



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



**Universitat Autònoma de Barcelona**

*Facultad de Medicina – Departamento de Cirugía  
Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas*

*Tesis Doctoral*  
**TGF- $\beta$ 1 y otras moléculas como biomarcadores  
de consolidación ósea en pseudoartrosis no  
hipertrófica de huesos largos**

Tesis doctoral presentada por:  
**Daniel Chaverri Fierro**

Directores:  
**Dr. Joaquim Vives Armengol**  
**Dr. Joan Minguell Monyart**  
**Dr Joan Nardi Vilardaga** (hasta el 31 de agosto de 2017)

Tutor:  
**Dr. Joan Minguell Monyart**

Barcelona, 2019



**Joan Minguell Monyart**, jefe de servicio del Hospital Vall d'Hebron y **Joaquim Vives Armengol**, facultativo del Banc de Sang i Teixits de Barcelona

Certificamos:                      Que el licenciado **Daniel Chaverri Fierro** ha desarrollado, bajo nuestra dirección, en el Hospital Asepeyo de Sant Cugat y en el Banc de Sang i Teixits de Barcelona, el trabajo que con el título: TGF-B1 y otras moléculas como biomarcadores de consolidación ósea en pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos, se presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que sea tomada en consideración y tenga los efectos que corresponda, presentamos en la Universidad Autónoma de Barcelona la mencionada Tesis firmando esta certificación

Barcelona, junio de 2019

Dr. Joan Minguell Monyart  
(Director)

Dr Joaquim Vives Armengol  
(Director)

Dr Joan Minguell Monyart  
(Tutor)

Daniel Chaverri Fierro  
(Doctorando)



# Agradecimientos

La presente tesis doctoral es fruto de muchas horas de trabajo y esfuerzo personal invertidos en ella a lo largo de 5 años. Todo este esfuerzo es aún mayor si cabe, cuando la realización de una tesis se compagina con el desempeño de una profesión tan exigente como la de médico. Pero he de decir, que una vez finalizado el trabajo y con los resultados en la mano, ese esfuerzo ha merecido la pena.

Huelga decir que una tesis doctoral no es obra de un solo individuo, sino que es el resultado de la suma del trabajo, aportaciones y sincronización de muchas otras personas e instituciones. Por ello, quiero expresar mi gratitud de manera genérica, a todas las personas que han aportado su granito de arena, de manera directa o indirecta, en este trabajo; y a dos instituciones sin las cuales esta investigación no hubiera sido posible, el Hospital Asepeyo Sant Cugat y el Banc de Sang i Teixits de Barcelona

De manera especial quisiera mostrar mi gratitud a las siguientes personas:

Al Dr Joaquim Vives, por creer en mi proyecto desde el primer instante en que se lo presenté y apostar por él. También por sus aportaciones clave, por su disponibilidad, por su generosidad, por su capacidad de liderazgo y de contagiar toda la inquietud científica que lleva dentro. Durante estos 5 años has pasado de ser un director de tesis a ser un amigo. Gracias por todo Quim. Eres genial.

Al Dr Joan Minguell, por su disponibilidad, amabilidad y esas aportaciones y retoques finales que tanto hacen falta al concluir un trabajo tan arduo.

Al Dr Joan Nardi que vivió los inicios de este trabajo y que contribuyó con su respaldo a la puesta en marcha del mismo.

A los Dres Fernando Granell, Santiago Gallardo, Aureliano Montiel y Javier Pinto por incorporarme a su grupo de trabajo, porque con ellos sin duda empezó todo. Sin su apuesta por mi persona esta tesis ni siquiera se hubiera llegado a plantear. Quiero agradecer vuestra confianza depositada,

todo lo que he aprendido junto a vosotros y el hacerme sentir en seguida como uno más del grupo. Gracias, maestros. Gracias, compañeros. Gracias, amigos.

Al Dr Antoni Dalmau, por apoyar sin fisuras el proyecto y por todas las facilidades que me ha dado para que esta tesis pueda ver la luz. Siempre he recibido un sí por respuesta. Gracias jefe, sin tu inestimable colaboración esto hubiera sido mucho más complicado.

A la Dra Ribó, por promover la investigación en el hospital y apoyar esta tesis doctoral en su fase final con gestos valientes y decididos. Gracias Cristina.

Al Dr Barrachina, por rodearme de gente con inquietud científica y por transmitirme todo el entusiasmo con el que se debe afrontar una empresa de esta envergadura.

A la Dra Arias por sus aportaciones y contribuciones científicas y personales. Gracias Ainhoa, tu apoyo ha sido muy importante, y lo sabes.

Al Dr Luis Lobo, por sus consejos finales y por ser mi compañero de fatigas. Aragoneses errantes en el mismo barco. Eres grande Luis.

A todo el personal de laboratorio del hospital y en especial a Marisa Martínez, a Joaquim Delgado, a Rosa Gómez y a Laura Chavero, por vuestra labor imprescindible y por soportarme durante 5 años a mí y a mis muestras.

A todas las personas que he conocido y me han ayudado durante mi paso por el Banc de Sang i Teixits, en especial a Ruth Coll, al Dr Joan García, a Marta Grau, a Anna del Mazo y a la Dra Alba López. Pero, me gustaría hacer una mención especial para el Dr Daniel Vivas, por su labor fundamental en mi tesis y su generosidad a raudales, por hacer que momentos de trabajo maratonianos se transformaran en momentos divertidos y por llegar a ser mi amigo. Eres un gran tipo Dani, de lo mejor que me ha aportado esta tesis.

Y por último, mi agradecimiento a mi familia, en especial a mis padres (Gregorio y Maribel) y a mi hermana (Cristina). Porque ellos han hecho que este aquí, que llegue hasta aquí y que sea como soy. Ellos me enseñaron a perseverar y a trabajar duro, siempre, sin reblar.





# **Índice de contenidos**

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Introducción.....	13
1.2. Concepto de pseudoartrosis.....	13
1.3. Tratamiento de la pseudoartrosis.....	16
1.4. Breve repaso a la biología de consolidación ósea.....	16
1.5. Métodos diagnósticos para la pseudoartrosis.....	18
1.6. Nuevas opciones diagnosticas: Biomarcadores y pseudoartrosis.....	20
1.7.¿Por qué TGF-B1?.....	25
1.8. Obtención de TGF-B1 y la influencia del manejo de la muestra.....	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. OBJETIVOS.....	33
4. HIPÓTESIS.....	37
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
5.1. Diseño del estudio.....	43
5.2. Esquema.....	45
5.3 Cronograma.....	46
5.5. Tamaño muestral.....	47
5.6. Criterios inclusión/exclusión.....	47
5.6.1 Criterios de inclusión.....	47
5.6.2 Criterios de exclusión.....	47
5.6.3 Criterios de retirada de los pacientes y procedimientos a seguir.....	48
5.7. Variables de análisis.....	48
5.8. Métodos diagnósticos y de evaluación empleados.....	49
5.8.1 Diagnóstico de pseudoartrosis no hipertrófica.....	49
5.8.2 Evaluación diagnóstica por la imagen.....	49
5.8.3 Evaluación TGF-B1 y TGF-B2.....	52
5.8.3.1 Obtención, manejo y almacenamiento de la muestra.....	52
5.8.3.2 Análisis de la muestra.....	54
5.9 Análisis estadístico.....	55
5.10 Aspectos éticos.....	56
6. RESULTADOS.....	57
6.1 Descripción de la muestra.....	59
6.2 Resultados radiológicos.....	60
6.3 División de la muestra y análisis de resultados.....	61
6.3.1 Respuesta al objetivo secundario a) y c).....	61
6.3.2 Respuesta al objetivo secundario b).....	64
6.3.3 Respuesta al objetivo principal. Descripción de la curva.....	66
6.3.3.1 Curva descrita por TGF-B1.....	67
6.3.3.2 Curva descrita por TGF-B2.....	67
6.3.3.3 Valores añadidos. Fosfatasa alcalina.....	67
7. DISCUSIÓN.....	69
7.1. Novedades, fortalezas y debilidades.....	71
7.2 Valores y comportamiento de los biomarcadores.....	72
7.3 TGF-B1 y TGF-B2 en sujetos sanos y en otras patologías.....	78
7.4 Aproximación al biomarcador ideal.....	79

7.5 Cuantificación de la consolidación ósea.....	79
7.6 Otras consideraciones .....	80
8.CONCLUSIONES .....	81
9. BIBLIOGRAFÍA .....	85
10. ANEXOS .....	95
11. APÉNDICE .....	101

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. Introducción

La pseudoartrosis es una complicación con unas tasas de incidencia que se estiman entorno al 5-10% de las fracturas (1) (2). Es frecuente su localización a nivel de la diáfisis de huesos largos siendo los tres segmentos más afectados el fémur, la tibia y el húmero. Se trata de una complicación de difícil solución que requiere de importantes gestos quirúrgicos y un problema acuciante dentro de la cirugía ortopédica y traumatológica actual. Se requieren una media de 1,5 intervenciones para las pseudoartrosis asépticas y de hasta 3,4 para las infectadas. Los tiempos medios de incapacidad laboral oscilan el año para las pseudoartrosis asépticas y los dos años para las sépticas (3). Todo ello genera un importante incremento de los costes sanitarios y sociales, así como malestar y discomfort en el paciente. Se ha cuantificado entre 7000 y 79000 libras solo el gasto sanitario hospitalario atribuido al tratamiento de la pseudoartrosis en Reino Unido, cifra a la que habría que añadir los costes sanitarios extrahospitalarios y sociales (2).

## 1.2. Concepto de pseudoartrosis

En los trastornos cronológicos de la consolidación de las fracturas, se diferencian dos cuadros: el retardo de consolidación y la pseudoartrosis. La pseudoartrosis se enmarca dentro de las llamadas complicaciones óseas tardías.

Se ha descrito clásicamente el retardo de consolidación como un retraso en la evolución del callo de fractura cuya consolidación se acaba produciendo sin variar el tratamiento (en un periodo de hasta 9 meses); mientras que la pseudoartrosis, a pesar de una correcta inmovilización o estabilización, nunca llega a consolidar, aceptándose como límite de tiempo los 9 meses señalados (4). Existen autores que acortan los tiempos, especialmente en huesos largos, estableciendo los 6 meses como límite sino se aprecian signos radiológicos de formación de callo óseo en tres controles radiológicos mensuales seriados (5). En nuestro trabajo nos acogeremos al concepto clásico establecido en 9 meses. La inestabilidad de la fractura, así como el dolor en la zona fractuaria son signos clínicos indicativos de pseudoartrosis que deben asociarse a los radiológicos.

Las clasificaciones existentes son antiguas pero conocidas, empleadas y aceptadas. Así, existen clasificaciones según el origen de la pseudoartrosis, según su localización, según su gravedad y evolución, según la presencia de infección y según la anatomía del callo. Weber y Cech (6) definieron con este último criterio la clasificación más clásica y utilizada de la pseudoartrosis y en la que nos vamos a basar en el presente estudio. La observación del aspecto anatómico del callo permite, según estos autores, definir la situación biológica y vascular de los fragmentos de la fractura no consolidada. Esta clasificación tiene gran valor pronóstico ya que el potencial reparador residual de la pseudoartrosis es la mayor ayuda que tiene el cirujano para tratar este problema. Diferencian entre:

– **Hipertróficas:** El foco de fractura presenta una buena biología y vascularización, por tanto el potencial reparativo es alto. La consolidación fracasa debido al exceso de movilidad en el foco de fractura, situación que impide la unión de los fragmentos. Esto genera intentos de reparación fallidos, dando lugar a un callo óseo abundante pero que no termina de unir. Su traducción radiológica es un callo hipertrófico y la ausencia de contacto entre los dos extremos óseos que componen la fractura.

– **Atróficas / hipotróficas / oligotróficas:** El foco fractuario presenta una pobre biología y vascularización, y por tanto su potencial reparativo es bajo. La fijación o estabilización en estos casos a pesar de ser correcto e impedir la movilidad del foco, no garantiza la consolidación ya que los bordes de la fractura no son capaces de producir nuevo tejido óseo. Su traducción radiológica es una ausencia de callo óseo y en muchos casos bordes atróficos y esclerosos.

Además de la pobre vascularización se han descrito varios factores que pueden contribuir a la pseudoartrosis atrófica: infección, hábito tabáquico, diabetes mellitus, estados carenciales, déficit nutricional, edad, alteraciones hormonales, consumo de corticoides o inhibidores de la síntesis de prostaglandinas. Obsérvese en el cuadro siguiente la relación de factores de riesgo implicados (7)(8) Tabla I.

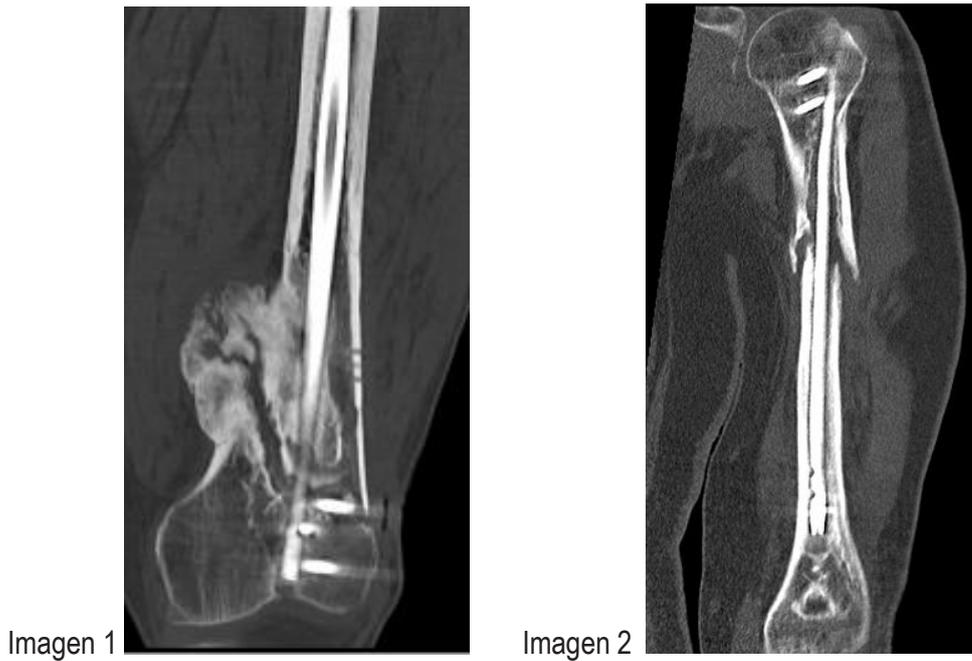


Figura 1: Pseudoartrosis diagnosticadas por TAC a los 9 meses. Imagen 1. Corresponde a una pseudoartrosis hipertrófica de fémur distal. Se aprecia el callo óseo hipertrófico, así como la ausencia de unión de los bordes de la fractura. Imagen 2. Pseudoartrosis atrófica diafisaria en húmero. Obsérvese la ausencia de callo óseo, así como los bordes atróficos y esclerosos de la fractura. Imágenes archivo propio: Daniel Chaverri

<b>Factores de riesgo que dificultan el proceso de consolidación ósea</b>	
<p><b>Relacionados con el paciente</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Genéticos: Polimorfismos en genes relacionados con Bone Morphogenetic Proteins (BMP): Noggin /Smdad6 y con Platelet Derived Growth Factor (PDGF)</li> <li>2) Edad</li> <li>3) Alteraciones sistémicas:                     <ul style="list-style-type: none"> <li>Diabetes Mellitus</li> <li>Obesidad</li> <li>Enfermedad Vascul ar Periférica</li> <li>Osteoporosis</li> <li>Malnutrición</li> <li>Estados carenciales</li> </ul> </li> </ol>	<p><b>Relacionados con la lesión</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Mecanismo de alta energía</li> <li>2) Conminución de la fractura</li> <li>3) Afectación de partes blandas</li> <li>4) Lesión vascular</li> </ol>
<p><b>Relacionados con el ambiente</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Hábito tabáquico</li> <li>2) Fármacos: antidiabéticos orales, quimioterápicos, anticoagulantes orales, ácido acetilsalicílico, antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), antibióticos (quinolonas, aminoglucósidos)</li> <li>3) Consumo alcohol</li> </ol>	<p><b>Relacionados con el tratamiento</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Contacto o no de corticales</li> <li>2) Desperiostización excesiva</li> <li>3) Pérdida de segmentos óseos</li> <li>4) Infección</li> <li>5) Mala indicación y colocación del implante</li> <li>6) Fasciotomías previas</li> <li>7) Momento de inicio de carga</li> </ol>

Tabla I: Factores de riesgo que influyen en el proceso de regeneración ósea. Copuroglu C et al (8)

### 1.3. Tratamiento de la pseudoartrosis

El tratamiento de cualquier pseudoartrosis debe basarse en: A) dar estabilidad mecánica al foco de fractura, B) aportar un estímulo biológico (osteogénico, osteoinductor, osteoconductor) así como C) procurar un aporte vascular adecuado (9). Dentro de los estimuladores biológicos el autoinjerto es el patrón oro por presentar capacidades osteoinductoras, osteoconductoras y osteogénicas. Los huesos de origen membranoso como el iliaco tienen más capacidad osteoinductiva que los de origen endocranal (huesos largos). Una vez implantadas las células del injerto en el foco de fractura responderán a estímulos locales liberando factores de crecimiento y favoreciendo la angiogénesis y la formación ósea. Se han reportado tasas de éxitos de entre el 80 y el 98% en pseudoartrosis atrófica de huesos largos mediante tratamiento con autoinjerto de cresta iliaca y/o de médula ósea femoral (10) (11) (12) (13) (14). Sin embargo, el principal inconveniente son las complicaciones en el sitio donante en forma de fracturas, déficits de regeneración ósea, infecciones, hematomas y dolor que en algunas series puede alcanzar hasta el 38% de los casos (10)(15)(16).

