atractiva, aunque más sofisticada y costosa. Consiste

en el cultivo de las CMM en un medio adecuado, de forma controlada durante un cierto periodo de tiempo. Tiene la ventaja de conseguir concentraciones muy elevadas de CMM, de utilizar un número de elementos celulares conocidos y de adherir las CMM a distintas estructuras biológicas o sintéticas que actúan como transportadores y/o coadyuvantes al tratamiento. Se han publicado pocos trabajos sobre la utilización de CMM cultivadas en el tratamiento de la ONCF, y de ellos solo 1 las utiliza asociada a una técnica de DC (176,177). Zhao y col. obtuvieron un aspirado de solo 10 cc. de médula ósea directamente desde el hueso esponjoso del trocánter mayor. Después de un tiempo de cultivo en el laboratorio de 2 semanas obtuvieron una solución de 2 cc. de plasma normal que contenía 2×10^6 CMM(178). En nuestro estudio obtuvimos un producto final rico en CMM a partir de 120 cc. de aspirado de médula ósea cultivadas durante un periodo de 3 meses. Finalmente implantamos 5 cc. de hueso esponjoso liofilizado que llevaba adheridas una media de 86×10^4 células por cc.

Procedimientos quirúrgicos asociados a la implantación de

CMM

En la práctica clínica las CMM han sido implantadas a nivel de la cabeza femoral siguiendo distintas técnicas quirúrgicas y asociadas a distintos procedimientos (13,22,146,177).

La DC es en la actualidad considerada como el patrón oro del tratamiento quirúrgico de la ONCF en estadios precolapso (9). El canal óseo hasta el núcleo de la lesión necrótica permite el desbridamiento de la lesión, reduce la presión intraósea y puede estimular la neovascularización desde la periferia (76). Se han publicado 2 métodos diferentes para realizar la DC que varían en función del número y el diámetro de los canales utilizados y que tienen importancia pues condicionan la forma en la que se implantan las CMM. La forma más común es utilizar un único canal de entre 8 y 10 mm., como se hizo en nuestro estudio, lo que permite un adecuado desbridamiento de la lesión y la utilización coadyuvante de injertos o sustitutivos óseos. Se ha descrito una variante técnica en la realización de la DC que consiste en la utilización de múltiples canales óseos de pequeño diámetro (9,111). Esta modificación técnica tiene la ventaja de ser menos invasiva y la desventaja de un menor desbridamiento de la zona necrótica y la no utilización de injerto óseo. Los resultados de la DC mediante la técnica de perforaciones múltiples han sido contradictorios. Algunos autores han publicado tasas de éxito del 80% en estadios precolapso, superiores a los obtenidos con la técnica clásica.

Sin embargo algunos estudios comparativos no han mostrado diferencias significativas con la DC clásica (179).

La utilización de injertos y sustitutivos óseos tiene la teórica ventaja de aportar soporte mecánico y andamiaje para favorecer el crecimiento celular (112,113,180). Se han descrito numerosos métodos para la introducción del injerto óseo, su introducción a través del canal de la DC, a través de una ventana en el cartílago articular o a través de una ventana en la unión cabeza- cuello femoral. Los resultados publicados en el tratamiento de pacientes en estadio precolapso en la literatura son muy variables y se sitúan entre el 36% y el 90% de buenos resultados. La gran variabilidad en las técnicas quirúrgicas practicadas, así como en el tipo de injerto – esponjoso o cortical – y distintas asociaciones a sustancias osteoinductoras como la proteína morfogenética humana hace difícil comparar los resultados. No obstante se puede afirmar que los resultados publicados no son superiores a los resultados publicados en la DC aislada (112,181).

La mayoría de los trabajos publicados sobre el tratamiento de la ONCF con CMM asocian la implantación a una DC de la cabeza femoral con distintas variantes. Hernigou y col. fueron de los primeros en utilizar el concentrado de médula ósea en el tratamiento de la ONCF en 189 casos (116 pacientes) con un seguimiento medio de 7 años. Como método de implantación utilizó una DC de pequeño diámetro lo que implica la utilización de las CMM en suspensión directamente instiladas en la cabeza femoral. Otros autores han publicado trabajos

similares instilando células mesenquimales a través de descompresiones del núcleo de 3 mm. (147). Gangji y col. En un estudio controlado y randomizado compararon los resultados de la descompresión central aislada frente a la combinación de descompresión central más concentrado de médula ósea en pacientes en estadio I y II de ARCO (13). Kumar Sen y col. realizaron un estudio comparativo entre descompresión central con y sin células mesenquimales mediante perforaciones múltiples de 4 mm. (149).

Otros autores han utilizado el concentrado de células mesenquimales asociado a una matriz osteogénica con el objetivo de rellenar el defecto necrótico y transportar las células mesenquimales (22,150,151). Liu y col. realizaron un estudio comparativo en pacientes con ONCF utilizando concentrado + implantación de partículas de hidroxiapatita frente a partículas de hidroxiapatita aisladas. Aunque ambos tratamientos fueron efectivos la tasa de colapso fue inferior en el grupo en el que se utilizó células mesenquimales (150). Por su parte Kang y col. utilizaron injerto autólogo de cresta ilíaca asociado al concentrado de células mesenquimales para el relleno de la cavidad desbridada. En su estudio, 65,7% de los pacientes en estadio II presentaron un resultado clínico exitoso (151). En nuestro estudio utilizamos una matriz de hueso esponjoso liofilizado que nos permite rellenar el defecto creado, sirve de transportador de los elementos celulares y aporta soporte estructural mecánico lo cual es considerado por algunos autores como un elemento esencial después de la descompresión central y durante el periodo de revascularización (182).

Kawate y col. implantaron CMM cultivadas durante 2 semanas en 3 pacientes asociando una DC con fosfato tricálcico y peronés vascularizado en 3 pacientes (177). Por último Yamasaki y col. asociaron a implantación de CMM a un implante de tantalio (22).

Supervivencia de la CMM asociadas a DC

Tomando como evento final el colapso de la cabeza femoral, los resultados de este estudio no demuestran que las CMM asociadas a un cilindro de hueso liofilizado sean superiores a la DC aislada. Dos pacientes del grupo de estudio presentaron un colapso de la cabeza femoral al final del seguimiento frente a 2 pacientes del grupo control con un tiempo medio de supervivencia de 31 meses (IC al 95% 21,58 a 40,44), mientras que en el grupo control fue de 27,54 meses (IC al 95% 16,96 a 38,12). $P=0,668$. La razón principal podría ser la falta de potencia estadística de este trabajo para demostrar la eficacia de las CMM en la prevención del colapso de la cabeza femoral en la ONCF. Hay que señalar que este estudio se enmarca en un proceso de investigación traslacional desde la investigación de laboratorio hasta la investigación clínica y que, por lo tanto, fue diseñado en fase I-II. En otras palabras nuestro estudio tiene como finalidad principal demostrar la seguridad del producto utilizado – X-CEL-MT- OSTEO ALPHA –, formado por células madre mesenquimales cultivadas ex-vivo colonizando chips de esponjosa de hueso liofilizado, y obtener información preliminar sobre su eficacia en el tratamiento de la ON, como corresponde a los ensayos clínicos en fase I-II. El tamaño muestral no fue diseñado para valorar la eficacia del procedimiento. Por otro lado los buenos resultados publicados de la DC aislada en la prevención del colapso de la cabeza femoral explican, en parte, la dificultad de obtener datos significativos de la eficacia de las terapias alternativas en el tratamiento de la ON. En un metaanálisis de los resultados de la DC en 1206 caderas tratadas en 24

estudios publicados antes de 1995, 84% de los pacientes en estadio I y 65% de los pacientes en estadio II tuvieron buenos resultados (109). Otros autores posteriores a 1996 han publicado resultados similares (110,183,184).

El estudio preclínico que precedió la realización de este ensayo clínico fue publicado en el año 2012 por Vélez y col. En un trabajo en ovejas a las que se les provocaba una ON, demostraron que XCEL-MT-OSTEO-ALPHA producía regeneración ósea en un 40% de los casos en zonas de isquemia severa de la cabeza femoral frente a un 0% de los casos en los que no se utilizaban CMM (16). Resultados similares habían sido publicados previamente por distintos autores (154,157).