Para minimizar o evitar estas complicaciones se están desarrollando en la actualidad propuestas terapéuticas alternativas como aquellas que tienen por base el uso de células madre mesenquimales (MSC). Las MSC pueden obtenerse a partir de varios órganos y tejidos, siendo la médula ósea (MO) una de sus mejores y más accesibles fuentes. Después de su obtención las MSC pueden ser aisladas y multiplicadas *in vitro*, con capacidad para regenerar tejidos deteriorados o lesionados como el óseo. XCEL-MT-OSTEO-ALPHA® es una alternativa terapéutica para el tratamiento de la pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos que sustituiría al tratamiento estándar por MSC autólogas expandidas *ex vivo* y colonizadas en matriz esponjosa ósea alogénica procedente de banco de tejidos (17) (18) (19) (20) (21) (22).

### 1.4. Breve repaso a la biología de consolidación ósea.

Tradicionalmente se han descrito 5 fases de consolidación (7):

- 1) **Inflamatoria/hematoma:** La agresión traumática y el sangrado inician la cascada de acontecimientos en las que la formación del hematoma es esencial. De esta forma se lleva a cabo la activación de moléculas como las interleucinas (IL) por parte de células inflamatorias, y la secreción de factores de crecimiento por parte de las plaquetas:

Transforming Growth Factor (TGF) y Platelet Derived Growth Factor (PDGF) que participaran en procesos como la quimiotaxis, la angiogénesis y la respuesta celular. Se produce igualmente la activación de macrófagos y osteoclastos buscando la limpieza y eliminación del tejido desvitalizado.

- 2) **Angiogénesis y formación de cartílago:** Entre el séptimo y el décimo días, el periostio por un lado inicia la formación de hueso intramembranoso a ambos lados de la fractura; y el endostio, partes blandas adyacentes y periostio inician la formación de hueso endondral que constituirá la mayor parte del nuevo tejido de osificación.
- 3) **Calcificación del callo:** A los 20 días aproximadamente los condrocitos del hueso endondral, que han estado replicándose por mitosis, comenzaran la secreción de calcio y enzimas proteolíticas que degradaran la matriz extracelular (MEC) alcanzándose la calcificación del callo.
- 4) **Osificación del callo:** el callo endondral calcificado será invadido entre la 4-6ª semana por vasos sanguíneos que aportaran pericitos como células progenitoras de osteoblastos, iniciándose un proceso de recambio de hueso neoformado por hueso esponjoso.
- 5) **Remodelación ósea:** Finalmente durante un largo periodo de tiempo que constituirán meses o años se llevará a cabo un proceso de remodelado óseo mediante “creeping substitution”.

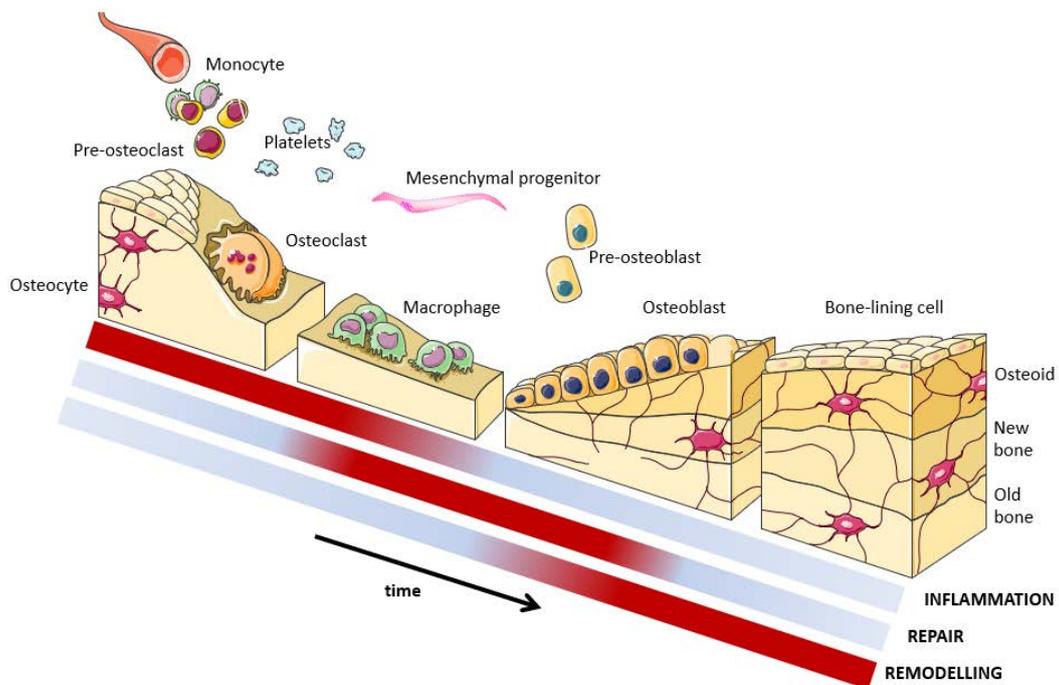


Figura 2: Imagen que muestra las diferentes fases de la consolidación ósea de manera esquemática: INFLAMMATION: Fases de Hematoma, Angiogénesis y Formación de cartílago. REPAIR: Fases de Calcificación y Osificación del callo. REMODELLING: Fase de Remodelación ósea. Fuente: Chaverri D (23). Ver apéndice I

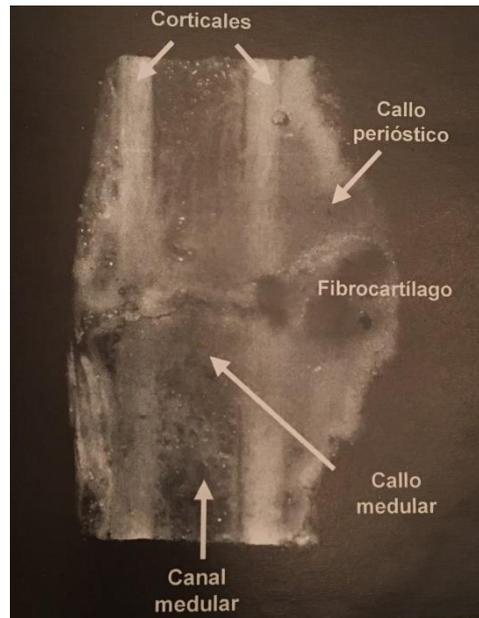


Figura 3: Imagen anatomopatológica de osteotomía tibial en perro con fijador externo a las 4 semanas. Obsérvese la formación de callo perióstico (osificación intramembranosa) y fibrocartilago y callo medular (osificación endondral). Fuente: Navarro, A. (7)

### 1.5. Métodos diagnósticos para la pseudoartrosis

Como se ha descrito en el punto 1.2, el diagnóstico de pseudoartrosis vendría determinado por 3 vertientes:

- 1) Clínica: presencia de dolor/movilidad en el foco de fractura
- 2) Radiológica: ausencia de signos de consolidación radiológica
- 3) Cronológica: en un plazo superior a los 9 meses

A nivel radiológico se han definido cualitativamente criterios para valorar la presencia o no de callo óseo. Sin embargo ante la ausencia de consenso internacional (24) se han desarrollado escalas como la Radiographic Union Score y la Radiographic Unión Score Modificada que cuantifican la consolidación ósea en base a una escala numérica en radiología simple (25)(26)(27). Estas escalas presentan algunas limitaciones sobretodo cuando se evalúa la consolidación en pacientes operados con determinado material de osteosíntesis (placas) ya que no se visualización en muchas ocasiones las cuatro corticales (28).

El TC ha demostrado tener un 100% de sensibilidad para detectar pseudoartrosis siendo más limitada su especificidad (62%) (29). Esa alta sensibilidad es lo que ha hecho que sea actualmente la prueba "princess" para el diagnóstico de la pseudoartrosis. Al igual que para la valoración por

radiología simple se ha propuesto una escala para la cuantificación de la consolidación ósea, la Tomographic Union Score (TUS), presentando mejores valores de fiabilidad inter e intraobservador que la escala RUS (30). Igualmente se está trabajando en nuevas formas de evaluación de la consolidación ósea por TC mediante la medición de la densidad ósea por Unidades Hounsfield (UH), si bien esta metodología está por desarrollar (31)(32)(33).

Como es bien sabido, el uso del TC no es inocuo generando altas dosis de irradiación al paciente, motivo por el cual su uso debe ser racionalizado. Por esto último se han abierto nuevas líneas de investigación que nos permitan monitorizar la consolidación ósea y diagnosticar precozmente la pseudoartrosis (23).

Se encuentran actualmente en estudio pruebas diagnósticas que nos permitan medir la vascularización en la zona y por tanto predecir el potencial de consolidación de la fractura, mediante el uso de laser doppler , resonancia magnética y tomografía con emisión de positrones (PET) (34)(35).

Se ha propuesto la determinación genética como causa de la pseudoartrosis, investigándose actualmente polimorfismos, así como otras alteraciones en la expresión génica que indiquen predisposición a la no consolidación ósea de un sujeto. Estos serían algunos de los genes alterados que podrían predisponer a la no consolidación, si bien la investigación en humanos a día de hoy es escasa y con resultados poco concluyentes (36) (37)(38) :

- Implicados en generación de matriz extracelular: CDO1 (Cysteine dioxygenase, type 1), PDE4DIP (Phosphodiesterase 4D interacting protein), COMP (Cartilage oligomeric matrix protein) , FMOD (Fibromodulin), FN1 (Fibronectina 1)
- Implicados en la formación de citoesqueleto: ACTA2 (Actin alpha 2), SMC (Smooth muscle cells).
- Implicados en la diferenciación: CLU (Clusterin), TSC22 (TGF-b-stimulated protein), TSC22D1 (TSC22 domain family, member 1).
- Implicados en la mediación celular: NOS2 (nitric oxide synthase 2 enzyme) .

Por último, una de las líneas que ha despertado grandes expectativas es la investigación molecular. Se basaría en la detección de una molécula en sangre (biomarcador) que nos permitiera monitorizar el proceso de consolidación ósea, de la misma manera que actualmente los reactantes

de fase aguda, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) y Proteína C Reactiva (PCR), nos permiten monitorizar la inflamación / infección (38) (34) (23).

**Table 1. Methodologies used in the detection of critical parameters affecting the diagnosis of nonunion or pseudoarthrosis.**

RC target	Method	Pros	Cons
Bone union	X-ray	Noninvasive	Poor resolution; exposure to radiation
Bone union	PET/CT	Noninvasive; high resolution	Expensive; exposure to magnetic fields
Circulating biomarker	ELISA	Minimally invasive (blood sample); customizable assays	Nonspecific binding and high background
Circulating biomarker	xMAP technology (i.e., Luminex)	Minimally invasive (blood sample); multiplex; high sensitivity and specificity	Dependence on commercial kits
Protein expression	IHC	Shows location of the expression of specific proteins	Invasive (biopsy); labor intensive; time consuming
Gene expression	qRT-PCR	Quantitative measure of levels of genes expressed locally	Invasive (biopsy); labor intensive

Preferred use of detection methods in Research (R) and Clinical (C) practice and their advantages are presented.  
 ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; IHC: Immunohistochemistry; PET/CT: Positron emission tomography/computed tomography; qRT-PCR: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; xMAP: (multiplex) MultiAnalyte Profiler.

Tabla II: Muestra los diferentes métodos de diagnóstico tanto usados en la práctica clínica como en fase de estudio con sus pros y contras. Fuente: Chaverri, D (23). Ver apéndice I.

## 1.6. Nuevas opciones diagnósticas: Biomarcadores y pseudoartrosis

La sangre es considerada un tejido con abundante información en forma de moléculas, que refleja el estado fisiológico de nuestro cuerpo (39). Podríamos decir que es el tejido cohesionador y vertebrador del organismo. Discurre por la mayoría de los órganos y tejidos, y por tanto es un elemento de relación y comunicación interna. Existe una gran cantidad de moléculas en ella, la mayoría desconocidas y/o poco estudiadas, que son la expresión de acontecimientos que están sucediendo en diversas partes del organismo. Entre estos eventos fisiológicos debemos incluir la consolidación ósea.

El poder predecir, detectar y/o diagnosticar mediante una molécula o biomarcador a aquellos pacientes en riesgo de desarrollar pseudoartrosis o no consolidación nos ayudaría a poder actuar precozmente e instaurar medidas especiales para prevenirla. Diversas líneas de investigación se centran actualmente en la búsqueda de dicho biomarcador. El biomarcador ideal sería aquel que permitiera predecir precozmente la no consolidación, que presentase una alta sensibilidad y especificidad y que fuera de fácil obtención (38).

Se considera un biomarcador de consolidación ósea a cualquier molécula liberada durante la producción o degradación de la matriz extracelular ósea; o cualquier molécula producida local o

sistémicamente que sirva de señal o guie el proceso normal de consolidación. Así se han descrito (40)(23)(34)(41):

- 1) Marcadores serológicos derivados de osteoblastos y relacionados con la formación ósea: Fosfatasa alcalina (ALP), Procolagen tipo I N-Terminal Propeptid (PINP), Procolagen tipo I C terminal propeptid (PICP), Amino-terminal procollagen propeptides of collagen type III (PIIINP), osteocalcin (OC), C-terminal cross linking telopeptide of type I collagen (CTX), Pyridoline (PYR) Deoxypyridinoline (DPD);
- 2) Marcadores serológicos derivados de osteoclastos y relacionados con la resorción ósea: Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAcP) y sus isoformas (mTRAcP, TRAcP 5 A), Cathepsin K.
- 3) Factores de crecimiento y moléculas inflamatorias producidas por las diferentes células implicadas en el proceso: Fibroblast Growth Factor 2 y 23 (FGF-2, FGF-23), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor 1 (TGF-B1), Bone Morphogenetic Protein (BMP), Macrophage colony stimulating factor (M-CSF), interleucines (IL).

Sin embargo, la utilidad de estos marcadores es limitada hasta que se conozcan con más detalle las fases y procesos biológicos que llevan a la consolidación ósea, así como la concatenación de los mismos (34). Es por ello por lo que estamos en una nueva e incipiente perspectiva para la descripción y detección precoz del éxito o fracaso de la consolidación ósea.

En la literatura encontramos algunos estudios realizados principalmente en animales, aunque también en humanos en la búsqueda de dicho biomarcador. La investigación en humanos es más limitada y metodológicamente más pobre, habiéndose estudiado unas pocas moléculas (Tabla III).

<b>Molecule</b>	<b>Study design</b>	<b>Results</b>	<b>Reference</b>
TGF-B1 receptor: TBRIII TGF-IGH3 (serum samples)	Transversal study 25 long bone fractures	TBRIII, TGF-IGH3 were two proteins detected in peripheric blood samples in patients with long bone fractures	Grguveric et al 2007 (39)
TGFB1 (serum samples)	Case Control Delayed union long bones 10 non union vs 10 union (2005) 15 non union vs 15 union (2007)	Significant differences at 4 (p 0,01), 8 and 12 week (p 0,05).	Zimmerman et al 2005, 2007 (42) (43)
CTX, PYR, DPD (urine and serum samples) OC Nmid (serum samples)	Case Control Non union vertebral fractures 9 non union vs 24 union	Significant differences for OC Nmid at 24 (p 0,05) and 48 (p 0,01) weeks	Ohishi et al 2008 (44)
VEGF (serum samples)	Case Control Delayed or non union long bones 11 non union vs 11 union	No significant differences at anytime	Sarahrudi et al 2008 (45)
FGF 23 (serum samples)	Case series 55 Aseptic loosening total hip replacement (THR) 40 primary Total Hip Arthroplasty (THA)	Elevated levels pre and 3 days postoperatively were observed in patients affected of aseptic loosening THR  FGF23 levels are elevated at day 1, 4 and 10 postoperatively compared with basal samples in patients with primary THA	Goebel et al 2009 (46)
NO, TGFB1, VEGF and BMP-2 (serum samples)	Case Control non union long bones treated with extracorporeal shockwave treatment 3 non union vs 9 union	Patients with bony union showed higher serum NO, TGFB1, VEGF and BMP-2 levels (p 0.05) at 1 month after treatment vs persistent non union	Wang et al 2009 (47)
OPG and RANK (serum samples)	Transversal study Union and non union long bones n=14 union (1 month control after fracture) n=18 union (6 month control after union diagnosis) n=18 non union (control after diagnosis of non union)	OPG : Significant differences between groups (p<0,001) RANK: no significant differences	Marchelli et al 2009 (48)
M-CSF (serum samples)	Case Control Delayed or non union long bones 9 non union vs 9 union	No significant differences at anytime	Sarahrudi et al 2010 (49)
TRACP 5b, CTX (serum samples)	Case Control Non union long bone 15 Non unions vs 15 unions	Significant differences in relative values TRACP 5b at week 4 and 8. No significant differences in absolute values.	Moghaddam et al 2011 (50)
TGFB1 (serum samples)	Case Control Delayed union long bones 9 non union vs 9 union	No significant differences at anytime	Sarahrudi et al 2011 (51)
FGF-2 (serum samples)	Case series 88 children undergoing surgical treatment for orthopaedic conditions	Lower FGF-2 serum levels were observed preoperatively in patients who did not heal after surgery	Granchi et al 2013 (52)

ALP (serum samples)	Case series n = 95	In normal healing group (n=87), the mean values of serum ALP were significantly higher than that of impaired healing group. In non-union group (n=8), the mean serum ALP levels remained within normal limits throughout the entire follow-up	Ajai et al. 2013 (53)
BMP-2,-4,-6,-7,-9	Transversal study Union/Delayed union long bones n=34 union n= 31 delayed unión samples of all patients were collected 5 years after bone healing	No significant differences	Baardewijk et al 2013 (54)

TBRIII: Type III TGF-B receptor; TGF-IGH3: TGF-beta induced gene-h3; TGF-B1: Transforming Growth Factor Beta 1; CTX: Type I collagen C-terminal telopeptide; PYR: Pyridoline; DPD: Deoxypyridinoline; OC Nmid: N-mid portion of Osteocalcin; VEGF: Vascular endothelial growth factor; FGF 23: Fibroblast Growth Factor 23; BMP-2-4-6-7-9: Morphogenetic bone protein 2-4-6-7-9 ; M-CSF: Macrophage colony stimulating factor; TRACP 5b: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b; FGF-2: Fibroblast Growth Factor 2. ALP: Alkaline Phosphatase OPG: Osteoprotegerin. RANK: Receptor Activator Nuclear Factor Kb. NO: Nitric Oxid

Tabla III. Se muestran los estudios en humanos realizados que evalúan diferentes biomarcadores de consolidación ósea . Fuente: Chaverri, D (23). Ver apéndice I

Moghaddam et al estudiaron los niveles séricos de **Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b)** y **C-terminal cross-linking telopeptide type I (CTX)**, marcadores de actividad osteoclástica, en 15 pacientes con retardo de consolidación en huesos largos, cruzándolos con otros 15 pacientes que consolidaron de manera normal. Observaron niveles menores estadísticamente significativos en la semana 1 para el CTX (valores absolutos) y en la semana 4 y 8 para el TRACP 5 (valores relativos: porcentajes) (50).

En estudios similares al anterior Sarahrudi et al (45)(49) no encontraron diferencias significativas para **Vascular endothelial growth factor (VEGF)** y **Macrophage colony stimulating factor M-CSF** al cruzar los resultados de estos biomarcadores de 11 pacientes con fracturas de huesos largos que no consolidaron frente a otros que si lo hicieron.

Granchi et al evaluaron el **Fibroblast growth factors-2 (FGF-2)** en 88 niños sometidos a tratamientos quirúrgicos ortopédicos hallando menores niveles FGF-2 en aquellos niños que no consolidaron tras la cirugía (52).

Goebel et al mostraron elevaciones de **Fibroblast growth factors-23 (FGF-23)** mayores a 3 veces el tercer día post cirugía en pacientes con aflojamiento aséptico tras implantación de una prótesis total cadera (46).

Ajai et al (53) demostraron como en 87 casos de fracturas diafisarias de fémur y tibia tratados conservadoramente, de los cuales 8 no consolidaron, los niveles de **fosfatasa alcalina (ALP)** eran más elevados en el grupo con evolución favorable en especial a las 3 semanas de iniciado el tratamiento de la fractura.

**Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF)** se trata de un factor de crecimiento encargado de regular la actividad osteoclástica y diferenciación de osteoclastos. Sarahrudi (47) estudió este mediador celular en 9 pacientes con retraso o ausencia de consolidación frente a otros 9 casos consolidados tras recibir tratamiento quirúrgico ambos grupos, no encontrando diferencias significativas en ningún punto del tiempo estudiado.

**Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-B1)** es hoy en día el biomarcador de consolidación ósea más estudiado en humanos. Se trata de una proteína reguladora, perteneciente a la familia TGF-B implicada en la remodelación y consolidación ósea. Se ha observado que juega un rol muy importante en la proliferación y diferenciación de las células mesenquimales, en la producción de matriz extracelular, la formación de cartílago, así como en la quimiotaxis de células óseas (55). Según Zimmerman la expresión de TGF-B1 comenzaría con la liberación del mismo por parte de las plaquetas implicadas en el hematoma de la fractura y los incipientes osteoblastos que se generan en la zona lo que da lugar a una elevación sérica del biomarcador hasta la semana 2 post fractura. Posteriormente sobreviene un descenso hasta alcanzar unas cifras valle a las 4 – 8 semanas, aumentando los niveles a partir de las 12 semanas hasta la semana 24 coincidiendo este segundo pico con la fase de remodelación y el aumento propio de la actividad osteoblástica de este periodo (42).

Zimmerman et al (42)(43) han estudiado el comportamiento sérico del biomarcador TGF-B1 en retardos de consolidación en fracturas de huesos largos observando diferencias estadísticamente significativas de TGF-B1 a las 4, 8 y 12 semanas al comparar en 2 estudios 1 grupo de 10 y 15 pacientes en retardo de consolidación frente a un grupo de 10 y 15 pacientes con consolidación normal. Dichos autores consideran que este factor de crecimiento podría usarse como un marcador predictivo de retardo de consolidación si se confirman estos resultados con estudios con mayor número de pacientes, hipotetizando la cifra de 45ng/ml séricos de TGF-B1 a las 4 semanas como punto de corte.

Posteriormente Sarahrudi et al (51) demostraron en un estudio similar a los anteriores con una n de 20 pacientes (10 pacientes por brazo) no encontrar diferencias significativas en la expresión sérica de TGF- $\beta$ -1, lo que muestra la necesidad de más estudios para generar datos sólidos.

Wang et al (47) analizaron en un grupo 12 pacientes con pseudoartrosis (hipertróficas/ atróficas) de huesos largos (fémur y tibia) los niveles séricos de NO, TGF- $\beta$ -1, VEGF y BMP-2 al día, al mes, a los 3 y a los 6 meses de haber sido sometidos a terapia de ondas de choque. Los pacientes que consolidaron (9 casos) mostraron mayores niveles de TGF- $\beta$ -1, VEGF, NO y BMP-2 al mes de tratamiento frente a aquellos que no consolidaron (3 casos).

### **1.7. ¿Por qué TGF- $\beta$ -1?**

TGF- $\beta$  es una de las diferentes proteínas secretadas para estimular el crecimiento y la replicación celular. Se han descrito tres isoformas: TGF- $\beta$ -1, TGF- $\beta$ -2 y TGF- $\beta$ -3 que presentan entre un 60-80% de homología entre ellas. Se les ha relacionado de manera genérica con la estimulación de la replicación celular, la formación de cartílago y hueso, así como de la formación de fibrosis. (55)

La mayor fuente de TGF- $\beta$ -1 se encuentra en las plaquetas, consideradas el mayor reservorio del organismo con una concentración 100 veces mayor que en otros tejidos. Además de en las plaquetas, el hueso es la siguiente ubicación con mayor concentración de TGF- $\beta$ -1. Se ha localizado también en menor cantidad en otros tejidos como miocitos cardíacos y en hepatocitos.

Se sabe por diferentes estudios in vitro y en animales que la presencia de TGF- $\beta$  en su estado latente, incrementa la actividad catalítica de enzimas proteolíticas (las denominadas “matrix metalloproteases” (MMPs)) y favorece la mineralización del cartílago de crecimiento. Por el contrario, la presencia activa de cualquiera de las tres isoformas, pero en especial de TGF- $\beta$ -1 y TGF- $\beta$ -2, tienen un efecto anabólico, regulando la condrogénesis y osteogénesis al activar la replicación y expresión génica de células productoras de proteínas de matriz extracelular (proteoglicanos). Igualmente se han observado efectos inductores de la angiogénesis para TGF- $\beta$ -1 (55).

Se ha demostrado que en el cómputo global de TGF- $\beta$  encontrado en plasma, la mayor parte del mismo corresponde a la isoforma TGF- $\beta$ -1, mientras que TGF- $\beta$ -2 y TGF- $\beta$ -3 se encuentran en cantidades inferiores al 5% del total (56).

Además de analizar las bases de datos tradicionales, nuestro grupo realizó recientemente un estudio in silico, utilizando la base de datos UniGene de la NCBI (National Center of Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>). El objetivo fue evidenciar las diferencias en cuanto a expresión génica que presenta una célula madre mesenquimal de medula ósea frente a una célula ósea diferenciada como es el osteoblasto. Tras realizar el análisis encontramos 28 genes diferenciadores. Al refinar la búsqueda y ver cuáles de ellos estaban implicados en el proceso biológico de consolidación ósea, codificando además proteínas extracelulares y ser estas susceptibles de analizarse por enzima-inmunoanálisis (ELISA) e ensayo luminométrico múltiple (Multiplex) obtuvimos únicamente 3 genes: FN1 (codificador de Fibronectina I), SPARC (codificador de osteonectina) y TGF-B1 (codificador de TGF-B1). Estos hallazgos ratificaron la influencia de la molécula TGF-B1 en el proceso de consolidación ósea.

GEN	FN1	TGF-B1	SPARC
Que codifica	<b>Fibronectina I</b>	<b>TGF-B1</b>	<b>Osteonectina</b>
<b>Patologías / Mecanismos relacionados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Adhesión celular</li> <li>-Migración celular</li> <li>-Cicatrización heridas</li> <li>-Compactación osteoblastos</li> <li>-Mineralización osteoblasto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Proliferación y diferenciación de osteoblastos</li> <li>-Remodelación ósea</li> <li>-Formación ósea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Implicado en la calcificación</li> <li>- Promueve la formación de matriz extracelular</li> <li>- Promotor de cambios en la morfología celular.</li> </ul>
<b>ELISA</b> (plasma)	Si	Si	Si
<b>Multiplex</b> (plasma)	Si	Si	Si

Tabla IV: Muestra los 3 genes obtenidos tras el análisis in silico llevado a cabo en la base de datos UniGene.

Se ha observado en estudios histológicos como la menor expresión de TGF-B1 está asociada a una menor capacidad de reparación ósea, llegándose a preconizar la posibilidad de la aplicación exógena de TGF-B1 en pacientes afectados de osteonecrosis de cabeza femoral como tratamiento de dicha patología (57).

Por último, mencionar que dada la creciente expectativa que se ha despertado entorno a TGF-B1 como biomarcador de consolidación ósea, se ha estudiado también la influencia que podrían tener variables como la edad, el sexo, el hábito tabáquico, el consumo de alcohol y la diabetes mellitus

en la expresión de TGF-B1 durante el proceso de consolidación ósea. Así, Kaiser et al, estudiaron en una muestra de 51 pacientes afectados de fracturas de huesos largos y tratados quirúrgicamente, la influencia de las variables antes mencionadas en la expresión de TGF-B1 observando una menor producción de TGF-B1 con diferencias significativas tanto en pacientes diabéticos, como en fumadores a las 6 y 8 semanas fundamentalmente. La edad, el consumo de alcohol y el sexo no mostraron diferencias significativas a lo largo de toda la curva de seguimiento, excepto a los 6 meses post fractura. (58)

Se ha evaluado también la influencia del uso de las heparinas de bajo peso molecular en los niveles de TGF-B1. Sarahrudi et al (59) demostraron in vivo como no parece haber diferencias significativas en los valores séricos de TGFB1, M-CSF y VEGF en 76 pacientes con fracturas de huesos largos tratados con enoxaparina tras tratamiento quirúrgico vs 5 pacientes que no recibieron anticoagulación. Únicamente parece haber diferencias significativas al mes 12 de tratamiento, aunque con una n tan pequeña (5 pacientes en el grupo a estudio) es difícil sacar conclusiones relevantes.

### 1.8. Obtención de TGF-B1 y la influencia del manejo de la muestra

El principal reservorio de TGF-B1 en el cuerpo humano se halla en las plaquetas, encontrándose en niveles de 40 a 100 veces más altos que en otros tejidos del cuerpo humano (60). La activación o degranulación de las plaquetas durante el procesado de las muestras puede conllevar a la alteración de los niveles de TGF-B1 invalidando los resultados obtenidos (61). La no uniformidad existente a la hora de manejar las muestras para el análisis de este biomarcador ha llevado a cuestionar los resultados de algunas publicaciones científicas. Ante esta situación, Zhao et al (62) evaluaron en el año 2012 la influencia de diferentes factores como la temperatura, el tipo de muestra (suero o plasma) y la fuerza de centrifugación en los niveles de TGF-B1 obtenidos, concluyendo que la metodología óptima para medir el TGF-B1 circulante debería ser: *“el uso de **plasma** obtenido por **alta centrifugación** de **manera inmediata** a la obtención de la muestra sanguínea o conservando la misma **en frío** durante el más corto periodo de tiempo posible previa a la centrifugación”*.

Según los trabajos de Zhao et al (62) deberíamos seguir las siguientes recomendaciones de buena práctica:

- Uso de tubos recolectores con anticoagulante 1,6mg EDTA/ml.

- Fuerzas de centrifugación inferiores a 2.500g serían insuficientes. Se recomiendan tiempos de centrifugado totales de 30 minutos a 4°C. Como alternativa, para muestras que hayan sido sometidas a menor fuerza de centrifugación o tiempo de centrifugado, sería necesario realizar un segundo centrifugado a 10000 g durante 15 minutos para conseguir los mismos resultados.
- Almacenamientos superiores a 5 minutos a temperatura ambiente entre la extracción de la muestra y el proceso de centrifugado y congelación influyen negativamente falseando los resultados. Se aconseja una vez extraída las muestras enfriarla en hielo durante al menos 5 minutos previo al centrifugado.
- Almacenamiento de la muestra a -80°C en caso de analizarse a largo plazo posteriormente.

Los estudios que han analizado TGF-B1 como biomarcador de consolidación ósea hasta hoy día son previos a la elaboración de las recomendaciones de Zhao et al en el año 2012. Por tanto, no se puede garantizar que los resultados de dichos estudios no hayan podido verse alterados por un incorrecto manejo y procesado de la muestra.

## **2. JUSTIFICACIÓN**



La consolidación ósea es un proceso altamente especializado que combina factores biológicos y biomecánicos. En cuanto a estos últimos la localización de la fractura, el defecto o gap entre ambos extremos de la fractura a rellenar, el tipo de tratamiento y la estabilidad que genere este serán determinantes en la curación o no de la misma. Es bien conocido que déficits en la vascularización, daños neurológicos, alteraciones en las partes blandas, así como la infección son elementos determinantes en el éxito o fracaso del proceso. Se sabe también, y se han enumerado previamente, diversos factores de riesgo que contribuyen negativamente en la evolución hacia la curación (7)(8). Sin embargo, existen pacientes que a pesar de contar con una correcta estabilización de la fractura y no presentar ninguno de los elementos o factores de riesgo antes mencionados no son capaces de llegar a la consolidación completa.

Aunque con poca precisión, se sabe que la concatenación de procesos biológicos que llevan a la consolidación ósea está controlada y regulada por diversos elementos moleculares como citoquinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos y enzimas proteolíticas secretados tanto a nivel local y con reflejo sistémico, como a nivel sistémico y con acción local. Cualquier alteración en la armonía y equilibrio de estos llevará a la ausencia o déficit de generación ósea (36). Nuestra hipótesis de trabajo se halla en este terreno y en poder detectar precozmente alteraciones en esa armonía o equilibrio antes mencionada que nos permita predecir cuando la consolidación ósea se llevará a cabo o no.

El uso de una molécula o biomarcador para detectar a aquellos pacientes en riesgo de desarrollar un retraso o déficit de consolidación ósea nos ayudaría a poder actuar precozmente e instaurar medidas especiales para prevenirla.

TGF-B1 emerge como una de las moléculas a priori a tener más en cuenta como candidato a actuar como biomarcador.

Los estudios realizados hasta la fecha que analizan el comportamiento de la molécula TGF-B1 evalúan los niveles de dicho biomarcador desde el momento en que se produce la fractura hasta el desarrollo del retardo de la consolidación o de la pseudoartrosis. Existe únicamente un estudio en pseudoartrosis que evalúe el comportamiento de TGF-B1 una vez instaurado un tratamiento

para la misma, las ondas de choque (47). No existe ningún estudio realizado en esta línea tras el tratamiento quirúrgico de esta patología. Nuestra propuesta pretende avanzar en el conocimiento de este biomarcador, partiendo del momento cronológico de la pseudoartrosis instaurada, y buscando analizar el comportamiento del biomarcador una vez que ponemos en marcha un plan terapéutico quirúrgico (injerto cresta iliaca / XCEL-MT-OSTEO-ALPHA®).

### **3. OBJETIVOS**



El **objetivo principal** es determinar los niveles séricos de los biomarcadores TGF-B1 y TGF-B2 en un grupo de pacientes diagnosticados de pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos, y analizar su comportamiento en el tiempo hasta los 12 meses post tratamiento.

Como **objetivos secundarios** se pretende valorar:

- a) Si existen diferencias en los niveles de dichos biomarcadores en función de si se alcanza la consolidación ósea o no.
- b) Si existen diferencias en los niveles de dichos biomarcadores en función del tratamiento asignado.
- c) Si TGF-B1 y TGF-B2 pueden ser biomarcadores que permitan la detección precoz del fallo en la consolidación ósea.



## 4. HIPÓTESIS



### **Para el objetivo principal**

Según lo analizado en la literatura cabría esperar un aumento de los niveles de TGF-B1 en las primeras 4-8 semanas para después disminuir sus niveles y volver a incrementarse los valores a partir de las 12 semanas de instaurado el tratamiento.