Otro de los datos a considerar a la hora de analizar los resultados obtenidos es como se distribuyen los distintos factores de riesgo asociados a la progresión de la ONCF en nuestros pacientes. Entre ellos el más reconocido es el estadio evolutivo en el que se encuentra la enfermedad. Como norma general a mayor estadio evolutivo peor pronóstico independientemente del tratamiento aplicado, aunque hay que considerar la identificación de signos radiológicos de colapso de la superficie articular femoral – crescent sign o pérdida de la esfericidad de la cabeza del fémur - como el hecho diferenciador entre un pronóstico favorable o no. La aparición de éstos signos radiológicos corresponde con un estadio III de la clasificación de Ficat, Steimberg o ARCO (185). Dentro de los pacientes con estadios precolapso, la etiología, el tamaño de la lesión y su localización han sido

descritos como los factores pronósticos más importantes en el tratamiento de la ONCF (59,60,185). Entre las etiologías relacionadas con la ONCF la administración de corticoides a dosis altas, el consumo elevado de alcohol y la anemia de células falciformes han sido asociadas a una tasa mayor de malos resultados independientemente del tratamiento aplicado (59,64). La tasa de colapso publicada en la ONCF asociada a corticoides y alcohol es del 78.6% y del 83% respectivamente en un seguimiento a 2 años (64). Mont y col. en una revisión sistemática encontraron que en un periodo medio de 88 meses la tasa de progresión a un estadio poscolapso de la ONCF era del 47% para pacientes alcohólicos y del 73% para pacientes diagnosticados de anemia de células falciformes (59). El tamaño de la lesión también es uno de los factores de riesgo claramente relacionado con el pronóstico de la ONCF (9,111,113,121,180,186–189). En general la mayor parte de los autores consideran una lesión pequeña como aquella que ocupa menos del 15% del volumen de la cabeza femoral o un ángulo de Kerboul inferior a 200°, una lesión mediana la que se extiende entre el 15% y el 30% del volumen de la cabeza femoral y una lesión grande la que ocupa más del 30% del volumen de la cabeza femoral o un ángulo de Kerboul superior a 200°. La tasa de fallo observada en los pacientes con lesiones pequeñas tratados mediante descompresión central se sitúa entre 14% y el 25% , mientras que en los pacientes con lesiones grandes se sitúa entre el 42% y el 84% (9,111,186,188). Estudios publicados en pacientes tratados mediante injertos vascularizados señalan que la

tasa de fracaso en las lesiones grandes se sitúa en el 42,8% frente al 24,6% de las lesiones pequeñas.

La localización de la lesión se basa en la clasificación de la asociación ortopédica japonesa. Esta asociación clasifica la ONCF en función de su localización con respecto a la zona de carga de la cabeza femoral. Las lesiones localizadas medialmente a la zona de carga son clasificadas como tipo A, mientras que las lesiones localizadas lateralmente a la zona de carga son clasificadas como tipo C. La tasa de fracaso de las lesiones tipo A se sitúa en el 4,6%, para el tipo B en el 15,4% y para el tipo C en entre el 31,3% y el 60,5% (75,112,181).

En este sentido los pacientes de nuestro estudio que presentaron un colapso precoz presentaron lesiones tipo C, de localización lateral o se asociaron a factores etiológicos de mal pronóstico como el alcohol.

Los resultados publicados en relación a la supervivencia de la implantación de CMM asociadas a una DC han mostrado en general una disminución significativa de la proporción de pacientes que evolucionaron hacia el colapso de la cabeza femoral. Hernigou y col. presentaron los resultados del concentrado de médula ósea en el tratamiento de la ONCF en 189 casos (116 pacientes) con un seguimiento medio de 7 años. Aunque los resultados clínicos fueron aceptables, un 25,39% y un 31,4% de los pacientes en estadio I y II de Steimberg presentaron progresión radiológica de la enfermedad respectivamente. De ellos 6,21% requirieron la colocación de una prótesis total de cadera, la mayoría durante los

primeros 3 años de seguimiento. El porcentaje de pacientes con evolución radiológica aumentó hasta el 100% de los pacientes en estadio III y IV de Steimberg. De ellos 56,82% precisaron de la colocación de una prótesis de cadera (12). En una serie posterior con 534 casos en estadio I y II con un seguimiento medio de 13 años el porcentaje de pacientes que precisaron una prótesis total de cadera ascendió a 17,6 % (146). Gangji y col. En un estudio controlado y randomizado comparó los resultados de la descompresión central aislada frente a la combinación de descompresión central más concentrado de médula ósea en pacientes en estadio I y II de ARCO. Un 10% de los pacientes del grupo de estudio presentaron una progresión radiológica a estadio III frente al 62,5 % de los pacientes del grupo control (148). Más recientemente el mismo grupo publicó los resultados a 5 años de seguimiento de 24 casos en un estudio randomizado a doble ciego. El porcentaje de pacientes con progresión radiológica en el grupo de estudio aumentó hasta el 23,08% frente al 72,73% del grupo control. La media de supervivencia de los pacientes tratados con CMM tomando como punto final la aparición de colapso de la cabeza femoral fue de 52,2 meses (43,35 – 60,96 IC al 95%) frente a 26,5 meses (13,2 – 39,74 IC al 95%) del grupo control (13). Kumar Sen y col. en un estudio comparativo entre descompresión central con y sin células mesenquimales mediante perforaciones múltiples de 4 mm. , tomando como punto final la necesidad de una nueva cirugía, encontraron que la supervivencia media a los 12 meses era significativamente superior en el grupo que recibió el concentrado de células mesenquimales (46,72 +/- 2,34 semanas Vs 51,85 +/- 0,15 semanas).

Sin embargo no hubo diferencias significativas en la mejora radiológica entre los 2 grupos (149). Otro de los problemas que dificulta la comparación de resultados entre estos autores y nuestro estudio es la diferencia en la técnica quirúrgica utilizada. Ya que la mayoría de ellos aplicaron el concentrado en forma de instilación a través una perforación de 3 mm. de diámetro (13,146,149).

Regeneración ósea.

Los resultados de la RM con contraste obtenidos durante el primer año del seguimiento no muestran diferencias significativas entre las caderas en las que se realizó una descompresión aislada y las caderas en las que se implantaron las CMM. El limitado número de pacientes disponibles para el análisis en nuestro estudio – 5 pacientes en el grupo de estudio y 6 pacientes en el grupo control – podría explicar la falta de diferencia estadística. No obstante los mejores resultados se obtuvieron en los pacientes del grupo de estudio ya que 4 de las 5 caderas que completaron el año de seguimiento sin colapso, presentaron algún signo de neovascularización a nivel de la zona necrótica frente al grupo control en el que 4 de los 6 pacientes que completaron el seguimiento no presentaron signos claros de neovascularización. Incluso en una cadera del grupo de estudio se pudo constatar una neovascularización difusa y una disminución del ángulo de Kerboul desde un grado III a un grado II. No se conoce en la actualidad el tiempo necesario para poder observar mediante RM signos claros de regeneración ósea en la ONCF. Otros autores han encontrado previamente que estos efectos pueden ser observados mediante RM a partir de los 6 meses posoperatorios pero que hacen falta varios años para detectarlos con claridad (146,176) . Zhao y col. en su estudio comparativo de CD versus CD más CMM cultivadas encontraron que en ambos grupos se producía una disminución significativa del volumen del área necrótica respecto a los valores preoperatorios a partir de los 6 meses postoperatorios pero que esta disminución era significativamente mayor en el grupo en el que se

utilizaban CMM. Además señala que el proceso osteogénico de las CMM tiene una duración larga, de manera que a los 60 meses de seguimiento había conseguido reducir el área de necrosis al 20% del volumen de la cabeza femoral (176). Hernigou y col. en un estudio de 534 caderas con ONCF en grado I-II tratadas con CMM concentradas con un tiempo de seguimiento entre 8 y 18 años, presentó que 69 caderas, preoperatoriamente clasificadas como estadio I de ARCO, habían presentado una resolución completa de la osteonecrosis y que el volumen medio del área necrótica en las restantes 371 caderas se había reducido desde los 26 cm³ hasta los 12 cm³, lo que representa un volumen del 20% de la cabeza femoral (146).