Es una incógnita el comportamiento de TGF-B2 ya que nunca se ha estudiado en trabajos de naturaleza similar al que proponemos. Cabe esperar que tenga un comportamiento parecido a TGF-B1.

### **Para los objetivos secundarios**

Dado que tanto TGF-B1 como TGF-B2 son factores de crecimiento relacionados con la formación de hueso, el aumento de los niveles de ambos debería ir emparejado a un aumento de la regeneración ósea. Por lo tanto:

Para objetivo secundario a)

- **H0:** No existe relación entre el aumento de los niveles séricos de TGF-B1 y TGF-B2 y la consolidación ósea en los pacientes a estudio.
- **H1:** Existe relación entre el aumento de los niveles séricos de TGF-B1 y TGF-B2 y la consolidación ósea en los pacientes a estudio.

Para objetivo secundario b)

- **H0:** No existe relación entre el aumento de los niveles séricos de TGF-B1 y TGF-B2 y el tipo de tratamiento aplicado en los pacientes a estudio.
- **H1:** Existe relación entre el aumento de los niveles séricos de TGF-B1 y TGF-B2 y el tipo de tratamiento aplicado en los pacientes a estudio.

Para objetivo secundario c)

- **H0:** No existen diferencias significativas entre los niveles séricos de TGF-B1 y TGF-B2 antes de los 6 primeros meses de seguimiento
- **H1:** Existen diferencias significativas entre los niveles séricos de TGF-B1 y TGF-B2 antes de los 6 primeros meses de seguimiento



## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 5.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio piloto prospectivo exploratorio que analiza una cohorte de pacientes incluidos en el ensayo clínico N° EudraCT 2013-005025-23. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital Asepeyo Sant Cugat que fue el hospital donde se trataron a los pacientes, y en el Banc de Sang i Teixits (BST) lugar donde se almacenaron y analizaron las muestras, entre los años 2014 a 2019.

Dado que la muestra obtenida del reclutamiento del ensayo clínico N° EudraCT 2013-005025-23 es una muestra homogénea y seleccionada a priori de pacientes diagnosticados de pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos; hemos considerado ideal esta cohorte para seguirla en el tiempo y determinar el comportamiento de los biomarcadores TGF-B1 y TGF-B2 en la regeneración ósea en una población afectada de esta patología.

El ensayo clínico N° EudraCT 2013-005025-23 se trata de un ensayo clínico, prospectivo, unicéntrico, abierto con evaluación ciega de resultados, aleatorizado y de dosis-única en el que se seleccionaron 20 pacientes de 18 a 65 años de edad afectados de pseudoartrosis no hipertrófica metafisodiarisaria adquirida de huesos largos. Estos pacientes se aleatorizaron en un diseño 1:1 a uno de los 2 tratamientos de estudio. Tratamiento A (experimental): estabilización mecánica si precisa asociada XCEL-MT-OSTEO-ALPHA® (células madre mesenquimales autólogas expandidas ex vivo y colonizadas en matriz esponjosa ósea alogénica procedente de banco de tejidos); tratamiento B (control): estabilización mecánica si precisa asociada a injerto autólogo de cresta iliaca (patrón de referencia actual) (Ver Figuras 4 y 5). Tras la aplicación del tratamiento se siguieron a los pacientes por un periodo de 12 meses durante el cual se practicaron radiografías de control (Rx) mensuales hasta los 6 meses y posteriormente a los 9 y 12 meses, y Tomografía computarizada (TC) a los 6 y 12 meses. Además, se usó el cuestionario de calidad de vida EUROQOL-5D a los 1, 3, 6, 9 y 12 meses, y se hicieron analíticas de control a los 1, 6 y 12 meses.

El tratamiento quirúrgico en todos los casos fue llevado a cabo por el mismo equipo de 3 especialistas en cirugía ortopédica y traumatología.

Todos los pacientes recibieron el mismo protocolo post operatorio analgésico consistente en:

- Primeras 48 horas post intervención quirúrgica: infusión continua mediante bomba analgésica elastomérica a 2ml / hora de ketorolaco 30mg (6 ampollas) y tramadol 100mg (8 ampollas). Rescates analgésicos con Paracetamol 1g endovenoso cada 8 horas si dolor.
- A las 48 horas post intervención quirúrgica: tratamiento vía oral administrándose el siguiente protocolo: Dexketoprofeno 25mg 1comp cada 8 horas, Paracetamol 1g 1comp cada 8 horas, Tramadol 50mg 1comp cada 8 horas si dolor.

Todos los sujetos intervenidos de pseudoartrosis en miembros inferiores recibieron profilaxis antitrombótica con Enoxaparina 40mg 1 inyección cada 24h que se inició al día siguiente de la cirugía.

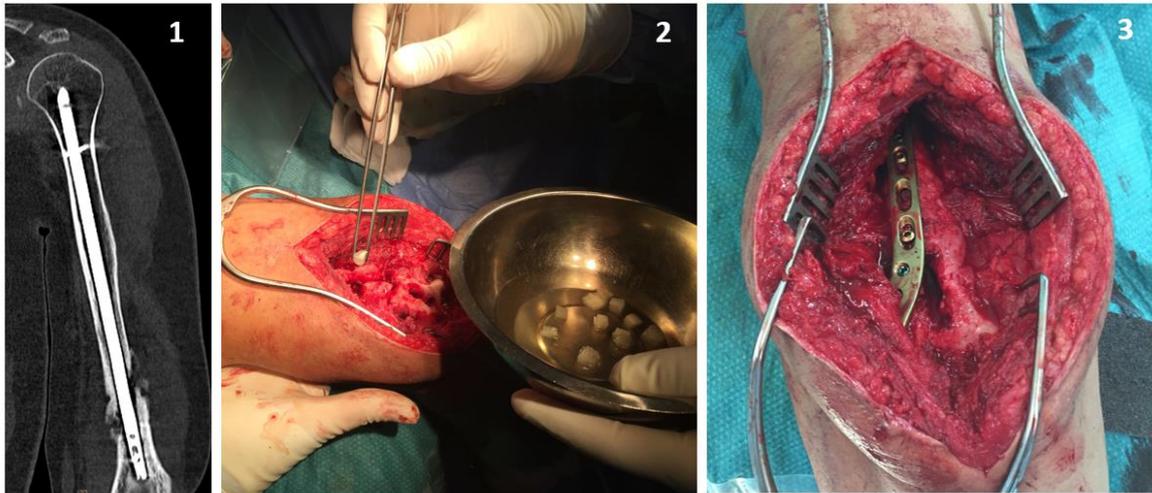


Figura 4: Paciente n° 2 del ensayo clínico N° EudraCT 2013-005025-23 asignado al grupo experimental. 1) Se trata de un varón de 47 años afecto de pseudoartrosis no hipertrófica diafisaria de húmero con clavo endomedular retrógrado diagnosticado por TC a los 9 meses tras la fractura. 2) Fue tratado mediante retirada de clavo endomedular, legrado del foco de pseudoartrosis y aporte de XCEL-MT-OSTEO-ALPHA®. Imagen intraoperatoria del foco de pseudoartrosis ya legrado y la aplicación en el mismo de los cubos de matriz ósea colonizada con células madre mesenquimales expandidas del propio paciente. 3) Re-osteosíntesis con placa lateral de humero distal. Fuente propia: Daniel Chaverri

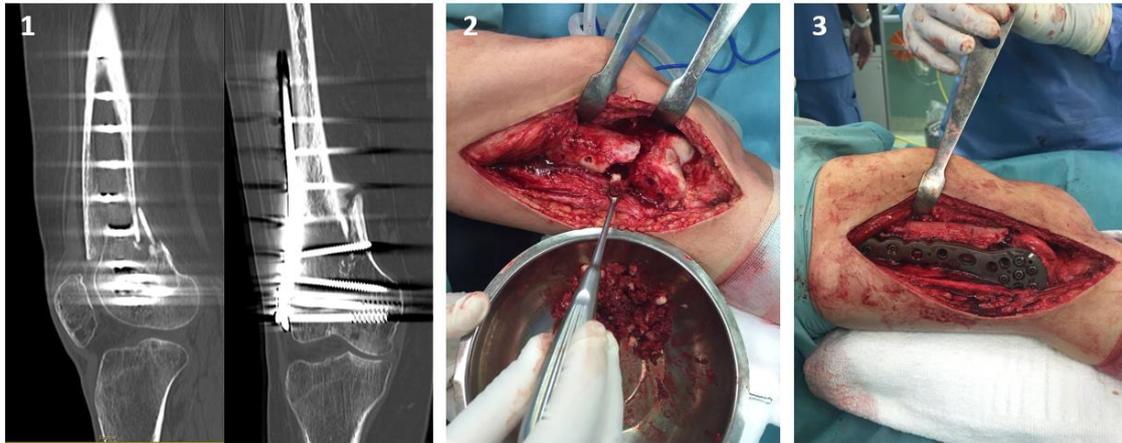


Figura 5: Paciente nº 7 del ensayo clínico Nº EudraCT 2013-005025-23 asignado al grupo control. 1) Se trata de una mujer de 44 años afectada de pseudoartrosis no hipertrófica de fémur con placa diagnosticado por TC a los 9 meses tras la fractura. 2) Fue tratada mediante retirada de la placa, legrado del foco de pseudoartrosis y aporte de injerto óseo autólogo obtenido de cresta iliaca. Imagen intraoperatoria del foco de pseudoartrosis ya legrado y la aplicación en el mismo de los chips de esponjosa de la cresta iliaca del propio paciente. 3) Re-osteosíntesis con placa lateral específica de fémur distal. Fuente propia: Daniel Chaverri.

Para la realización de nuestro estudio se realizaron analíticas adicionales para el análisis de los biomarcadores TGF-B1 y TGF-B2 a la: inclusión al estudio, 1 semana, 2 semanas, 1, 2, 3, 6 y 12 meses post intervención quirúrgica (Figura 6).

Los pacientes finalizaron la participación en el estudio a los 12 meses de seguimiento.

## 5.2. Esquema

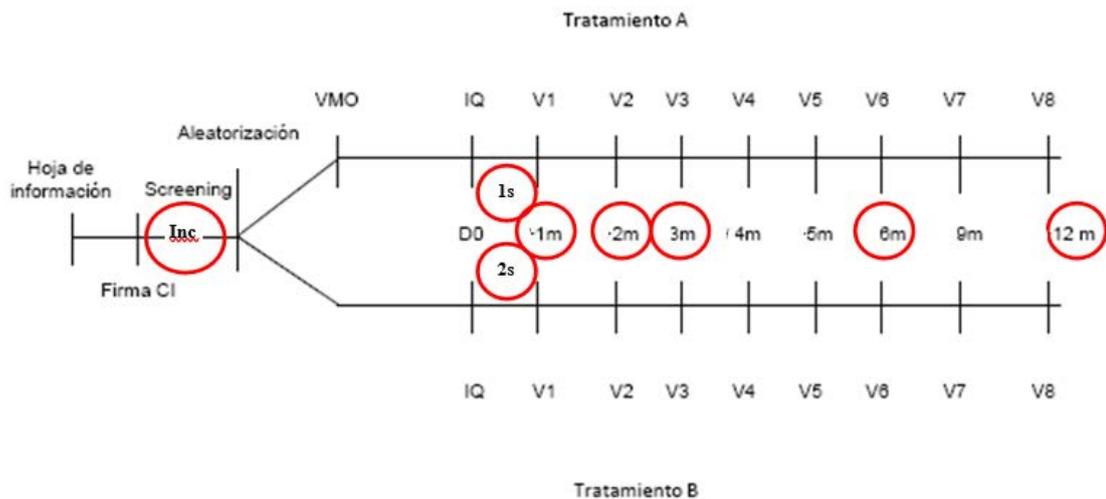


Figura 6: Se muestra el esquema del Ensayo Clínico. Los círculos rojos indican los momentos cronológicos en que se tomaron muestras sanguíneas para analizar los biomarcadores a estudio. Inc: Inclusión. 1s: 1semanas. 2s: 2semanas. 1m: 1mes. 2m: 2meses. 3m: 3meses. 6m: 6meses. 12m: 12meses.



## **5.5. Tamaño muestral**

Nuestra investigación se trata de un estudio piloto, no se realizó cálculo de tamaño muestral previo. Nos basamos en los pacientes incluidos en el ensayo clínico aleatorizado fase IIa N° EudraCT 2013-005025-23. El tamaño muestral en dicho ensayo se estableció en 20 pacientes siendo esta nuestra cohorte a estudio.

## **5.6. Criterios inclusión/exclusión**

### **5.6.1 Criterios de inclusión**

1. Pacientes de 18 a 65 años de edad.
2. Pseudoartrosis atrófica o hipotrófica diafisaria, metafisaria o metafisodiafisaria adquirida de huesos largos confirmada radiológicamente por TC a los 9 meses.
3. Consentimiento Informado por escrito del paciente.
4. El paciente es capaz de entender la naturaleza del estudio.

### **5.6.2 Criterios de exclusión**

1. Sospecha de proceso séptico activo en la zona de pseudoartrosis diagnosticado por clínica y analítica.
2. Pacientes que presenten serología positiva frente a HIV (Anti-HIV I/II-Ac), Hepatitis B (HBsAg, HBcAc), Hepatitis C (Anti-HCV-Ac) o Lúes (TP-Ac).
3. Análisis hematológicos y bioquímicos con alteraciones significativas que contraindiquen la participación en el estudio.
4. Mujeres embarazadas o mujeres sin cobertura anticonceptiva eficaz (\*), y mujeres en periodo de lactancia.
5. Fumador activo
6. Enfermedades congénitas óseas (hipofosfatemia), enfermedad metabólica ósea asociada con hipoparatiroidismo primario o secundario.
7. Diabetes mellitus mal controlada
8. Diagnóstico de enfermedad vascular periférica arterial.
9. Irradiación terapéutica previa (5 años anteriores) del hueso afectado.
10. Enfermedad neoplásica detectada en los últimos cinco años o sin remisión completa.
11. Paciente legalmente dependiente.
12. 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.

13. Otras patologías o circunstancias que puedan comprometer la participación del paciente en el estudio según criterio médico.
14. Negación del paciente a ser seguido por un periodo que excede el ensayo clínico en sí.

(\*) Los métodos anticonceptivos eficaces que se contemplan en el protocolo son los hormonales, el dispositivo intrauterino (DIU), los métodos de barrera y la esterilización voluntaria.

### **5.6.3 Criterios de retirada de los pacientes y procedimientos a seguir**

Los pacientes pudieron abandonar el estudio en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación.

Se contempló retirar los pacientes del estudio por los siguientes motivos:

1. Pacientes asignados al tratamiento A que presenten serología positiva.
2. Presentar acontecimientos adversos que afectan la participación en el estudio.
3. Deseo expreso de no continuar (retirada del consentimiento) por cualquier motivo.
4. Violación del protocolo con desviación significativa de los procedimientos específicos del estudio.
5. Pérdida de seguimiento.
6. Aparición de una enfermedad intercurrente clínicamente significativa que afecte a la participación en el estudio.
7. El investigador considera que es beneficioso para el paciente retirarlo del estudio.

### **5.7. Variables de análisis**

**Variable principal:** Niveles plasmáticos de TGFB-1 y TGFB-2 medidos en pg/ml.

**Variable secundaria:** Consolidación ósea radiológica valorada mediante Tomografía Computerizada (TC) a los 6 y 12 meses. El análisis de los resultados radiológicos ha sido llevado a cabo por un médico especialista en radiodiagnóstico cegado que desconoce la identidad del paciente y el tratamiento llevado a cabo con el mismo. La determinación de consolidación ósea se realizó mediante la aplicación de la Tomographic Union Score (TUS) (30) (27). El punto de corte para considerar consolidación ósea fueron los 11 puntos (mínimo 4 puntos / máximo 16 puntos). A pesar de disponer de radiografías simples se descartó evaluar el resultado final mediante la

aplicación de la Radiographic Union Score modificada debido a la distorsión que en la aplicación de la misma genera la existencia de material de osteosíntesis en formato placa (28).

Además, se cuantificó la consolidación ósea del área de pseudoartrosis mediante la medición de Unidades Hounsfield estableciéndose un porcentaje global de regeneración ósea en la zona de pseudoartrosis.

## **5.8. Métodos diagnósticos y de evaluación empleados**

### **5.8.1 Diagnóstico de pseudoartrosis no hipertrófica**

El diagnóstico de la pseudoartrosis se realizó mediante radiología simple y TC, clasificándose la pseudoartrosis por:

- Localización: metafisaria, diafisaria o metafisodiafisaria
- Anatomía del callo: atrófica o hipotrófica. Se excluyeron aquellos casos en que la anatomía fue hipertrófica o en “pata de elefante”.
- Gravedad y evolución: sin pérdida de sustancia ósea, con pérdida de sustancia ósea <1 cm. Se excluyeron aquellos casos con defecto óseo >1cm.
- Tiempo de evolución desde la fractura, el cual debía ser superior a los 9 meses.

### **5.8.2 Evaluación diagnóstica por la imagen**

La evaluación de la consolidación ósea por imagen se realizó mediante radiografía simple y TC.