Por otro lado el análisis anatomopatológico de las cabezas femorales recuperadas de aquellos pacientes que necesitaron la colocación de una prótesis total de cadera debido al colapso de la cabeza femoral mostró que solo la cabeza femoral de la cadera perteneciente al grupo control presentaba áreas de regeneración ósea. No existen en la literatura trabajos previos que estudien los resultados anatomopatológicos de las CMM en las cabezas femorales de aquellos pacientes que durante el seguimiento precisaron la colocación de una prótesis total de cadera. (Ilustración 40)

Por último hay que mencionar los resultados de la PET-TC F18 por el papel que un futuro podría desempeñar esta prueba en la medición de la eficacia de la utilización de CMM en la regeneración ósea. Los resultados de las 4 caderas analizadas – 3 del grupo de estudio y 1 del grupo control - , mostraron mayor actividad metabólica y por lo tanto una mayor actividad osteoblástica en los pacientes tratados con CMM. Además corroboró que una de las caderas tratadas presentaba una resolución de la lesión necrótica, tal como había diagnosticado previamente la RM. Estos resultados avalan su utilización en posteriores ensayos clínicos para probar la eficacia de las CMM en la ONCF.

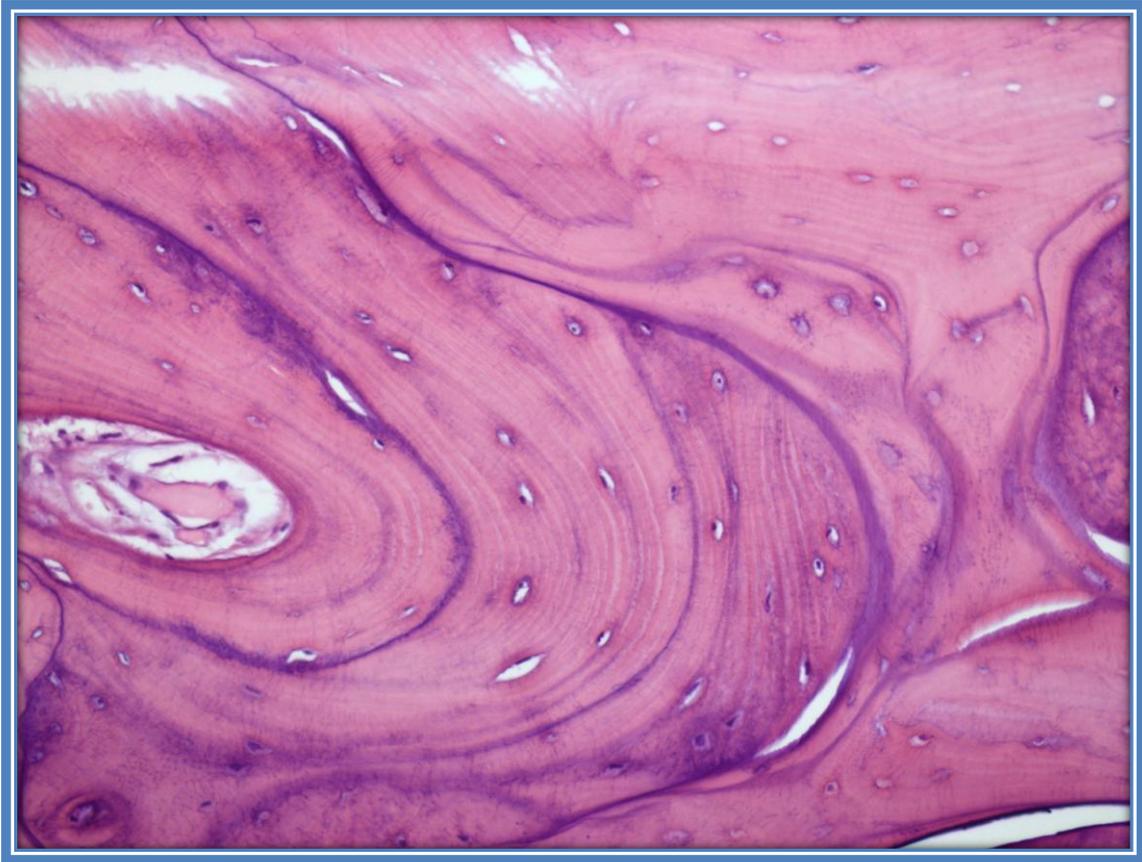


Ilustración 40 Regeneración ósea

Evolución clínica.

El tratamiento con CMM no mostró en este estudio una mejora del dolor ni la función postoperatoria con respecto a la DC a 1 año de seguimiento. Sin embargo los datos sugieren una tendencia a la mejora de los resultados clínicos de los pacientes tratados con CMM con respecto a los pacientes tratados con DC aislada especialmente en lo referente a la rigidez y la función postoperatoria. Una vez más la falta de potencia estadística podría explicar estos resultados. Por otro lado habría que señalar que tampoco se pudo demostrar una mejora significativa del dolor y la función de los pacientes entre el preoperatorio y el postoperatorio en ninguno de los 2 grupos estudiados. Además de la falta de potencia estadística hay que recordar que alguno de los pacientes tratados estaban paucisintomáticos e incluso en 2 casos asintomáticos antes del tratamiento. Aunque han sido publicados algunos casos de resolución espontánea de la ONCF en pacientes con lesiones pequeñas - < 15% - y de localización periférica al cono de carga de la articulación de la cadera (86), la mayor parte de los autores coinciden en que la ONCF, en ausencia de tratamiento, provoca el colapso y la pérdida de la esfericidad de la cabeza femoral. Como consecuencia de ello, en última instancia, se desarrolla una artropatía degenerativa coxofemoral avanzada(60–63). Por este motivo la simple observación, sin tratamiento específico no está indicada incluso en pacientes asintomáticos. Hernigou y col. publicaron que un 88% de 40 caderas con ONCF asintomática que afectaba a menos de un 10% de la cabeza femoral, progresaban a sintomáticas. Además 73% presentaban colapso radiológico (60). Por lo tanto la mejoría en los

parámetros clínicos, dolor y función, tampoco deberían ser la variable principal para la medición del efecto porque, como ha sucedido en nuestro estudio, muchos pacientes que previamente a la intervención quirúrgica se encontraban paucisintomáticos, permanecieron como tales durante todo el seguimiento postoperatorio y por lo tanto sin mejoría ni empeoramiento.

Los resultados clínicos publicados no son homogéneos en los distintos estudios. Sen y col publicaron una mejoría clínica significativa en la escala de cadera de Harris (HHS) de los pacientes tratados con CMM a los 12 meses de seguimiento pero no a los 24 meses (149). Wang también publicó una mejoría significativa de la HHS a los 27,6 meses en los pacientes tratados con CMM (175). Gangji y col. con un seguimiento de 5 años y 24 pacientes encontró una mejoría significativa del dolor en el grupo de pacientes tratados con CMM medida con una escala visual analógica pero, como en nuestro estudio no encontró una mejoría significativa en la escala de Womac (13).

Hasta el momento actual solo ha sido publicado un estudio comparativo entre el tratamiento de la ONCF mediante DC asociado a un cultivo de CMM y la DC aislada. En un trabajo controlado y randomizado Zhao y col. compararon 51 caderas tratadas mediante DC frente a 53 caderas tratadas mediante DC asociada a CMM cultivadas en un tiempo de seguimiento de 60 meses. Aunque se trata del estudio que por sus características es más comparable con nuestro trabajo, el método de obtención, preparación e implantación de las CMM difirió claramente

del método utilizado en nuestro estudio. Zhao y col. realizaron un aspirado de 10 cc. directamente de la médula ósea localizada en el trocánter mayor durante la realización de la DC, frente a los 120 cc. aspirados directamente de la cresta ilíaca posterior extraídos en nuestro estudio. Tras un periodo de cultivo de 2 semanas obtuvieron un preparado de 2 cc. de solución salina normal que contenía 2×10^6 CMM, frente a nuestros 5 cc. de hueso esponjoso liofilizado adherido a una media de $4,4 \times 10^6$ CMM en nuestro estudio (176).

Los resultados clínicos publicados por Zhao y col. muestran una mejoría significativa de los pacientes tratados con CMM en los estadios IC, 2B y 2C, así como una tendencia en los estadio 2A medida con la HHS. La proporción de pacientes con progresión al colapso también fue significativamente menor en el grupo tratado con CMM, 3,7% frente a 22,7% (178).

Reacciones adversas.

Se puede afirmar que la implantación de CMM asociada a la DC se mostró en nuestro estudio como un procedimiento seguro. Las complicaciones potenciales pueden dividirse entre aquellas relacionadas con la técnica quirúrgica y las relacionadas con la implantación de CMM. Gangji y col. en un estudio sobre 13 pacientes con ONCF tratados con ésta técnica publicaron la presencia de dolor en el punto de extracción de la médula ósea en 2 pacientes, 1 hematoma en la zona de realización de la DC y 1 una colonización del concentrado por *Staphylococcus aureus* en 1 paciente. Todos los casos se resolvieron con tratamiento médico sin más complicaciones (148). Hernigou y col. han publicado ausencia de complicaciones después de más de 1000 procedimientos realizado (191). En nuestro estudio no recogimos ninguna complicación relacionada directamente con el procedimiento. No hubo dolor en el punto de extracción de la médula ósea, ni complicaciones relacionadas con la DC. En cuanto al cultivo y manipulación de las CMM se siguió un estricto protocolo de manejo tanto en el laboratorio como en el quirófano no observándose complicaciones añadidas.

Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones de nuestro estudio vienen determinadas por el tamaño muestral. Como se ha señalado con anterioridad el tamaño muestral fue calculado para un ensayo en fase I-II para valorar la seguridad del producto y la evaluación preliminar de su eficacia. Ello impide sacar conclusiones poderosas sobre la efectividad de la técnica propuesta en el tratamiento de la ONCF así como el análisis de otros factores de riesgo implicados en la enfermedad tales como la etiología, el tamaño de la lesión y la localización. Una segunda limitación relacionada también con el diseño del estudio es la duración del seguimiento de 1 año. Dado que se trata de una enfermedad evolutiva de tiempo superior al año un estudio de eficacia debería abarcar varios años de seguimiento.

CONCLUSIONES

1. La extracción, cultivo e implantación de Células Madre Mesenquimales expandidas ex vivo, adheridas a hueso esponjoso liofilizado mediante una técnica de Descompresión Central, es un procedimiento viable y seguro en la Osteonecrosis de la cabeza femoral.
2. La implantación de Células Madre Mesenquimales no mejora los resultados clínicos y funcionales de la Descompresión Central aislada al año de seguimiento.
3. La implantación de Células Madre Mesenquimales expandidas ex vivo, adheridas a hueso esponjoso liofilizado no es superior a la Descompresión Central aislada en el mantenimiento de la esfericidad de la cabeza femoral al año de seguimiento.
4. Los estudios de Resonancia Magnética sugieren que la implantación de Células Madre Mesenquimales en un área de necrosis avascular podría ser capaz de reactivar la neovascularización ósea.
5. Los resultados de la tomografía de emisión de positrones con fluorina 18 muestran que la terapia con Células Madre Mesenquimales expandidas ex vivo, es capaz de generar actividad osteoblástica a nivel de la zona necrótica. Por lo tanto se ha de considerar su utilización en futuros ensayos clínicos en fase III para valorar la eficacia de la terapia con Células Madre Mesenquimales expandidas ex vivo en el tratamiento de la osteonecrosis de la cabeza femoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zalavras CG, Lieberman JR. Osteonecrosis of the femoral head: evaluation and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* [Internet]. 2014 Jul [cited 2014 Aug 19];22(7):455–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966252>
2. Mankin HJ. Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis). *N Engl J Med* [Internet]. 1992 May 28 [cited 2014 Aug 14];326(22):1473–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574093>
3. Glueck CJ, Freiberg RA, Sieve L, Wang P. Enoxaparin prevents progression of stages I and II osteonecrosis of the hip. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2005 Jun [cited 2014 Aug 18];(435):164–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930934>
4. Agarwala S, Shah SB. Ten-year follow-up of avascular necrosis of femoral head treated with alendronate for 3 years. *J Arthroplasty* [Internet]. 2011 Oct [cited 2014 Aug 18];26(7):1128–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256699>
5. Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2001 May [cited 2014 Aug 18];(386):173–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11347831>
6. Disch AC, Matziolis G, Perka C. The management of necrosis-associated and idiopathic bone-marrow oedema of the proximal femur by intravenous iloprost. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 2005 Apr [cited 2014 Aug 18];87(4):560–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795211>
7. Amanatullah DF, Strauss EJ, Di Cesare PE. Current management options for osteonecrosis of the femoral head: part II, operative management. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* [Internet]. 2011 Oct [cited 2014 Dec 29];40(10):E216–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22263205>
8. Ficat RP, Toulouse D. IDIOPATHIC NECROSIS OF THE FEMORAL. 1985;67(I).
9. Marker DR, Seyler TM, Ulrich SD, Srivastava S, Mont M a. Do modern techniques improve core decompression outcomes for hip osteonecrosis? *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2008 May [cited 2013 Nov 24];466(5):1093–103. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2010 Jun 15 [cited

2014 Aug 19];62(7-8):765–83. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398712>

11. Sun Y, Feng Y, Zhang C. The effect of bone marrow mononuclear cells on vascularization and bone regeneration in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Joint Bone Spine* [Internet]. 2009 Dec [cited 2014 Aug 18];76(6):685–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576836>
12. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2002 Dec [cited 2014 Aug 19];(405):14–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461352>
13. Gangji V, De Maertelaer V, Hauzeur J-P. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone* [Internet]. 2011 Nov [cited 2014 Aug 8];49(5):1005–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821156>
14. Chotivichit A, Korwutthikulrangsri E, Pornrattanamaneewong C, Achawakulthep C. Core decompression with bone marrow injection for the treatment of femoral head osteonecrosis. *J Med Assoc Thai* [Internet]. 2014 Sep [cited 2015 Jan 2];97 Suppl 9:S139–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365907>
15. Rackwitz L, Eden L, Reppenhagen S, Reichert JC, Jakob F, Walles H, et al. Stem cell- and growth factor-based regenerative therapies for avascular necrosis of the femoral head. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(1):1–9.
16. Vélez R, Hernández-Fernández A, Caminal M, Vives J, Soldado F, Fernández A, et al. Treatment of femoral head osteonecrosis with advanced cell therapy in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* [Internet]. 2012 Nov [cited 2015 Aug 5];132(11):1611–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22821379>
17. Shigemura T, Nakamura J, Kishida S, Harada Y, Ohtori S, Kamikawa K, et al. Incidence of osteonecrosis associated with corticosteroid therapy among different underlying diseases: prospective MRI study. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2011 Nov [cited 2014 Dec 4];50(11):2023–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865285>
18. Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, Horiuchi T, Tsukamoto H, Murai K, et al. Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. *Lupus*. 2005;14:385–90.

19. Oinuma K, Harada Y, Nawata Y, Takabayashi K, Abe I, Kamikawa K, et al. Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:1145–8.
20. Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwamoto Y. Incidence of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head in the Japanese population. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2011 Oct [cited 2014 Dec 29];63(10):3169–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953089>
21. Ikeuchi K, Hasegawa Y, Seki T, Takegami Y, Amano T, Ishiguro N. Epidemiology of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head in Japan. *Mod Rheumatol* [Internet]. 2014 Jul 18 [cited 2014 Dec 29];1–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25036228>
22. Yamasaki T, Yasunaga Y, Ishikawa M, Hamaki T, Ochi M. Bone-marrow-derived mononuclear cells with a porous hydroxyapatite scaffold for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a preliminary study. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 2010 Mar [cited 2014 Sep 9];92(3):337–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190302>
23. Cooper C, Steinbuch M, Stevenson R, Miday R, Watts NB. The epidemiology of osteonecrosis: findings from the GPRD and THIN databases in the UK. *Osteoporos Int* [Internet]. 2010 Apr [cited 2014 Dec 29];21(4):569–77. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2832873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Mont M a, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2006 May [cited 2013 Nov 24];88(5):1117–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651589>
25. Fukushima W, Yamamoto T, Takahashi S, Sakaguchi M, Kubo T, Iwamoto Y, et al. The effect of alcohol intake and the use of oral corticosteroids on the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head: a case-control study in Japan. *Bone Joint J* [Internet]. 2013 Mar [cited 2014 Dec 29];95-B(3):320–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450014>
26. Sakaguchi M, Tanaka T, Fukushima W, Kubo T, Hirota Y. Impact of oral corticosteroid use for idiopathic osteonecrosis of the femoral head: a nationwide multicenter case-control study in Japan. *J Orthop Sci* [Internet]. 2010 Mar [cited 2014 Dec 29];15(2):185–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20358330>