- Radiografía (Rx) simple: anteroposterior y lateral, y oblicuas si se precisaran.
- TC Multicorte con 32 coronas x2 tubos con software para sustracción digital y control de dosis. Siemens Somatom Sensation 64. Software Syngo CT 2006<sup>a</sup>. Los parámetros de adquisición de las imágenes de TC para minimizar los artefactos producidos por el material ortopédico metálico son los siguientes:

Colimación (mm)	64 x 0,625
Kilovoltaje pico	140
Miliamperaje/seg	275-500
Filtro de reconstrucción	Partes blandas
Grosor de corte (mm)	2 o 3
Escala de tac expandida	Hasta 40.000 UH

Datos recogidos en Rx a los 6 y 12 meses:

- 1) Posicionamiento y estado correcto del material de osteosíntesis
- 2) Puntuación en la Radiographic Union Score modificada (RUS) (27)
  - RUS  $\geq 11$  consolidación ósea radiológica.
  - RUS  $< 11$  ausencia de consolidación ósea radiológica

Evaluación de la consolidación ósea por TC a los 6 y 12 meses:

- 1) Puntuación en la Tomographic Unión Score (TUS):

La medición se realizó observando las 4 corticales y se dio una puntuación en función de la presencia/ausencia y cantidad del callo óseo (Figura 8).

En función del resultado obtenido y basándonos en lo descrito por Perlepe et al (30) y Litrenta et al (27) evaluamos de la siguiente forma:

- TUS  $\geq 11$  consolidación ósea radiológica.
- TUS  $< 11$  ausencia de consolidación ósea radiológica

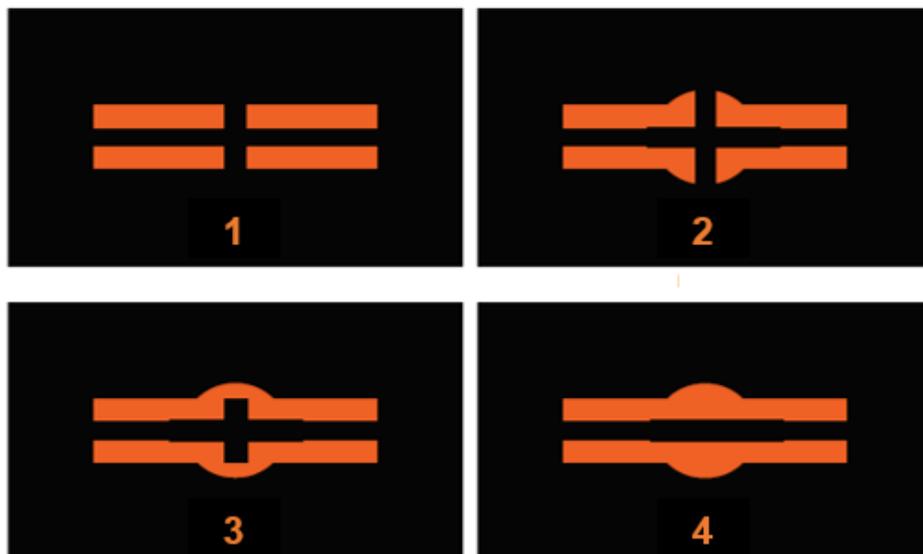


Figura 8: Muestra la puntuación en la escala RUS modificada y TUS según la ausencia/presencia y cuantía del callo óseo. 1) Línea de fractura visible y sin formación de callo óseo. 2) Fractura con formación de callo óseo y línea de fractura visible. 3) Puentes óseos que unen los dos extremos, pero línea de fractura todavía visible. 4) Callo completo sin visibilidad de la línea de fractura. Fuente: Leow et al 2016 (26)

## 2) Cuantificación de la regeneración ósea

La medición se realizó de la siguiente forma (Figura 9):

- Se utilizó una región ósea de interés (ROI) lo más pequeña posible (6-7 mm) para evitar el efecto de "volumen parcial" y medir la densidad del área de consolidación en Unidades Hounsfield (UH).
- Se tomaron medidas de la cortical normal, unos 4 cm por arriba o debajo de la zona afectada: éste es el valor de referencia "normal" para el paciente.
- Se tomaron mediciones en UH en el foco de pseudoartrosis en las áreas de densidad intermedia en cada uno de los cuatro cuadrantes: anterior, posterior, medial y lateral.
- Se cuantificó el porcentaje de consolidación en cada uno de los cuadrantes respecto a la cortical sana y se estableció un porcentaje de consolidación global en función de la media de dichos cuadrantes.
- Las mediciones se realizaron fuera de las zonas con artefacto debido a la presencia de material metálico de osteosíntesis.
- Se graficaron las áreas de medición para poder compararlas con los estudios de control posterior.

Los resultados de la medición de UH con el ROI, se expresan de la siguiente forma:

Para la cortical sana en el ROI seleccionado:

- Valor máximo en UH:
- Valor mínimo en UH:
- Media de ambos valores en UH
- Desviación Standard
- Área estudiada dentro del ROI medida en mm<sup>2</sup>

Para la región de pseudoartrosis en los ROI seleccionados en cada uno de los cuadrantes (anterior / posterior / medial / lateral):

- Valor máximo en UH:
- Valor mínimo en UH:
- Media de ambos valores en UH:
- Desviación Standard
- Área estudiada dentro del ROI medida en mm<sup>2</sup>
- % de consolidación respecto a la cortical sana

Para la región de pseudoartrosis en global:

- % global de consolidación obtenido de la media de % de consolidación de los 4 cuadrantes.



Figura 9: Ejemplo de medición en uno de los pacientes sometidos a estudio en TC a los 12 meses afecto de pseudoartrosis atrófica diafisaria de húmero tratada mediante recambio de material de osteosíntesis y XCEL-MT-OSTEO-ALPHA®. Imagen A) Plano sagital. El punto o ROI 1 se establece como punto de referencia en cortical sana. Los puntos o ROIs 2 y 3 de las corticales anterior y posterior corresponden a los lugares donde se cuantifica la regeneración ósea. Imagen B) Plano coronal. Los puntos o ROIs 1 y 2, de las corticales lateral y medial, corresponden a los lugares donde se cuantifica la regeneración ósea.

### 5.8.3 Evaluación TGF-B1 y TGF-B2

#### 5.8.3.1 Obtención, manejo y almacenamiento de la muestra

Todas las muestras se obtuvieron con el consentimiento informado del paciente (Ver Anexo I).

El protocolo para la obtención, manejo y almacenamiento de la muestra se ajustó lo máximo posible a las recomendaciones dadas por Zhao et al (62) minimizando así los errores que podrían derivarse de una incorrecta manipulación de la muestra. Se extrajeron muestras sanguíneas de sangre periférica en los momentos cronológicos indicados en los apartados 5.2 y 5.3. Todas las extracciones se realizaron por la mañana con el paciente en ayunas.

- 1) Obtención mediante venoclisis de una muestra sanguínea periférica utilizando un tubo recolector con anticoagulante (1.6mg EDTA/mL).
- 2) Enfriamiento de la muestra durante al menos 15 minutos en un Cool Transport Container que debe estar previamente en congelador durante al menos 12h a -20°C (Ver Figura 10). La muestra fue introducida en el Cool Transport Container inmediatamente después de la venoclisis.
- 3) Posteriormente se procedió a la centrifugación de la muestra a 2500g durante 10 minutos. La centrifugación se realizó utilizando la centrifugadora modelo NAHITA 2690/s.
- 4) Tras la centrifugación, se recogió 1cc de la parte más superficial (1/3 superior) del plasma obtenido que es el que menor probabilidad tiene de contener unidades celulares, y se almacenó en un criotubo en congelador a -40°C provisionalmente.
- 5) Etiquetado del criotubo.
- 6) Posteriormente se trasladó cada muestra al Banc de Sang i Teixits (BST) donde se almacenó en un ultracongelador a -80°C hasta el momento de su análisis. La muestra se transportó usando la valija interna que tiene nuestro hospital con el BST utilizando una caja de poliespan con nieve carbónica que garantiza una temperatura de -30°C.

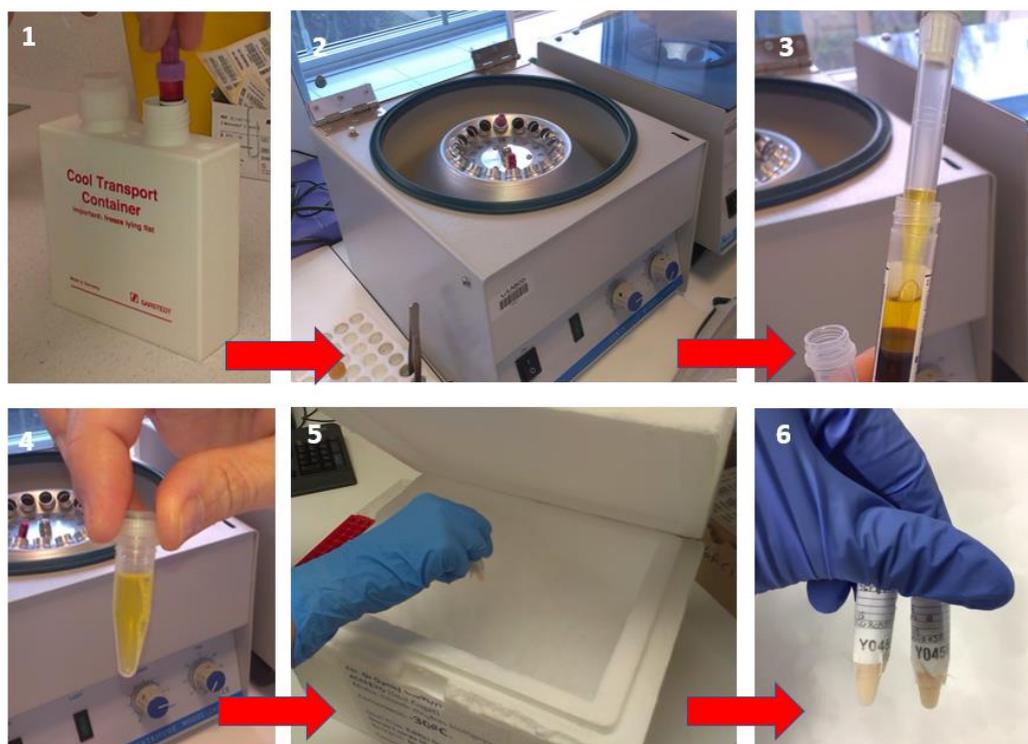


Figura 10: Diversos momentos durante el manejo de la muestra sanguínea una vez extraída del paciente. 1) Enfriamiento del tubo EDTA con la muestra sanguínea en el Cool Transporter 2) Centrifugación de la muestra 3) Imagen de la muestra ya centrifugada donde se observa la parte superior rica en plasma, la inferior rica en células denominada "buffy coat". Extracción mediante pipeta de la capa más superficial. 4) Obtención y almacenamiento del plasma en un criotubo 5) Transporte en caja de poliespán con nieve carbónica al Banc de Sang i Teixits 6) Imagen de dos muestras etiquetadas en el momento de ser recibas en el BST previo criopreservación.

La extracción, manipulación y centrifugación de la muestra fue llevada a cabo siempre por el mismo equipo de personal de laboratorio de nuestro hospital que fue instruido previamente en el protocolo a seguir.

Las muestras se trasladaron del Hospital Asepeyo Sant Cugat al Banc de Sang i Teixits utilizando la valija interna semanal establecida entre ambas instituciones.

### 5.8.3.2 Análisis de la muestra

Las muestras se analizaron mediante ensayo luminométrico múltiple (Multiplex) usando la tecnología xMap Bio Plex Pro® TGF-B inmunoassay (Bio-Rad). Esta técnica se basa en la unión a la molécula estudiada de 2 complejos de anticuerpos, uno de ellos unido a un bead magnético y otro a una molécula de streptavidin-phycoerythrin que emite fluorescencia (Figura 11). El complejo queda fijado por diferencia de cargas magnéticas a la base de las celdillas del kit y la fluorescencia es medida por un citómetro de flujo láser. Los datos extraídos son analizados por un procesador digital que nos cuantificará la molécula a estudio existente en las muestras, en este caso TGF-B1 y B2 en pg/ml.

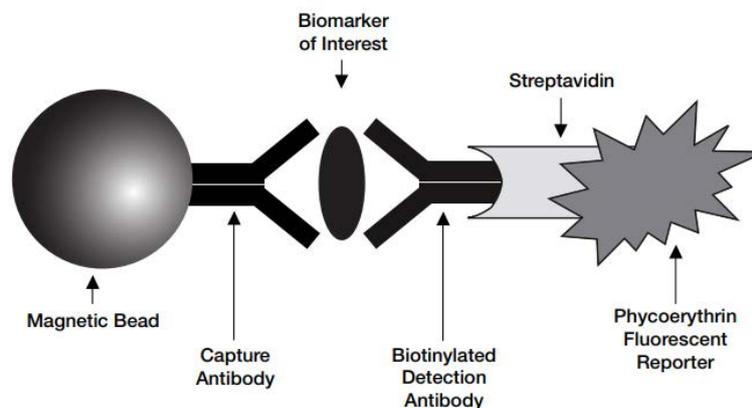


Figura 11. Ensayo luminométrico multiple (Multiplex) Se observa esquemáticamente el complejo formado emisor de fluorescencia y con carga magnética. Fuente: Instruction Manual of Bio-Plex Pro TGF-B Assay BIO RAD.

El análisis de todas las muestras se llevó a cabo en las instalaciones del BST. La totalidad de ellas se analizaron por el mismo equipo de personas (un biotecnólogo del BST y el médico autor de esta tesis) en el mismo periodo de tiempo (entre Diciembre de 2018 y Enero de 2019) para evitar en lo posible sesgos en la medición de resultados.

Previo al análisis y tras la descongelación de las muestras se realizó una nueva centrifugación de estas a 10000g durante 15 minutos a 4°C. Las muestras se conservaron en hielo en todo momento. Se utilizó el kit Bio-Plex Pro TGF-B Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) para el análisis de las 3 isoformas de TGF-B: B1, B2 y B3 usando el procesador Luminex 100IS analyzer (Luminex Corp. Austin, TX, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El análisis de datos se llevó a cabo con el software Bioplex Manager v6.1 (Bio-Rad Laboratories Inc.) (63) (64). Ver Figura 12.



Figura 12: Diversos momentos del procedimiento de análisis de las muestras. 1) Extracción de las muestras de plasma de los criotubos 2) Formación de los complejos enzima-inmunofluorescentes 3) Adhesión de los complejos a la placa de análisis y procedimiento de los diversos lavados necesarios 4) Placa de análisis con 96 celdillas preparada para el análisis 5) Laser citómetro de flujo y procesador digital emisor de los resultados finales.

## 5.9 Análisis estadístico

Se comprobó la distribución normal o no de cada una de las variables mediante el test Shapiro-Wilk.

Para la comparación en los diferentes momentos cronológicos de los valores de TGF-B1 y TGF-B2 entre los dos grupos a estudio (consolidación / no consolidación y XCEL/injerto cresta) se utilizó

el test no paramétrico para muestras independientes U Mann-Whitney. Los datos fueron presentados en medias +/- desviación standard.

Para establecer la correlación entre generación ósea en base a % UH y los niveles de TGF-B1 y TGF-B2, así como como la correlación entre %UH y TUS a los 12 meses, se utilizó el test no paramétrico para muestras independientes Rho-Spearman.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS 15.0 estableciéndose un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### **5.10 Aspectos éticos**

Para el presente estudio se obtuvo la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC idcsalud a Catalunya) con código de protocolo XCEL-PSART-01 el día 31 de Enero de 2014 (Ver Anexo II).

Según lo establecido, se han respetado los principios éticos de la Declaración de Helsinki para las investigaciones médicas en seres humanos adoptada por la 64ª Asamblea de Fortaleza, Brasil Octubre 2013.

Todos los pacientes accedieron a la realización del ensayo clínico y a la extracción de muestras sanguíneas previa firma de consentimiento informado. (ver Anexo I).

## **6. RESULTADOS**



## 6.1 Descripción de la muestra

En la siguiente tabla se describen las variables más relevantes de cada sujeto a estudio.

Descripción de los pacientes a estudio								
Nº	Sexo	Edad	Hueso	Clasificación AO	Estado partes blandas	Tratamiento inicial	Aporte biológico	Recambio material
1	V	55	Húmero	12 A1	OK	Clavo	Injerto	No
2	V	47	Húmero	12 A1	OK	Clavo	XCEL	Si: Placa
3	V	51	Fémur	33 A3	OK	Placa	XCEL	Si: Clavo
4	V	40	Fémur	33 C2	OK	Placa	Injerto	Si: Clavo
5	V	36	Húmero	12 B2	OK	Clavo	XCEL	No
6	V	59	Cubito	2 U2A	OK	Placa	Injerto	No
7	M	44	Fémur	33 B2	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
8	V	42	Tibia	41 A2	OK	Placa	XCEL	No
9	V	38	Húmero	12 A3C	OK	Placa	XCEL	No
10	V	52	Tibia	42 A3B	OK	Placa	Autoexclusión	
11	V	44	Tibia	43 A2.3	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
12	V	55	Tibia	41 C1	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
13	M	59	Húmero	12 A2	OK	Clavo	Injerto	Si: Clavo
14	V	51	Tibia	42 C3	OK	Clavo	Injerto	Si: Placa
15	V	24	Fémur	32 B2	OK	Clavo	XCEL	No
16	M	47	Húmero	12 A3C	OK	Clavo	XCEL	No
17	V	50	Tibia	42 B2	OK	Clavo	Injerto	No
18	V	42	Tibia	42 B2	OK	Clavo	XCEL	No
19	V	60	Tibia	42 C2	OK	Clavo	XCEL	Si: Clavo
20	V	62	Tibia	42 C2	OK	Clavo	Injerto	Si: Placa

Tabla V Descripción breve de los pacientes a estudio. V: Varón/M: Mujer. \*Se muestra el tipo de fractura basándose en la clasificación de la AO Foundation (65). XCEL: XCEL-MT-OSTEO-ALPHA® (células madre mesenquimales autólogas expandidas ex vivo colonizadas en matriz esponjosa ósea alogénica procedente de banco de tejidos).