27. Jacobs B. Alcoholism-induced bone necrosis. *N Y State J Med* [Internet]. 1992 Aug [cited 2014 Dec 29];92(8):334–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1513511>
28. Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Noguchi Y, Sugioka Y, Iwamoto Y. Increased level of apolipoprotein B/apolipoprotein A1 ratio as a potential risk for osteonecrosis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1999 Aug [cited 2014 Aug 14];58(8):514–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1752928&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Liu Y-F, Chen W-M, Lin Y-F, Yang R-C, Lin M-W, Li L-H, et al. Type II collagen gene variants and inherited osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Jun 2 [cited 2014 Aug 14];352(22):2294–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930420>
30. Hirata T, Fujioka M, Takahashi KA, Asano T, Ishida M, Akioka K, et al. Low molecular weight phenotype of Apo(a) is a risk factor of corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplant. *J Rheumatol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2014 Aug 14];34(3):516–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143965>
31. Baldwin C, Nolan VG, Wyszynski DF, Ma Q-L, Sebastiani P, Embury SH, et al. Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2014 Aug 14];106(1):372–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895132&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Zalavras CG, Vartholomatos G, Dokou E, Malizos KN. Genetic background of osteonecrosis: associated with thrombophilic mutations? *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2004 May [cited 2014 Aug 14];(422):251–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187864>
33. Jones LC, Hungerford DS. Osteonecrosis: etiology, diagnosis, and treatment. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2015 Aug 17];16(4):443–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15201609>
34. Suh KT, Kim SW, Roh HL, Youn MS, Jung JS. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2005 Mar [cited 2014 Dec 29];(431):220–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685079>
35. Aldridge JM, Urbaniak JR. Avascular necrosis of the femoral head: etiology, pathophysiology, classification, and current treatment guidelines. *Am J Orthop*

- (Belle Mead NJ) [Internet]. 2004 Jul [cited 2015 Aug 17];33(7):327–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15344574>
36. Colwell CW, Robinson CA, Stevenson DD, Vint VC, Morris BA. Osteonecrosis of the femoral head in patients with inflammatory arthritis or asthma receiving corticosteroid therapy. *Orthopedics* [Internet]. 1996 Nov [cited 2015 Aug 13];19(11):941–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8936529>
 37. Inoue S, Horii M, Asano T, Fujioka M, Ogura T, Shibatani M, et al. Risk factors for nontraumatic osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation. *J Orthop Sci* [Internet]. 2003 Jan [cited 2015 Aug 9];8(6):751–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14648260>
 38. Griffith JF, Antonio GE, Kumta SM, Hui DSC, Wong JKT, Joynt GM, et al. Osteonecrosis of hip and knee in patients with severe acute respiratory syndrome treated with steroids. *Radiology* [Internet]. 2005 Apr [cited 2015 Aug 13];235(1):168–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15703312>
 39. Hong N, Du XK. Avascular necrosis of bone in severe acute respiratory syndrome. *Clin Radiol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2015 Aug 13];59(7):602–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208066>
 40. Wing PC, Nance P, Connell DG, Gagnon F. Risk of avascular necrosis following short term megadose methylprednisolone treatment. *Spinal Cord* [Internet]. 1998 Sep [cited 2015 Aug 13];36(9):633–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9773448>
 41. Koo K-H, Kim R, Kim Y-S, Ahn I-O, Cho S-H, Song H-R, et al. Risk period for developing osteonecrosis of the femoral head in patients on steroid treatment. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2002 Aug [cited 2015 Aug 13];21(4):299–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12189457>
 42. Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine* [Internet]. 2012 Apr [cited 2015 Aug 13];41(2):183–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3712793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 43. Yin L, Li Y, Wang Y. Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2006 Apr 5 [cited 2015 Aug 17];119(7):581–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16620700>
 44. Drescher W, Büniger MH, Weigert K, Büniger C, Hansen ES. Methylprednisolone enhances contraction of porcine femoral head epiphyseal arteries. *Clin Orthop*

- Relat Res [Internet]. 2004 Jun [cited 2015 Aug 17];(423):112–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15232435>
45. Drescher W, Li H, Lundgaard A, Bünger C, Hansen E-S. Endothelin-1-induced femoral head epiphyseal artery constriction is enhanced by long-term corticosteroid treatment. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2006 Nov [cited 2015 Aug 17];88 Suppl 3:173–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079385>
 46. Hirota Y, Hirohata T, Fukuda K, Mori M, Yanagawa H, Ohno Y, et al. Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1993 Mar 1 [cited 2014 Dec 29];137(5):530–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8465804>
 47. Matsuo K, Hirohata T, Sugioka Y, Ikeda M, Fukuda A. Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1988 Sep [cited 2015 Aug 9];(234):115–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3409564>
 48. Wang Y, Li Y, Mao K, Li J, Cui Q, Wang G-J. Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2003 May [cited 2015 Aug 17];(410):213–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771833>
 49. Yeh C-H, Chang J-K, Wang Y-H, Ho M-L, Wang G-J. Ethanol may suppress Wnt/beta-catenin signaling on human bone marrow stroma cells: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Aug 17];466(5):1047–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 50. Glueck CJ, Freiberg RA, Fontaine RN, Tracy T, Wang P. Hypofibrinolysis, thrombophilia, osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2001 May [cited 2014 Aug 18];(386):19–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11347834>
 51. Glueck CJ, Glueck HI, Welch M, Freiberg R, Tracy T, Hamer T, et al. Familial idiopathic osteonecrosis mediated by familial hypofibrinolysis with high levels of plasminogen activator inhibitor. *Thromb Haemost* [Internet]. 1994 Feb [cited 2015 Aug 17];71(2):195–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8191398>
 52. Glueck CJ, Freiberg R, Glueck HI, Henderson C, Welch M, Tracy T, et al. Hypofibrinolysis: a common, major cause of osteonecrosis. *Am J Hematol*

- [Internet]. 1994 Feb [cited 2015 Jul 5];45(2):156–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141121>
53. Glueck CJ, Freiberg RA, Wang P. Role of thrombosis in osteonecrosis. *Curr Hematol Rep* [Internet]. 2003 Sep [cited 2015 Aug 17];2(5):417–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932315>
 54. Glueck CJ, Freiberg RA, Wang P. Heritable thrombophilia-hypofibrinolysis and osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Aug 17];466(5):1034–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 55. Jones LC, Mont MA, Le TB, Petri M, Hungerford DS, Wang P, et al. Procoagulants and osteonecrosis. *J Rheumatol* [Internet]. 2003 Apr [cited 2015 Aug 17];30(4):783–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672200>
 56. Koo K-H, Lee JS, Lee YJ, Kim K-J, Yoo JJ, Kim HJ. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in patients with nontraumatic femoral head osteonecrosis. *J Orthop Res* [Internet]. 2006 Aug [cited 2015 Aug 9];24(8):1722–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16779830>
 57. Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Okamoto M, Sugioka N, et al. ABCB1 C3435T and G2677T/A polymorphism decreased the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after kidney transplantation. *Pharmacogenetics* [Internet]. 2003 Nov [cited 2015 Aug 9];13(11):675–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14583680>
 58. Lee MS, Hsieh P-H, Shih C-H, Wang C-J. Non-traumatic osteonecrosis of the femoral head - from clinical to bench. *Chang Gung Med J* [Internet]. Jan [cited 2015 Aug 18];33(4):351–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804664>
 59. Mont MA, Zywiell MG, Marker DR, McGrath MS, Delanois RE. The natural history of untreated asymptomatic osteonecrosis of the femoral head: a systematic literature review. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2015 Aug 18];92(12):2165–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844158>
 60. Hernigou P, Poignard A, Nogier A, Manicom O. Fate of very small asymptomatic stage-I osteonecrotic lesions of the hip. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2004 Dec [cited 2014 Aug 19];86-A(12):2589–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590840>

61. Hungerford DS, Jones LC. Asymptomatic osteonecrosis: should it be treated? *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2004 Dec [cited 2015 Jun 24];(429):124–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577476>
62. Bradway JK, Morrey BF. The natural history of the silent hip in bilateral atraumatic osteonecrosis. *J Arthroplasty* [Internet]. 1993 Aug [cited 2015 Jun 17];8(4):383–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8409989>
63. Kang JS, Moon KH, Kwon DG, Shin BK, Woo MS. The natural history of asymptomatic osteonecrosis of the femoral head. *Int Orthop* [Internet]. 2013 Mar [cited 2015 Aug 9];37(3):379–84. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3580088&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
64. Lee MS, Chang Y-H, Chao E-K, Shih C-H. Conditions before collapse of the contralateral hip in osteonecrosis of the femoral head. *Chang Gung Med J* [Internet]. 2002 Apr [cited 2015 Aug 18];25(4):228–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12079156>
65. Pierce TP, Jauregui JJ, Cherian JJ, Elmallah RK, Mont MA. Imaging evaluation of patients with osteonecrosis of the femoral head. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2015 Sep;8(3):221–7.
66. Steinberg DR, Steinberg ME, Garino JP, Dalinka M, Udupa JK. Determining lesion size in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2006 Nov [cited 2013 Nov 24];88 Suppl 3:27–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079364>
67. Kerboul M, Thomine J, Postel M, Merle d'Aubigné R. The conservative surgical treatment of idiopathic aseptic necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 1974 May;56(2):291–6.
68. Ohzono K, Saito M, Sugano N, Takaoka K, Ono K. The fate of nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. A radiologic classification to formulate prognosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1992 Apr [cited 2015 Jul 1];(277):73–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1555359>
69. Malizos KN, Karantanas AH, Varitimidis SE, Dailiana ZH, Bargiotas K, Maris T. Osteonecrosis of the femoral head: Etiology, imaging and treatment. *Eur J Radiol*. 2007 Jul;63(1):16–28.
70. Lee G-C, Khoury V, Steinberg D, Kim W, Dalinka M, Steinberg M. How do radiologists evaluate osteonecrosis? *Skeletal Radiol*. 2014 May;43(5):607–14.

71. Bluemke DA, Zerhouni EA. MRI of avascular necrosis of bone. *Top Magn Reson Imaging*. 1996 Aug;8(4):231–46.
72. Khanna AJ, Yoon TR, Mont MA, Hungerford DS, Bluemke DA. Femoral head osteonecrosis: detection and grading by using a rapid MR imaging protocol. *Radiology*. 2000 Oct;217(1):188–92.
73. Steinberg R. A QUANTITATIVE SYSTEM FOR STAGING. (C).
74. Koo KH, Kim R. Quantifying the extent of osteonecrosis of the femoral head. A new method using MRI. *J Bone Joint Surg Br*. 1995 Nov;77(6):875–80.
75. Petrigliano F a, Lieberman JR. Osteonecrosis of the hip: novel approaches to evaluation and treatment. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2007 Dec [cited 2013 Nov 24];465(465):53–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906590>
76. Lieberman JR, Berry DJ, Mont MA, Aaron RK, Callaghan JJ, Rajadhyaksha AD, et al. Osteonecrosis of the hip: management in the 21st century. *Instr Course Lect* [Internet]. 2003 Jan [cited 2014 Aug 19];52:337–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690862>
77. Ragab Y, Emad Y, Abou-Zeid A. Bone marrow edema syndromes of the hip: MRI features in different hip disorders. *Clin Rheumatol*. 2008 Apr;27(4):475–82.
78. Ito H, Matsuno T, Minami A. Relationship between bone marrow edema and development of symptoms in patients with osteonecrosis of the femoral head. *AJR Am J Roentgenol*. 2006 Jun;186(6):1761–70.
79. Ha Y-C, Jung WH, Kim J-R, Seong NH, Kim S-Y, Koo K-H. Prediction of collapse in femoral head osteonecrosis: a modified Kerboul method with use of magnetic resonance images. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2006 Nov [cited 2013 Nov 7];88 Suppl 3:35–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079365>
80. Stevens K, Tao C, Lee S-U, Salem N, Vandevenne J, Cheng C, et al. Subchondral Fractures in Osteonecrosis of the Femoral Head: Comparison of Radiography, CT, and MR Imaging. *Am J Roentgenol*. 2003 Feb;180(2):363–8.
81. Mont MA, Ulrich SD, Seyler TM, Smith JM, Marker DR, McGrath MS, et al. Bone scanning of limited value for diagnosis of symptomatic oligofocal and multifocal osteonecrosis. *J Rheumatol*. 2008 Aug;35(8):1629–34.

82. Dasa V, Adbel-Nabi H, Anders MJ, Mihalko WM. F-18 Fluoride Positron Emission Tomography of the Hip for Osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 Mar;466(5):1081–6.
83. Mont MA, Marulanda GA, Jones LC, Saleh KJ, Gordon N, Hungerford DS, et al. Systematic Analysis of Classification Systems for Osteonecrosis of the Femoral Head. 2009;
84. Arlet J, Ficat P. [Diagnosis of primary femur head osteonecrosis at stage 1 (preradiologic stage)]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* [Internet]. Jan [cited 2015 Aug 18];54(7):637–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4236312>
85. Marker DR, Seyler TM, McGrath MS, Delanois RE, Ulrich SD, Mont M a. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2008 Nov [cited 2014 Aug 18];90 Suppl 4:175–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18984729>
86. Cheng EY, Thongtrangan I, Laorr A, Saleh KJ. Spontaneous resolution of osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2004 Dec [cited 2015 Aug 19];86-A(12):2594–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590841>
87. Cui Q, Wang GJ, Su CC, Balian G. The Otto Aufranc Award. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1997 Nov [cited 2015 May 22];(344):8–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9372754>
88. Wang GJ, Cui Q, Balian G. The Nicolas Andry award. The pathogenesis and prevention of steroid-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2000 Jan [cited 2015 Aug 19];(370):295–310. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10660725>
89. Jiang Y, Zhang Y, Zhang H, Zhu B, Li P, Lu C, et al. Pravastatin prevents steroid-induced osteonecrosis in rats by suppressing PPAR γ expression and activating Wnt signaling pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2014 Mar [cited 2015 Aug 19];239(3):347–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510055>
90. Nozaki Y, Kumagai K, Miyata N, Niwa M. Pravastatin reduces steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in SHRSP rats. *Acta Orthop* [Internet]. 2012 Feb [cited 2015 Aug 19];83(1):87–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3278663&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

91. Sakamoto K, Osaki M, Hozumi A, Goto H, Fukushima T, Baba H, et al. Simvastatin suppresses dexamethasone-induced secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in human bone marrow adipocytes. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Aug 19];12(1):82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3114799&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
92. Kang P, Gao H, Pei F, Shen B, Yang J, Zhou Z. Effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Int J Exp Pathol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2015 Aug 19];91(3):235–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2884091&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
93. Nishida K, Yamamoto T, Motomura G, Jingushi S, Iwamoto Y. Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits: a preliminary histological study. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Aug 19];466(5):1054–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311459&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
94. Ajmal M, Matas AJ, Kuskowski M, Cheng EY. Does statin usage reduce the risk of corticosteroid-related osteonecrosis in renal transplant population? *Orthop Clin North Am* [Internet]. 2009 Apr [cited 2015 Aug 9];40(2):235–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2801433&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
95. Beckmann R, Shaheen H, Kweider N, Ghassemi A, Fragoulis A, Hermanns-Sachweh B, et al. Enoxaparin prevents steroid-related avascular necrosis of the femoral head. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Aug 19];2014:347813. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4106066&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
96. Chotanaphuti T, Thongprasert S, Laoruengthana A. Low molecular weight heparin prevents the progression of precollapse osteonecrosis of the hip. *J Med Assoc Thai* [Internet]. 2013 Oct [cited 2015 Aug 19];96(10):1326–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24350415>
97. Beckmann J, Schmidt T, Schaumburger J, Rath B, Lüring C, Tingart M, et al. Infusion, core decompression, or infusion following core decompression in the treatment of bone edema syndrome and early avascular osteonecrosis of the femoral head. *Rheumatol Int* [Internet]. 2013 Jun [cited 2015 Aug 19];33(6):1561–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263544>

98. Kemper O, Herten M, Fischer J, Haversath M, Beck S, Classen T, et al. Prostacyclin suppresses twist expression in the presence of indomethacin in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Med Sci Monit* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Aug 19];20:2219–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4238757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
99. Agarwala S, Shah S, Joshi VR. The use of alendronate in the treatment of avascular necrosis of the femoral head: follow-up to eight years. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 2009 Aug [cited 2014 Aug 18];91(8):1013–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651826>
100. Chen C-H, Chang J-K, Lai K-A, Hou S-M, Chang C-H, Wang G-J. Alendronate in the prevention of collapse of the femoral head in nontraumatic osteonecrosis: a two-year multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2012 May [cited 2014 Jul 30];64(5):1572–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127729>
101. Ramachandran M, Ward K, Brown RR, Munns CF, Cowell CT, Little DG. Intravenous bisphosphonate therapy for traumatic osteonecrosis of the femoral head in adolescents. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2007 Aug [cited 2014 Aug 18];89(8):1727–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671011>
102. Lai K-A, Shen W-J, Yang C-Y, Shao C-J, Hsu J-T, Lin R-M. The use of alendronate to prevent early collapse of the femoral head in patients with nontraumatic osteonecrosis. A randomized clinical study. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2005 Oct [cited 2014 Aug 18];87(10):2155–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16203877>
103. Bowers JR, Dailiana ZH, McCarthy EF, Urbaniak JR. Drug therapy increases bone density in osteonecrosis of the femoral head in canines. *J Surg Orthop Adv* [Internet]. 2004 Jan [cited 2015 Aug 19];13(4):210–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691182>
104. Kim HKW, Randall TS, Bian H, Jenkins J, Garces A, Bauss F. Ibandronate for prevention of femoral head deformity after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2005 Mar [cited 2015 Aug 19];87(3):550–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741621>
105. Ikegami A, Ueshima K, Saito M, Ikoma K, Fujioka M, Hayashi S, et al. Femoral perfusion after pulsed electromagnetic field stimulation in a steroid-induced osteonecrosis model. *Bioelectromagnetics* [Internet]. 2015 Jul [cited 2015 Aug