Se obtuvo una muestra con 20 pacientes: 17 hombres (85%), 3 mujeres (15%), con una edad media de 47,9 +/- 9,4 años. El tratamiento inicial de la fractura fue mediante clavo endomedular (EM) en el 55% de los casos y mediante placa de osteosíntesis en el 45%. Reseñar que el paciente nº 10, tras firmar consentimientos informados, rechazó participar en el estudio por lo que salió del mismo y por tanto del análisis, no reponiéndose dicho paciente. Como tratamiento de la pseudoartrosis en 10 casos se recambio el material (52,6%) y en 9 casos se mantuvo el implante (47,4%). La decisión de que aporte biológico utilizar fue asignado de manera aleatoria (según protocolo del ensayo clínico N°EudraCT 2013-005025-23) implantándose en 10 casos injerto autólogo de cresta iliaca (52,6%) y en 9 casos XCEL-MT-OSTEO-ALPHA® (células madre expandidas ex vivo del propio paciente) (47,4%).

A priori podemos considerar la muestra globalmente como homogénea por el hecho de pertenecer a un ensayo clínico aleatorizado con criterios de exclusión/inclusión muy restrictivos (fase IIa).

Los pacientes de nº 4 y nº 8 salieron del estudio por presentar acontecimientos adversos, infección en ambos casos. De esta forma nuestra n final para el análisis de resultados fue de 17 pacientes.

## 6.2 Resultados radiológicos

A continuación, se expone en la tabla VI los resultados de la escala RUS y TUS a los 6 y 12 meses. El criterio que se definió para dar como consolidación radiológica es el de un TUS igual o mayor a 11 puntos en el mes 12. En la tabla se indican en verde las puntuaciones que se consideran consolidación según la escala RUS y TUS y en rojo los no consolidados. En gris los pacientes que salieron del estudio bien por decisión propia o por acontecimientos adversos. Los pacientes 9 y 14 no llegaron a completar el estudio por romperse el material de osteosíntesis dada la no consolidación de la pseudoartrosis. Ambos casos sí que se incluyeron para el análisis estadístico.

Paciente	6 mes		12 mes	
	RUS	TUS	RUS	TUS
1	7	4	10	6
2	15	14	16	14
3	7	5	8	6
4				
5	11	9	15	16
6	12	12	12	16
7	14	12	12	12
8				
9	6	7	0	0
10				
11	10	11	13	13
12	9	7	11	10
13	11	11	15	14
14	0	0	0	0
15	11	7	13	10
16	8	7	7	7
17	12	9	12	11
18	9	7	12	10
19	11	8	12	11
20	13	11	16	14

Tabla VI: Muestra la puntuación obtenida tras la aplicación de la escala RUS y TUS a los 6 y 12 meses.

## 6.3 División de la muestra y análisis de resultados

Excluyendo del análisis los 2 pacientes que sufrieron acontecimientos adversos y el paciente que se autoexcluyó al inicio del estudio, se analizaron 17 pacientes. Esto implicaba un total de 136 muestras sanguíneas. El porcentaje de valores perdidos del conjunto global de muestras analizadas fue de un 3,67% (5 muestras), consiguiéndose una cumplimentación y seguimiento del 96,3%.

### 6.3.1 Respuesta al objetivo secundario a) y c)

Se dividió la cohorte en 2 grupos según criterios de consolidación radiológica en base a la escala TUS como muestra la tabla VII.

Se analizaron ambos grupos no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en términos de edad, hueso afecto, tratamiento inicial, tipo de aporte biológico y realización de cambio de material o no. Por lo que podemos dar a ambos grupos por homogéneos y por tanto comparables.

División de los pacientes en función de la consolidación ósea								
Nº	Sexo	Edad	Hueso	Clasificación AO	Estado partes blandas	Tratamiento Inicial	Aporte biológico	Recambio material
1	V	55	Húmero	12 A1	OK	Clavo	Injerto	No
3	V	51	Fémur	33 A3	OK	Placa	XCEL	Si: Clavo
9	V	38	Húmero	12 A3C	OK	Placa	XCEL	No
12	V	55	Tibia	41 C1	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
14	V	51	Tibia	42 C3	OK	Clavo	Injerto	Si: Placa
15	V	24	Fémur	32 B2	OK	Clavo	XCEL	No
16	M	47	Húmero	12 A3C	OK	Clavo	XCEL	No
18	V	42	Tibia	42 B2	OK	Clavo	XCEL	No
2	V	47	Húmero	12 A1	OK	Clavo	XCEL	Si: Placa
5	V	36	Húmero	12 B2	OK	Clavo	XCEL	No
6	V	59	Cubito	2 U2A	OK	Placa	Injerto	No
7	M	44	Fémur	33 B2	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
11	V	44	Tibia	43 A2.3	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
13	M	59	Humero	12 A2	OK	Clavo	Injerto	Si: Clavo
17	V	50	Tibia	42 B2	OK	Clavo	Injerto	No
19	V	60	Tibia	42 C2	OK	Clavo	XCEL	Si: Clavo
20	V	55	Húmero	12 A1	OK	Clavo	Injerto	No

Tabla VII: Se muestran los pacientes sometidos a análisis final y divididos en función de la consolidación radiológica final medida por TUS. En rojo sin alcanzar la consolidación. En verde los consolidados.

Todas las variables analizadas siguen una distribución normal excepto: TGF-B1\_1s, TGF-B1\_3m, TGF-B1\_6m, TGF-B2\_1m, TGF-B2\_12m. Debido a esto y a que nuestra n es inferior a 30 utilizamos tests no paramétricos para nuestro análisis estadístico.

Se utilizó el test no paramétrico para muestras independientes U Mann-Whitney encontrándose únicamente diferencias estadísticamente significativas en el mes 12 (p 0,005) para TGF-B1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para TGF-B2. Ver Figuras 13 y 14.

Los valores medios totales de TGF-B1 en el grupo de consolidación fueron de 17724+/-5728 pg/ml. Los valores medios totales de TGF-B1 en el grupo de no consolidación fueron de 13730+/-5873 pg/ml.

Los valores medios totales de TGF-B2 en el grupo de consolidación fueron de 449,6+/-98,5 pg/ml. Los valores medios totales de TGF-B2 en el grupo de no consolidación fueron de 417+/-87 pg/ml

### TGF-B1 vs Consolidación RADIOLOGICA

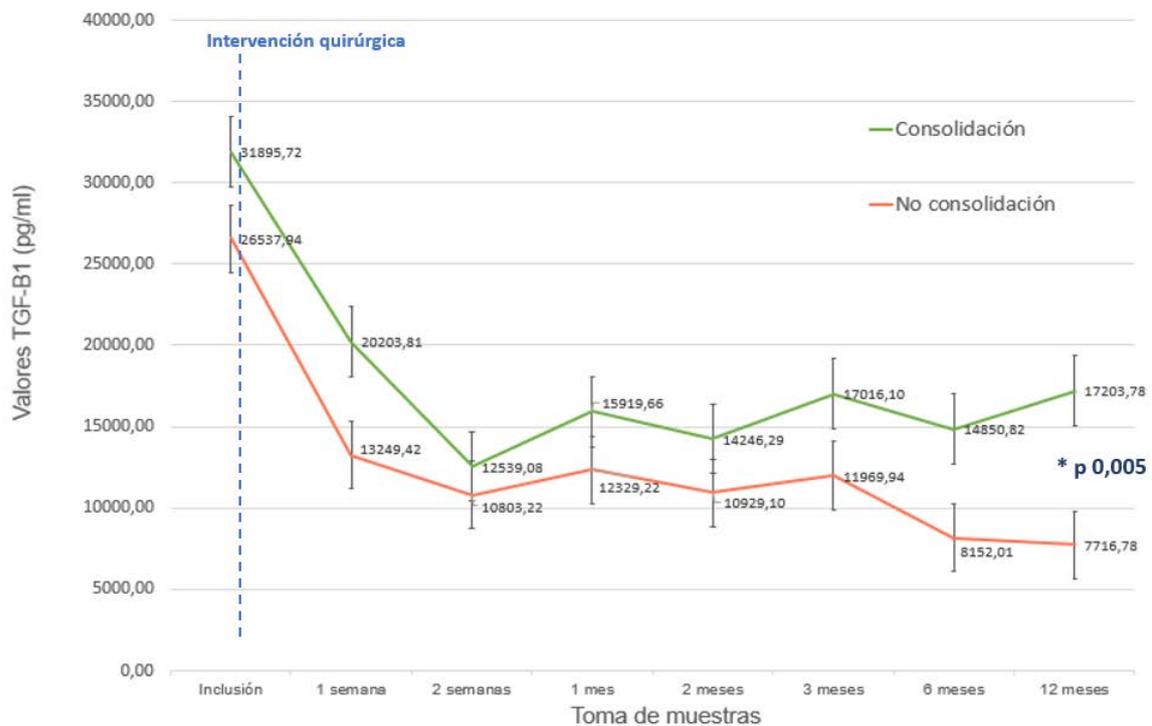


Figura 13: Gráfica que muestra las curvas de TGF-B1 medido en los diversos momentos cronológicos con la muestra dividida en función de la consolidación ósea. Los resultados se muestran en valores medios (pg/ml). Se muestran barras de error.

\* punto donde existen diferencias significativas entre los dos grupos.

### TGF-B2 vs Consolidación Radiológica

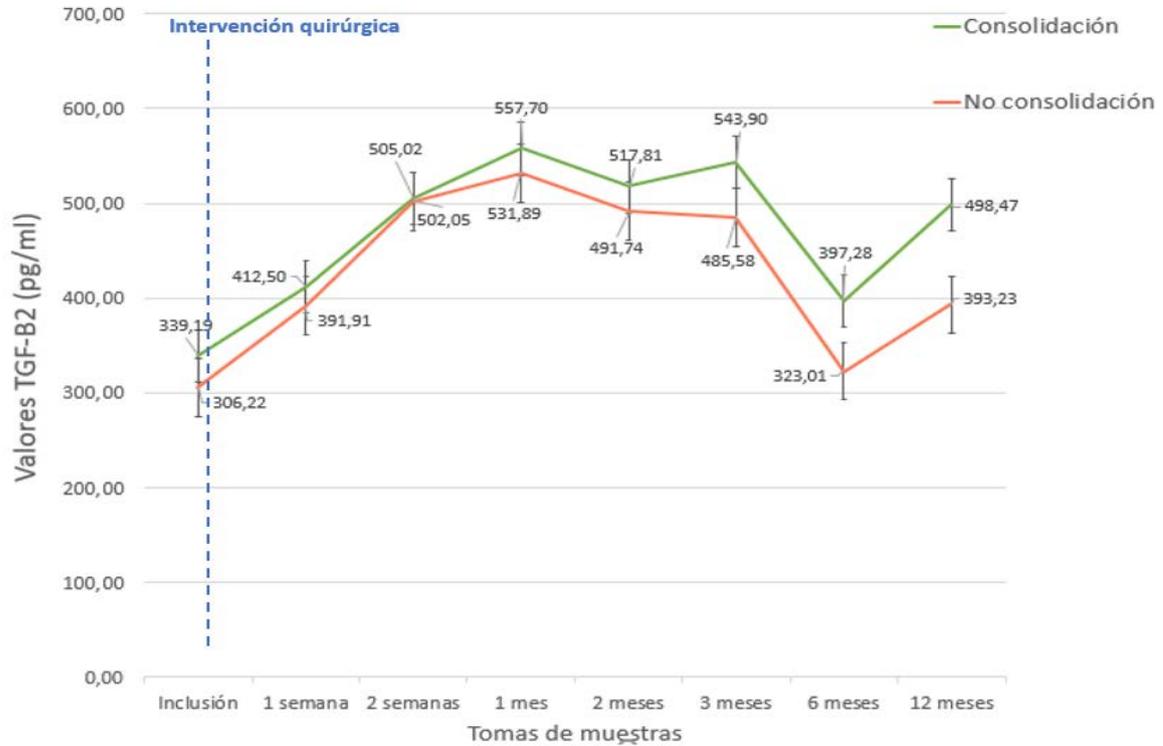


Figura 14: Gráfica que muestra las curvas de TGF-B2 medido en los diversos momentos cronológicos con la muestra dividida en función de la consolidación ósea. Los resultados se muestran en valores medios (pg/ml). Se muestran barras de error. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún punto.

En la tabla VIII comparamos el resultado de la escala TUS con la regeneración ósea medida por UH según nuestro método descrito en el apartado 5.8.2. Se muestran en rojo los pacientes que la escala TUS (<11) no da por consolidados. Se muestran en verde los sujetos que la tabla TUS ( $\geq 11$ ) da por consolidados. Todos los pacientes consolidados por la escala TUS han presentado una regeneración ósea igual o superior al 50%, estableciéndose una correlación lineal entre ambos valores fuerte, Rho Spearman 0,961 (p 0,001).

Se analizó la asociación entre generación ósea en % UH y la correlación que esta tiene con los niveles de TGF-B1 y TGFB2 mediante el test estadístico Rho Spearman hallándose únicamente diferencias estadísticamente significativas en el mes 12 para TGF-B1: Rho Spearman 0,754 (p 0,02).

Correlación TUS / %UH			
Nº pte	TUS	%UH	Rho Spearman
1	6	19,07	0,961 (p 0,001)
2	14	59,45	
3	6	10,87	
5	16	67,70	
6	16	92,75	
7	12	49,97	
9	.	.	
11	13	51,97	
12	10	36,20	
13	14	59,65	
14	.	.	
15	10	44,60	
16	7	33,37	
17	11	58,75	
18	10	46,75	
19	11	59,22	
20	14	66,77	

Tabla VIII Correlación TUS y cantidad de regeneración ósea.

### 6.3.2 Respuesta al objetivo secundario b)

Se dividió la cohorte en 2 grupos según tratamiento aplicado XCEL-MT-OSTEO-ALPHA® o Injerto de cresta iliaca quedando de la siguiente manera (Tabla IX).

División de los pacientes en función del tratamiento recibido								
Nº	Sexo	Edad	Hueso	Clasificación AO	Estado partes blandas	Tratamiento Inicial	Aporte biológico	Recambio material
2	V	47	Húmero	12 A1	OK	Clavo EM	XCEL	Si: Placa
3	V	51	Fémur	33 A3	OK	Placa	XCEL	Si: Clavo
5	V	36	Húmero	12 B2	OK	Clavo	XCEL	No
9	V	38	Húmero	12 A3C	OK	Placa	XCEL	No
15	V	24	Fémur	32 B2	OK	Clavo EM	XCEL	No
16	M	47	Húmero	12 A3C	OK	Clavo EM	XCEL	No
18	V	42	Tibia	42 B2	OK	Clavo EM	XCEL	No
19	V	60	Tibia	42 C2	OK	Clavo EM	XCEL	Si: Clavo
1	V	55	Húmero	12 A1	OK	Clavo EM	Injerto	No
6	V	59	Cubito	2 U2A	OK	Placa	Injerto	No
7	M	44	Fémur	33 B2	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
11	V	44	Tibia	43 A2,3	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
12	V	55	Tibia	41 C1	OK	Placa	Injerto	Si: Placa
13	M	59	Humero	12 A2	OK	Clavo EM	Injerto	Si: Clavo
14	V	51	Tibia	42 C3	OK	Clavo EM	Injerto	Si: Placa
17	V	50	Tibia	42 B2	OK	Clavo EM	Injerto	No
20	V	62	Tibia	42 C2	OK	Clavo EM	Injerto	Si: Placa

Tabla IX en que se muestran los pacientes sometidos a análisis final y divididos en función de la asignación a tratamiento. En azul recibieron XCEL-MT-OSTEO-ALPHA®. En naranja recibieron injerto de cresta iliaca.

Se analizaron ambos grupos no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en términos de hueso afecto, tratamiento inicial, tipo de aporte biológico y realización de cambio de material o no. Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución por edad ( $p 0,048$ ). Este dato lo creemos poco relevante dado que nos movemos en una franja de edad de población joven (18-65 años) por lo que podemos dar a ambos grupos por homogéneos y comparables.

Se utilizó el test no paramétrico para muestras independientes U Mann-Whitney. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para TGF-B1 y TGF-B2 en ninguno de los puntos de análisis. Ver Figuras 15 y 16.

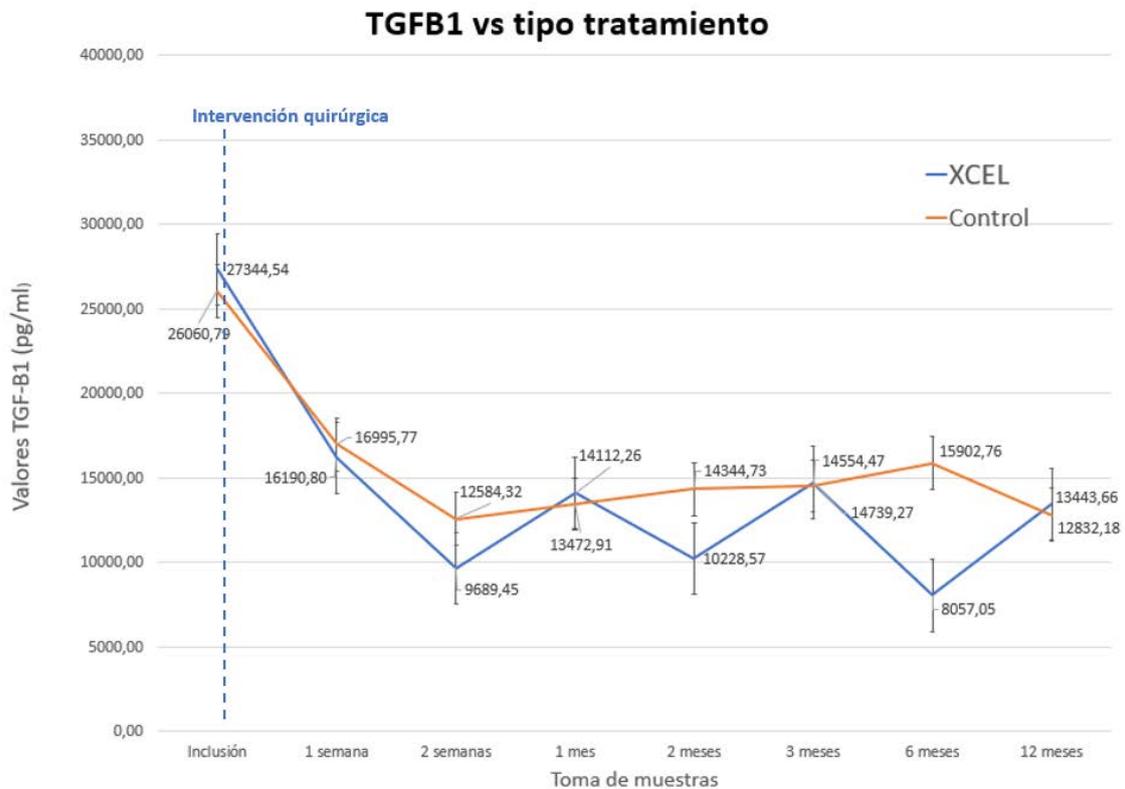


Figura 15: Gráfica que muestra las curvas de TGF-B1 medido en los diversos momentos cronológicos con la muestra dividida en función del tipo de tratamiento previo realizado. Aporte biológico: XCEL-MT-OSTEO-ALPHA® vs Injerto de cresta iliaca. Los resultados se muestran en valores medios (pg/ml). Se muestran barras de error. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún punto.

### TGF-B2 vs tipo de tratamiento

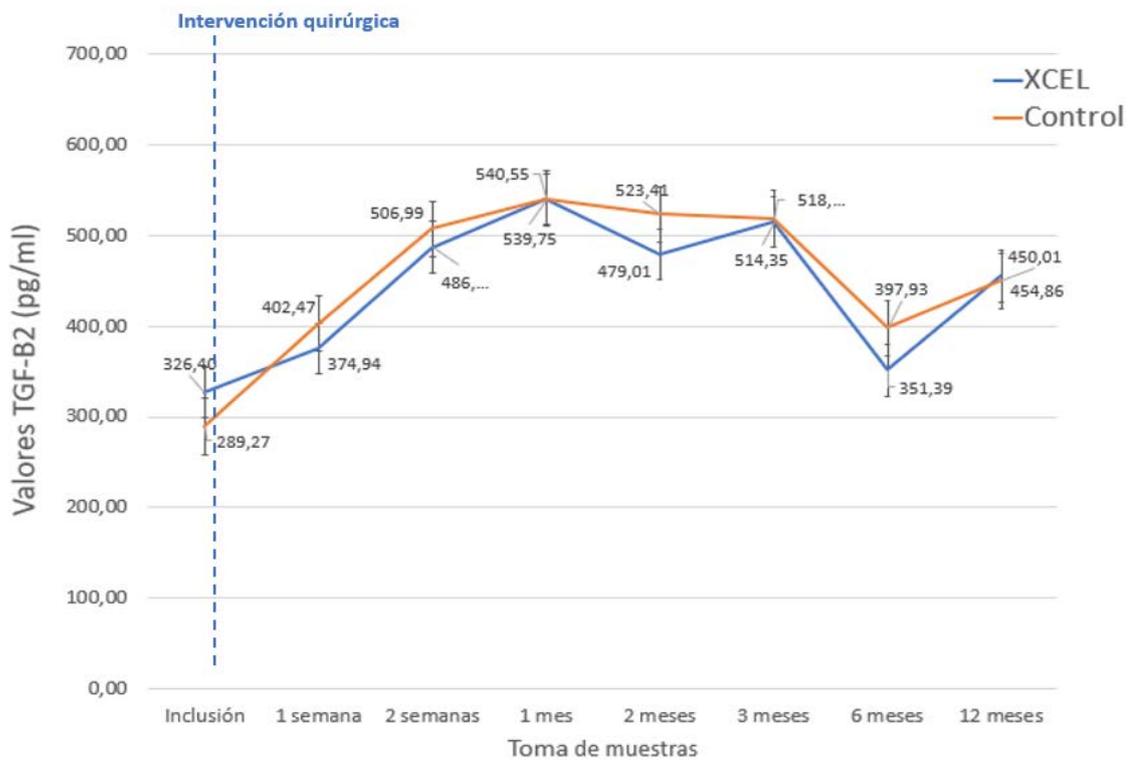


Figura 16: Gráfica que muestra las curvas de TGF-B2 medido en los diversos momentos cronológicos con la muestra dividida en función del tipo de tratamiento previo realizado. Aporte biológico: XCEL-MT-OSTEO-ALPHA® vs Injerto de cresta iliaca. Los resultados se muestran en valores medios (pg/ml). Se muestran barras de error. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún punto.

### 6.3.3 Respuesta al objetivo principal. Descripción de la curva

Los resultados basales de la muestra son los siguientes:

Valor medio de TGF-B1 al momento de inclusión (con los 20 pacientes incluidos): 26.702,4 +/- 14537 pg/ml

Valor medio de TGF-B1 al momento de inclusión (con los 17 pacientes a estudio): 29.374,4 +/- 14039 pg/ml

Valor medio de TGF-B2 al momento de inclusión (con los 20 pacientes incluidos): 307,8 +/-83,1

Valor medio de TGF-B2 al momento de inclusión (con los 17 pacientes a estudio): 323,7 +/- 73,5 pg/ml.

### **6.3.3.1 Curva descrita por TGF-B1**

Destaca como los niveles más altos de TGF-B1 son los iniciales tanto para el grupo de pacientes que alcanzan la consolidación como para los que no. Ver figura 13

En el grupo que alcanza la consolidación observamos un descenso de manera significativa hasta las 2 semanas después de haber sido sometido a intervención quirúrgica (12539+/-6242pg/ml). A partir de ese momento del tiempo los niveles de TGF-B1 ascienden progresivamente hasta alcanzar niveles máximos de 17.203+/-4916 pg/ml en el mes 12 post IQ.

En el grupo que no se alcanza la consolidación el descenso es igualmente significativo hasta las 2 semanas (10803+/-5595 pg/ml), sin embargo, a partir de ese momento las cifras se mantienen estables hasta el mes 3 (11969+/-4658 pg/ml). A partir del tercer mes se produce un descenso hasta los 7716+/-3844pg/ml.

### **6.3.3.2 Curva descrita por TGF-B2**

El comportamiento de TGF-B2 tanto en el grupo de pacientes que consolida como los que no es muy similar. Los niveles a la inclusión son los más bajos en todo el seguimiento. Describiendo una línea ascendente hasta el mes 1 y un estancamiento con ligero descenso hasta el mes 3. Del mes 3 al 6 se produce un descenso brusco de valores para crecer posteriormente hasta el mes 12. Es en este punto donde hay un ascenso más marcado en el grupo de consolidación hasta alcanzar los 498 +/-47 pg/ml frente a los 393+/-63 pg/ml del grupo no consolidación, pero sin diferencias significativas. Ver Figura 14.

### **6.3.3.3 Valores añadidos. Fosfatasa alcalina.**

Dentro del ensayo clínico estaba previsto la realización de analíticas generales a todos los pacientes a la inclusión, al mes, a los 6 meses y a los 12 meses post intervención quirúrgica. Hemos aprovechado esta situación y que dentro de esas analíticas se evaluaba la molécula alcalina fosfatasa, para extraer los datos de la misma y describir su comportamiento ya que podría sernos relevante. Se sabe que la alcalina fosfatasa (ALP) es un marcador serológico derivado de los osteoblastos y relacionado con la formación ósea (53)(66).

Se utilizó el test no paramétrico para muestras independientes U Mann-Whitney. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ALP en ningún de los puntos. Ver Figura 17.

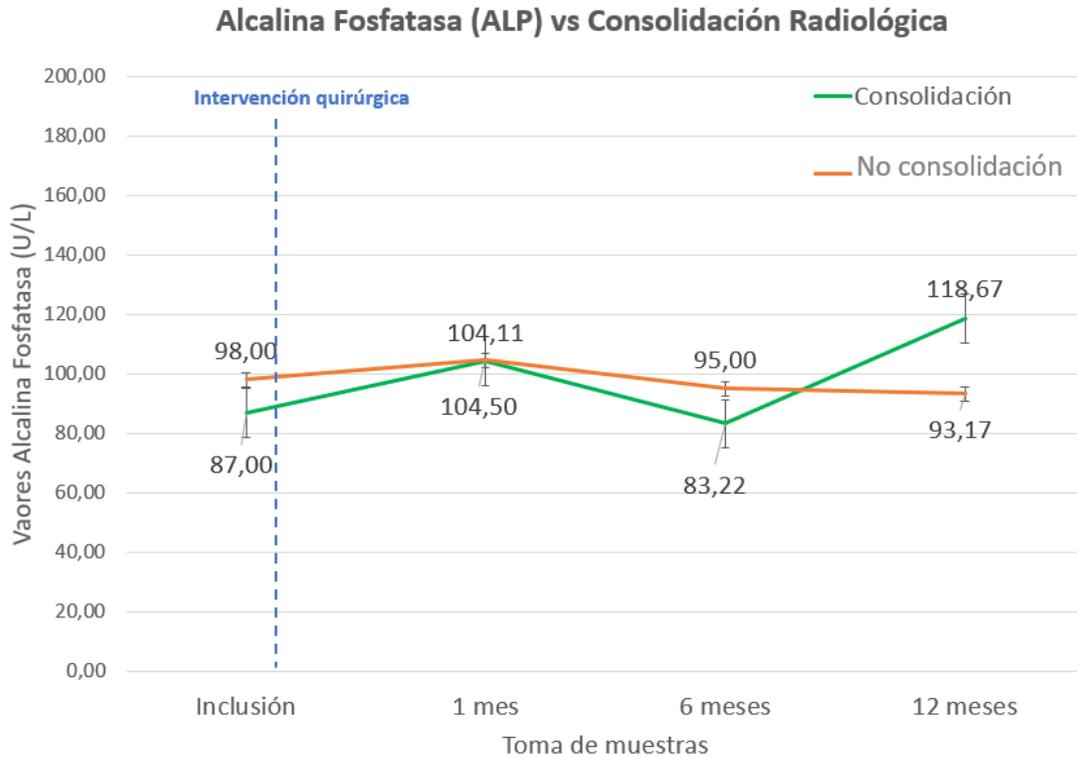


Figura 17: Gráfica que muestra las curvas de ALP medido en los diversos momentos cronológicos con la muestra dividida en función de la consolidación ósea. Los resultados se muestran en valores medios (U/L). Se muestran barras de error. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún punto.

## **7. DISCUSIÓN**



### **7.1. Novedades, fortalezas y debilidades**

La novedad de nuestro estudio radica en ser el primero que evalúa el comportamiento de 2 biomarcadores como son el TGF-B1 y TGF-B2, en una patología concreta como es la pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos instaurada tras ser tratada quirúrgicamente. Otros estudios previos realizados hasta la fecha han evaluado diferentes biomarcadores teniendo como patologías a estudio principalmente fracturas (39)(42)(43)(50)(44)(45)(49)(51)(67)(53), aflojamiento aséptico de artroplastias de cadera (46) y tratamientos quirúrgicos ortopédicos en niños (52). Existe un estudio donde se evalúan TGF-B1 y varios biomarcadores más en pseudoartrosis instauradas sometidas a tratamiento con ondas de choque (47), si bien combina pseudoartrosis hipertróficas y no hipertróficas. Nuestra muestra es únicamente de pacientes afectados de pseudoartrosis no hipertrófica. No diferenciar entre pseudoartrosis hipertrófica y no hipertrófica es un elemento que creemos no puede pasarse por alto; ya que en las pseudoartrosis hipertróficas el problema no es biológico sino de estabilidad en el foco de fractura, mientras que en las pseudoartrosis no hipertróficas el problema es de falta de biología aparte de la ausencia o no de estabilidad.

Si nos centramos en el biomarcador TGF-B1 vemos como se ha estudiado en cohortes de pacientes afectados de fracturas de huesos largos (51)(42)(43) que evolucionan a pseudoartrosis. Sarahrudi et al (51) incluye en su estudio pseudoartrosis hipertróficas y atróficas aunque finalmente realiza un análisis estadístico añadido excluyendo las hipertróficas.

Otro de los puntos novedosos de nuestro estudio es que la muestra es seleccionada previamente mediante criterios de inclusión/exclusión estrictos que eliminan factores de riesgo que han demostrado pueden influir en la consolidación ósea (hábito tabáquico, diabetes, patologías de base, edad) (58), consiguiendo una población homogénea con pocas variables confusión. Si bien el resto de estudios (42)(43)(47)(51) han intentado controlar estos factores en mayor o menor medida no han puesto en práctica unos criterios de exclusión tan estrictos como los nuestros controlando el hábito tabáquico, la diabetes y la edad.

Otra de las fortalezas de nuestra investigación radica en el manejo y análisis de las muestras. El estudio de Zhao et al (62) en el año 2012, ha marcado un antes y un después en el análisis de TGF-B1, evidenciando como un mal manejo de las muestras puede alterar los valores de manera

significativa, pudiendo ser esto motivo de invalidación o cuestionamiento de resultados de estudios llevados a cabo con anterioridad. Todos los trabajos que hemos encontrado son previos al año 2012 y no especifican detalladamente que manejo han hecho de la muestra. Nuestra investigación tiene en cuenta las recomendaciones de Zhao et al y por tanto podemos decir que nos ajustamos a una buena práctica en el manejo de la muestra, dentro de los estándares requeridos. Sin duda esto, da fuerza y legitima los valores obtenidos en nuestro análisis. Nuestros valores absolutos, independientemente de la curva que describan, son mucho menores a los obtenidos en el resto de estudios (Tabla X / Figura 18). Esto se explica por el protocolo de manejo de la muestra seguido en nuestro estudio, la temperatura y la centrifugación son determinantes para evitar la degranulación de las plaquetas y la contaminación de la muestra por TGF-B1 proveniente de las mismas. Quizá en los estudios previos no se tuvieron en cuenta de una manera tan reglada estos factores de ahí que las cifras sean más altas globalmente.

El hecho de utilizar técnicas de ensayo luminométrico múltiple (Multiplex) frente a ELISA (enzima-inmunoanálisis) no resta validez a nuestros resultados. Si bien el método ELISA es el más extendido y podría considerarse el “gold standard” para la medición de citoquinas, factores de crecimiento y otras moléculas; se ha demostrado que la tecnología Multiplex presenta niveles similares de sensibilidad y especificidad frente a ELISA (68)(69)(70). La tecnología Multiplex permite además analizar diferentes moléculas al mismo tiempo como hicimos en nuestro caso (TGF-B1, TGF-B2), siendo además una técnica más rápida y reproducible especialmente útil cuando se tiene escasas cantidades de muestra.

Es cierto, que una debilidad de nuestro estudio es nuestra escasa muestra (n=17). Sin embargo, el resto de trabajos con los que nos comparamos adolecen de la misma debilidad (ver tablas II y X). Hemos de tener en cuenta que la patología a estudio, la pseudoartrosis, es una patología poco prevalente (máxime en nuestro caso que nos centrábamos en la pseudoartrosis no hipertrófica con criterios de inclusión muy restrictivos), por lo que conseguir una muestra de gran tamaño es sumamente difícil. En nuestro caso el reclutamiento de pacientes ha sido lento, 4 años. El diseño de estudios multicéntricos podría ser una solución de cara a futuras investigaciones.

## **7.2 Valores y comportamiento de los biomarcadores**

Nuestros valores basales medios de TGF-B1: 26.702,4 +/- 14537 pg/ml y TGF-B2: 307,8 +/-83,1 pg/ml en 20 pacientes afectos de pseudoartrosis no hipertrófica pueden considerarse los primeros

descritos en la literatura. Es cierto que Wang et al (47) midieron niveles basales de TGF-B1 en pacientes con pseudoartrosis cifrándolos en  $46275 \pm 11175$  pg/ml; pero hemos de destacar que este autor no diferenció entre pseudoartrosis hipertróficas y no hipertróficas. Su n es menor a la nuestra, 12 sujetos; y el procesado y manejo de sus muestras no queda bien detallado. Además, el estudio fue llevado a cabo en el año 2009, previamente a que Zhao et al en el año 2012 marcaran los estándares para el manejo de las muestras de TGF-B1. Pensamos que esta es la razón por la que sus cifras difieran tanto con las nuestras.