- 19];36(5):349–57. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25808585>
106. Ding S, Peng H, Fang H-S, Zhou J-L, Wang Z. Pulsed electromagnetic fields stimulation prevents steroid-induced osteonecrosis in rats. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Jul 11];12:215. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
107. Ishida M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Kubo T. Electromagnetic fields: a novel prophylaxis for steroid-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Aug 19];466(5):1068–73. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
108. Massari L, Fini M, Cadossi R, Setti S, Traina GC. Biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2006 Nov [cited 2015 Aug 9];88 Suppl 3:56–60. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079368>
109. Mont MA, Carbone JJ, Fairbank AC. Core decompression versus nonoperative management for osteonecrosis of the hip. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1996 Mar [cited 2015 Jul 1];(324):169–78. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8595753>
110. Castro FP, Barrack RL. Core decompression and conservative treatment for avascular necrosis of the femoral head: a meta-analysis. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* [Internet]. 2000 Mar [cited 2015 Aug 24];29(3):187–94. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746469>
111. Mont MA, Ragland PS, Etienne G. Core decompression of the femoral head for osteonecrosis using percutaneous multiple small-diameter drilling. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2004 Dec [cited 2015 Jan 2];(429):131–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577477>
112. Lieberman JR, Conduah A, Urist MR. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with core decompression and human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2004 Dec [cited 2014 Aug 19];(429):139–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577478>
113. Mont M a, Etienne G, Ragland PS. Outcome of nonvascularized bone grafting for osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2003 Dec [cited 2013 Nov 24];(417):84–92. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14646705>

114. Rosenwasser MP, Garino JP, Kiernan HA, Michelsen CB. Long term followup of thorough debridement and cancellous bone grafting of the femoral head for avascular necrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1994 Sep [cited 2015 Aug 25];(306):17–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8070190>
115. Malizos KN, Quarles LD, Dailiana ZH, Rizk WS, Seaber A V, Urbaniak JR. Analysis of failures after vascularized fibular grafting in femoral head necrosis. *Orthop Clin North Am* [Internet]. 2004 Jul [cited 2015 Aug 25];35(3):305–14, viii. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271538>
116. Kane SM, Ward WA, Jordan LC, Guilford WB, Hanley EN. Vascularized fibular grafting compared with core decompression in the treatment of femoral head osteonecrosis. *Orthopedics* [Internet]. 1996 Oct [cited 2015 Aug 9];19(10):869–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8905860>
117. Scully SP, Aaron RK, Urbaniak JR. Survival analysis of hips treated with core decompression or vascularized fibular grafting because of avascular necrosis. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1998 Sep [cited 2015 Aug 9];80(9):1270–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759810>
118. Sotereanos DG, Plakseychuk AY, Rubash HE. Free vascularized fibula grafting for the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1997 Nov [cited 2015 Aug 9];(344):243–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9372775>
119. Plakseychuk AY, Kim S-Y, Park B-C, Varitimidis SE, Rubash HE, Sotereanos DG. Vascularized compared with nonvascularized fibular grafting for the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2003 Apr [cited 2015 Jul 12];85-A(4):589–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672831>
120. Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Survival analysis of hips treated with core decompression or vascularized fibular grafting because of avascular necrosis. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2000 Feb [cited 2015 Aug 25];82(2):290–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10682738>
121. Aldridge JM, Berend KR, Gunneson EE, Urbaniak JR. Free vascularized fibular grafting for the treatment of postcollapse osteonecrosis of the femoral head. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2004 Mar [cited 2015 Aug 25];86-A Suppl:87–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996926>
122. Cho BC, Kim SY, Lee JH, Ramasastry SS, Weinzweig N, Baik BS. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with free vascularized fibular transfer. *Ann Plast*

- Surg [Internet]. 1998 Jun [cited 2015 Aug 25];40(6):586–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9641275>
123. Eisenschenk A, Lautenbach M, Schwetlick G, Weber U. Treatment of femoral head necrosis with vascularized iliac crest transplants. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2001 May [cited 2015 Aug 25];(386):100–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11347821>
124. Garberina MJ, Berend KR, Gunneson EE, Urbaniak JR. Results of free vascularized fibular grafting for femoral head osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Orthop Clin North Am* [Internet]. 2004 Jul [cited 2015 Aug 25];35(3):353–7, x. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271543>
125. Hasegawa Y, Iwata H, Torii S, Iwase T, Kawamoto K, Iwasada S. Vascularized pedicle bone-grafting for nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. A 5- to 11-year follow-up. *Arch Orthop Trauma Surg* [Internet]. 1997 Jan [cited 2015 Aug 25];116(5):251–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177798>
126. Ishizaka M, Sofue M, Dohmae Y, Endo N, Takahashi HE. Vascularized iliac bone graft for avascular necrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1997 Apr [cited 2015 Aug 25];(337):140–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137185>
127. Noguchi M, Kawakami T, Yamamoto H. Use of vascularized pedicle iliac bone graft in the treatment of avascular necrosis of the femoral head. *Arch Orthop Trauma Surg* [Internet]. 2001 Sep [cited 2015 Aug 25];121(8):437–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11550829>
128. Urbaniak JR, Coogan PG, Gunneson EB, Nunley JA. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with free vascularized fibular grafting. A long-term follow-up study of one hundred and three hips. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1995 May [cited 2015 Aug 26];77(5):681–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744893>
129. Tang CL, Mahoney JL, McKee MD, Richards RR, Waddell JP, Louie B. Donor site morbidity following vascularized fibular grafting. *Microsurgery* [Internet]. 1998 Jan [cited 2015 Aug 26];18(6):383–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847002>
130. Vail TP, Urbaniak JR. Donor-site morbidity with use of vascularized autogenous fibular grafts. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1996 Feb [cited 2015 Aug 26];78(2):204–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609110>

131. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* [Internet]. Jan [cited 2014 Aug 19];8(3):301–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15491506>
132. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* [Internet]. 2007 Aug [cited 2015 Jul 18];25(8):2025–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510220>
133. Ren C, Kumar S, Chanda D, Chen J, Mountz JD, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells* [Internet]. 2008 Sep [cited 2015 Aug 26];26(9):2332–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2940717&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
134. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. Jan [cited 2015 Jul 26];1(1):74–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18038395>
135. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet]. 2007 Feb [cited 2015 Jul 26];15(2):226–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17002893>
136. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2003 Dec [cited 2015 Apr 21];48(12):3464–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673997>
137. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1998 Jul [cited 2015 May 8];80(7):985–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698003>
138. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* [Internet]. 2000 Mar 5 [cited 2015 Aug 26];49(3):328–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602065>

139. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* [Internet]. Jan [cited 2015 Aug 26];6(2):125–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142444>
140. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2000 Sep [cited 2015 Aug 6];18(9):959–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973216>
141. Butler DL, Awad HA. Perspectives on cell and collagen composites for tendon repair. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1999 Oct [cited 2015 Sep 1];(367 Suppl):S324–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10546656>
142. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FNL, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* [Internet]. 2003 May [cited 2015 Sep 1];21(3):420–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706014>
143. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *J Orthop Res* [Internet]. 1998 Jul [cited 2015 Sep 1];16(4):406–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747780>
144. Yan Z, Hang D, Guo C, Chen Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. *J Orthop Res* [Internet]. 2009 Apr [cited 2014 Aug 19];27(4):442–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18925660>
145. Sun Y, Feng Y, Zhang C, Cheng X, Chen S, Ai Z, et al. Beneficial effect of autologous transplantation of endothelial progenitor cells on steroid-induced femoral head osteonecrosis in rabbits. *Cell Transplant* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Aug 18];20(2):233–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719092>
146. Hernigou P, Poignard A, Zilber S, Rouard H. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J Orthop* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Aug 19];43(1):40–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2739495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
147. Gangji V, Hauzeur J-P. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2005 Mar [cited 2013 Nov 8];87 Suppl 1(Pt 1):106–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743852>

148. Gangji V, Hauzeur J-P, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2004 Jun [cited 2014 Aug 19];86-A(6):1153–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173287>
149. Sen RK, Tripathy SK, Aggarwal S, Marwaha N, Sharma RR, Khandelwal N. Early results of core decompression and autologous bone marrow mononuclear cells instillation in femoral head osteonecrosis: a randomized control study. *J Arthroplasty* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 May [cited 2013 Nov 24];27(5):679–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000577>
150. Liu Y, Liu S, Su X. Core decompression and implantation of bone marrow mononuclear cells with porous hydroxylapatite composite filler for the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Arch Orthop Trauma Surg* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Sep 9];133(1):125–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070224>
151. Kang JS, Moon KH, Kim B-S, Kwon DG, Shin SH, Shin BK, et al. Clinical results of auto-iliac cancellous bone grafts combined with implantation of autologous bone marrow cells for osteonecrosis of the femoral head: a minimum 5-year follow-up. *Yonsei Med J* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2014 Sep 9];54(2):510–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3575995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
152. Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 1999 Mar [cited 2014 Aug 18];81(2):349–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204950>
153. Gangji V, Hauzeur J-P, Schoutens A, Hinsenkamp M, Appelboom T, Egrise D. Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Rheumatol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2014 Aug 19];30(2):348–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563694>
154. Tang TT, Lu B, Yue B, Xie XH, Xie YZ, Dai KR, et al. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with hBMP-2-gene-modified tissue-engineered bone in goats. *J Bone Joint Surg Br*. 2007 Jan;89(1):127–9.
155. Conzemius MG, Brown TD, Zhang Y, Robinson RA. A new animal model of femoral head osteonecrosis: one that progresses to human-like mechanical failure. *J Orthop Res*. 2002 Mar;20(2):303–9.

156. Yang S, Wu X, Mei R, Yang C, Li J, Xu W, et al. Biomaterial-loaded allograft threaded cage for the treatment of femoral head osteonecrosis in a goat model. *Biotechnol Bioeng*. 2008 Jun;100(3):560–6.
157. Asada T, Kushida T, Umeda M, Oe K, Matsuya H, Wada T, et al. Prevention of corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits by intra-bone marrow injection of autologous bone marrow cells. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 May;47(5):591–6.
158. Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*. 2010;12(5):576–8.
159. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012 Jan;5:19.
160. Feng Y, Yang S-H, Xiao B-J, Xu W-H, Ye S-N, Xia T, et al. Decreased in the number and function of circulation endothelial progenitor cells in patients with avascular necrosis of the femoral head. *Bone* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Aug 18];46(1):32–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747991>
161. Hernigou P, Beaujean F. Abnormalities in the bone marrow of the iliac crest in patients who have osteonecrosis secondary to corticosteroid therapy or alcohol abuse. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1997 Jul;79(7):1047–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234881>
162. Chen C, Yang S, Feng Y, Wu X, Chen D, Yu Q, et al. Impairment of two types of circulating endothelial progenitor cells in patients with glucocorticoid-induced avascular osteonecrosis of the femoral head. *Joint Bone Spine* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Aug 18];80(1):70–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503166>
163. Malaver-Ortega LF, Sumer H, Liu J, Verma PJ. The state of the art for pluripotent stem cells derivation in domestic ungulates. *Theriogenology*. 2012 Nov;78(8):1749–62.
164. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294–301.
165. Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res*. 2012 Jan;8:150.

166. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2012 Sep;21(14):2724–52.
167. Sachs PC, Francis MP, Zhao M, Brumelle J, Rao RR, Elmore LW, et al. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res.* 2012 Aug;349(2):505–15.
168. Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, Mann MM, Marra KG, Rubin JP, et al. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro. *Mol Vis.* 2010 Jan;16:2680–9.
169. Vidane AS, Zomer HD, Oliveira BMM, Guimarães CF, Fernandes CB, Perecin F, et al. Reproductive stem cell differentiation: extracellular matrix, tissue microenvironment, and growth factors direct the mesenchymal stem cell lineage commitment. *Reprod Sci.* 2013 Oct;20(10):1137–43.
170. Plock JA, Schnider JT, Solari MG, Zheng XX, Gorantla VS. Perspectives on the use of mesenchymal stem cells in vascularized composite allotransplantation. *Front Immunol.* 2013 Jan;4:175.
171. Insausti C, Blanquer M, García A, Castellanos G, Moraleda JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning Adv Appl.* 2014 Mar;7:53.
172. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem [Internet].* 2006 Aug 1 [cited 2014 Jul 12];98(5):1076–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16619257>
173. Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN, Ambrósio CE. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells Cloning.* 2015 Jan;8:125–34.
174. Dey D, Evans GRD. Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells by Nuclear Reprogramming. *Stem Cells Int.* 2011 Jan;2011:619583.
175. Wang B-L, Sun W, Shi Z-C, Zhang N-F, Yue D-B, Guo W-S, et al. Treatment of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head with the implantation of core decompression and concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells. *Arch Orthop Trauma Surg [Internet].* 2010 Jul [cited 2014 Sep 9];130(7):859–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19621230>
176. Cui D, Zhao D, Liu B, Tian F, Wang B, Guo L, et al. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone [Internet].* Elsevier Inc.; 2012

- Jan [cited 2013 Nov 24];50(1):325–30. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094904>
177. Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, Kotobuki N, Sugimoto K, Ohmura T, et al. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* [Internet]. 2006 Dec [cited 2014 Sep 9];30(12):960–2. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17181837>
178. Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, et al. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Jan [cited 2013 Nov 24];50(1):325–30. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094904>
179. Al Omran A. Multiple drilling compared with standard core decompression for avascular necrosis of the femoral head in sickle cell disease patients. *Arch Orthop Trauma Surg* [Internet]. 2013 May [cited 2015 Sep 10];133(5):609–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494112>
180. Mont MA, Einhorn TA, Sponseller PD, Hungerford DS. The trapdoor procedure using autogenous cortical and cancellous bone grafts for osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 1998 Jan [cited 2015 Sep 10];80(1):56–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460954>
181. Seyler TM, Marker DR, Ulrich SD, Fatscher T, Mont M a. Nonvascularized bone grafting defers joint arthroplasty in hip osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2008 May [cited 2013 Nov 13];466(5):1125–32. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311481&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
182. Brown TD, Pedersen DR, Baker KJ, Brand RA. Mechanical consequences of core drilling and bone-grafting on osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1993 Sep [cited 2015 Jan 1];75(9):1358–67. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408157>
183. Bozic KJ, Zurakowski D, Thornhill TS. Survivorship Analysis of Hips Treated with Core Decompression for Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head
Survivorship Analysis of Hips Treated with Core Decompression for Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head *. 2008;
184. Lavernia CJ, Sierra RJ, Grieco FR. Osteonecrosis of the femoral head. *J Am Acad Orthop Surg* [Internet]. 1999;7(4):250–61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10434079>

185. Lieberman JR, Engstrom SM, Meneghini RM, SooHoo NF. Which factors influence preservation of the osteonecrotic femoral head? *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2012 Feb [cited 2014 Aug 19];470(2):525–34. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3254748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
186. Israelite C, Nelson CL, Ziarani CF, Abboud JA, Landa J, Steinberg ME. Bilateral core decompression for osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2005 Dec [cited 2015 Aug 9];441:285–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16331016>
187. Kawate K, Yajima H, Sugimoto K, Ono H, Ohmura T, Kobata Y, et al. Indications for free vascularized fibular grafting for the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2007 Jan [cited 2015 Sep 10];8:78. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1988800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
188. Yoon TR, Song EK, Rowe SM, Park CH. Failure after core decompression in osteonecrosis of the femoral head. *Int Orthop* [Internet]. 2001 Jan [cited 2015 Sep 10];24(6):316–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3619933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
189. Yoo M-C, Kim K-I, Hahn C-S, Parvizi J. Long-term followup of vascularized fibular grafting for femoral head necrosis. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Sep 10];466(5):1133–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311477&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
190. Fontecha CG, Roca I, Barber I, Menendez ME, Collado D, Mascarenhas V V, et al. Femoral head bone viability after free vascularized fibular grafting for osteonecrosis: SPECT/CT study. *Microsurgery*. 2015 Jul;
191. 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* [Internet]. 2005 Jul [cited 2013 Nov 8];87(7):896–902. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972899>