La curva que describe TGF-B1 en nuestro estudio, a priori, puede parecer diferente a las de los otros dos estudios antes mencionados que describen este biomarcador, pero en el fondo creemos que guarda ciertas similitudes (51) (42). No debemos olvidar que nuestro estudio comienza en el momento cronológico en el que se diagnostica la pseudoartrosis, mientras que los otros dos estudios finalizan en este momento. La visión que hemos de tener de TGF-B1 es el de una molécula que nos traduce un proceso de formación ósea subyacente independiente a si lo hace partiendo de un momento de fractura o a partir de un momento de pseudoartrosis instaurada. En nuestra muestra los niveles más altos de TGF-B1 se dan al inicio del estudio, momento en el que el foco de pseudoartrosis se encuentra en ausencia de consolidación y con un patrón inflamatorio elevado dada esta situación y los continuos intentos fallidos de reparación ósea. Tras ser sometidos los pacientes a intervención quirúrgica los valores de TGF-B1 descienden bruscamente, lo cual creemos e interpretamos como lógico, si tenemos en cuenta que al realizar el legrado óseo rompemos el estado de inflamación crónica en la zona, que hipotetizamos podría ser uno de los elementos causantes de esta situación.

Si observamos las curvas de Sarahrudi y Zimmerman (51) (42) en la figura 18, a partir de la cuarta-sexta semana los niveles de TGF-B1 parecen descender y estabilizarse para posteriormente, y sobretodo en el caso de Sarahrudi a partir de los tres meses, experimentar una elevación siendo mayor esta en el grupo de los pacientes que consolidan. Tanto Zimmerman como Sarahrudi atribuyen el ascenso inicial de las 2 primeras semanas al hematoma post-fractura y la liberación de TGF-B1 en la zona por parte de las plaquetas y la activación de osteoblastos y condrocitos. Sarahrudi atribuye la progresiva estabilización de TGF-B1 entre la 4 y 8 semanas a la estabilidad aportada a la zona fracturada basándose en estudios previos (71)(72) . Posteriormente a los 3 meses según este autor habría un ascenso de TGF-B1 secundario al inicio de la fase de remodelación ósea donde los osteoblastos expresan este factor de crecimiento.

Si nos fijamos detenidamente y superponemos la curva que describe TGF-B1 en nuestro estudio con la que se describe en el estudio de Sarahrudi a partir de la sexta semana, veremos que es muy similar: descenso y estabilización y a partir del tercer mes aumento de TGF-B1 más pronunciado en los pacientes que consolidan (Figura 18). En nuestro caso al igual que Sarahrudi creemos que el ascenso es debido a la remodelación ósea. Por tanto, aunque parezcan diferentes, si tenemos en cuenta que en un caso partimos de fracturas (Sarahrudi / Zimmerman) y en otro de pseudoartrosis instaurada (Chaverri), en el fondo el comportamiento del biomarcador es muy similar traduciendo regeneración ósea. Los valores absolutos en efecto difieren, pero esto es debido al manejo de la muestra que como hemos indicado más arriba han sido manejadas con protocolos diferentes.

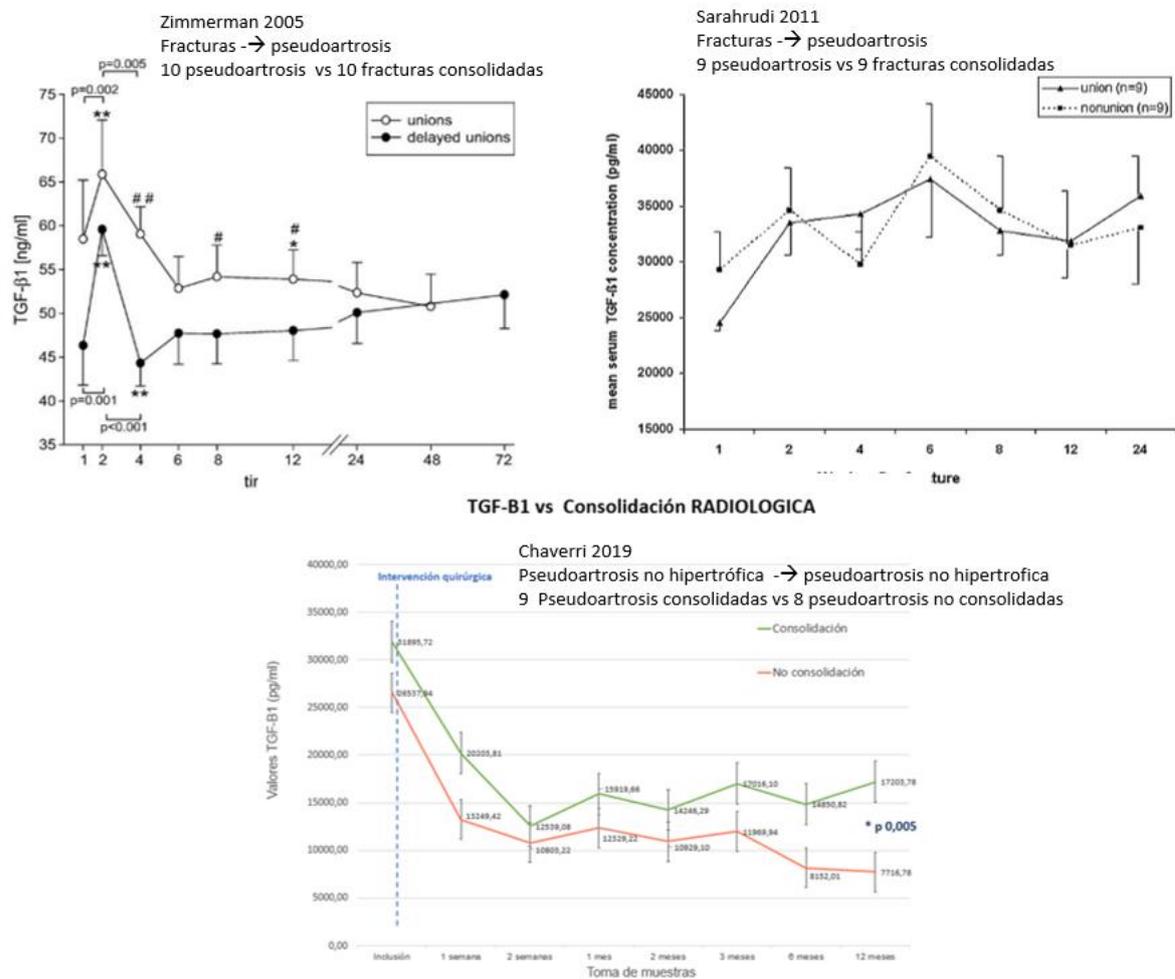


Figura 18: Cuadro comparativo con las 3 graficas que describen los valores en el tiempo de 3 estudios diferentes. (42)(51)

Según los datos que hemos obtenido podemos decir que TGF-B1 podría ser un indicador válido para mostrar regeneración ósea. Observamos que en el grupo consolidación los valores de TGF-B1 siempre han sido más altos, si bien únicamente, hemos encontrado diferencias significativas

en el mes 12. Esto podría ser debido a que nuestro tamaño muestral es pequeño. Lo que no podemos afirmar con los resultados que disponemos es que TGF-B1 sea un biomarcador para detectar precozmente la ausencia de regeneración ósea. No encontramos diferencias significativas hasta el mes 12. En nuestra opinión, deberíamos encontrar significación en los 6 primeros meses para poder actuar precozmente y tratar la situación clínica de no consolidación.

TGF-B2 no parece ser mejor biomarcador que TGF-B1 para detectar el riesgo de no consolidación, ya que si bien sus valores son más altos en el grupo de consolidación nunca lo hacen con la fuerza suficiente para marcar significación. Al contrario que TGF-B1, TGF-B2 muestra sus niveles más bajos al inicio del estudio, en la situación de pseudoartrosis instaurada. No sabemos dar una explicación a esta situación. Se sabe que las 3 isoformas de TGF-B son esenciales en la formación ósea, si bien los patrones de expresión, así como los tiempos de secreción difieren y son una incógnita, sobretodo en lo que se refiere a humanos y más aún si cabe en una situación pseudoartrosis instaurada. Se necesitarían más estudios que analizaran de manera conjunta el comportamiento de las 3 isoformas para poder asociar momentos y tiempos de secreción de las mismas así como la sincronización de estas. Recientemente Ripamonti (73) ha demostrado conseguir generar la misma cantidad de hueso ectópico inyectando elevadas dosis de TGF-B3 en el vientre de ratones que inyectando bajas dosis de TGF-B1 y TGF-B3 combinados lo que apoyaría el concepto de sinergia de las 3 isoformas, y por tanto el estudiarlas en su conjunto y no como entidades aisladas.

Se ha demostrado en estudios en animales que TGF-B2 funciona estimulando la migración de osteoblastos y la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos en etapas iniciales, así como en el periodo de remodelación ósea más tardíamente (74) (75). Estos datos coincidirían con la curva que describe TGF-B2 en nuestra muestra con una elevación hasta el mes post intervención quirúrgica y descenso posterior para volverse a elevar a los 12 meses.

Patología	Estudio	Técnica análisis	Valores TGF-B1 (pg/ml) en los diferentes estudios y según momentos de tiempo																							
			Inclusión		1semana		2semanas		1mes		2meses		3meses		6meses		12meses									
			Cons	No Cons	Cons	No Cons	Cons	No Cons	Cons	No Cons	Cons	No Cons	Cons	No Cons	Cons	No Cons	Cons	No Cons								
Pseudoartritis Huesos largos	Chaverri 2019 9 vs 8	Multiplex	31895 +/-15002	26537 +/-13262	20203 +/-9724	13249 +/-12684	12539 +/-6242	10803 +/-5595	15919 +/-7076	12324 +/-5141	14246 +/-7747	10929 +/-6268	17016 +/-11235	11969 +/-4658	14850 +/-12482	8152 +/-4266	17203 +/-4916	7716 +/-3844								
			50722 +/-10807	46275 +/-11175	-	-	-	-	60986 +/-13661	49337 +/-8132	-	-	-	54250 +/-15680	46791 +/-11160	48590 +/-13457	46297 +/-12437	47156 +/-8534	35488 +/-13441							
Fracturas Huesos largos	Zimmerman 2005 10 vs 10	ELISA	-	-	58460 +/-14790	46330 +/-12580	66000	59000 *	58000 *	45000 *	54000 *	46000 *	53000 *	48000 *	51000 *	51000 *	-	52000 *								
	Sarahruudi 2011 9 vs 9	ELISA	14171 +/-5642	14171 +/-5642	29178 +/-1364	27339 +/-2973	36334 +/-1688	34265 +/-4337	33000 *	27939 +/-3327	31932 +/-1397	35000 *	32500 *	32500 *	35267 +/-2220	33500 *	-	-								

Tabla X donde se muestran los valores de TGF-B1 en los diferentes estudios hechos en humanos. Cons: Consolidación. No Cons: No consolidación. Donde indica \* los valores han sido obtenidos de las graficas mostradas en los diferentes artículos por lo que no figuran con desviaciones standard. Las cifras que se han especificado en los estudios figuran en valores medios absolutos con desviaciones standard. Donde indica - son momentos no analizados en los estudios indicados.

Cuando analizamos las curvas de TGF-B1, TGF-B2 y ALP conjuntamente podemos llegar a reflexiones interesantes (Figura 19). Observamos que tanto TGF-B1 como TGF-B2 presentan valores más altos en el grupo consolidación desde el inicio, pero es digno de remarcar que esta diferencia se acentúa a partir del tercer mes, acentuándose especialmente en el mes 6 y sobretodo en el 12. Los valores de ALP son muy similares durante todo el tiempo a excepción del mes 12 donde en el grupo consolidación ascienden, si bien, sin marcar significación estadística. Dado que tanto TGF-B1 como TGF-B2 son factores de crecimiento relacionados con la formación de hueso y ALP es un marcador de actividad osteocítica, la elevación de los tres nos indica claramente la formación ósea (o quizá deberíamos hablar de remodelación ósea) a partir del tercer mes pero sobre todo en el mes 12. Por ello introducimos la reflexión de que probablemente el éxito para poder detectar precozmente el fallo en la consolidación ósea, no debamos buscarlo en la detección únicamente de un solo biomarcador, sino que podría ser la combinación de varios de ellos la que nos diera la clave para predecir tal situación. Creemos que esto sería algo a tener en cuenta de cara a futuras investigaciones en este campo.

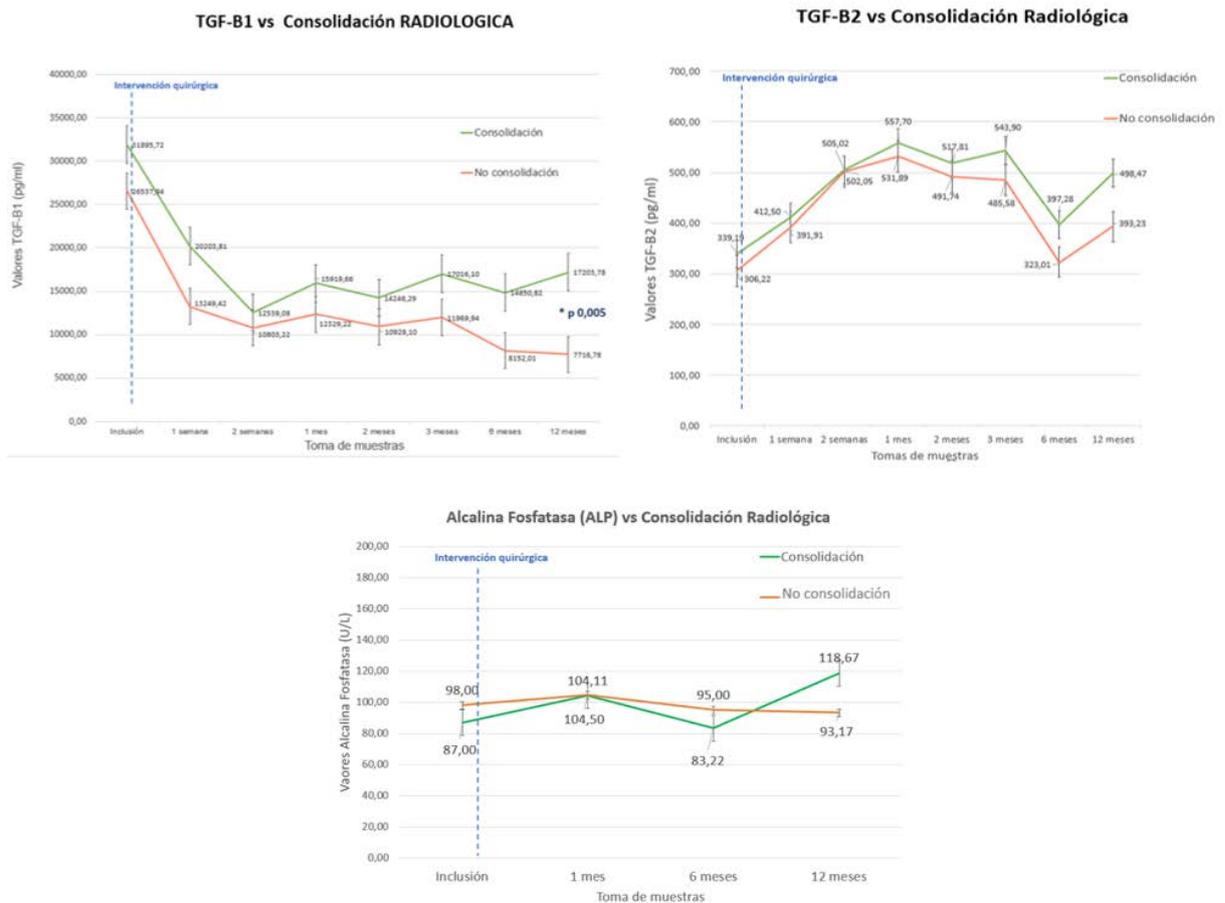


Figura 19: Curvas de TGF-B1, TGF-B2 y ALP en los pacientes de nuestro estudio divididos por consolidación o no.

### **7.3 TGF-B1 y TGF-B2 en sujetos sanos y en otras patologías**

TFG-B está siendo fuente de investigación para demostrar su validez como biomarcador en diferentes patologías: tumorales (mama, adenocarcinoma pancreático, prolactinomas, carcinomas orales...), lesión hepática, severidad de la arterioesclerosis, entre otras.

Los valores standard de TGF-B en sujetos sanos han ido variando a lo largo del tiempo debido al refinamiento en las técnicas de análisis y a la mejora en la manipulación de la muestra. El primero en describir los valores de TGF-B en una muestra de 42 sujetos sanos fue Letterlo J et al en 1995 (76) mediante técnica ELISA en plasma obteniendo los siguientes valores TGF-B1: 4.100 +/- 200 pg/ml, TGF-B2: <200 pg/ml. Sarahrudi et al 2011 (51) lo hicieron en 33 voluntarios sanos mediante ELISA demostrando niveles de TGF-B1 en plasma : 29735,3+/-1328,4 pg/ml.

Sin embargo las cifras más fiables son las descritas posteriormente al trabajo de Zhao et al en 2012 (62) donde se estandarizan y homogenizan los procesados de las muestras. Así en el año 2013 Elenkova et al (77) muestran valores de TGF-B1 en controles a pacientes sanos mediante técnica ELISA (n=48) de 15800+/-7200 pg/ml. Martin-González C et al en 2019 (78) estudian los valores de dicho marcador en una muestra de 34 individuos sanos con una edad media de 59,63+/- 7,71 años cifrándolo en 14124+/-8787 pg/ml

Las cifras medias de TGF-B1 en nuestro estudio oscilaron entre:

- grupo de consolidación 17724+/-5728 pg/ml
- grupo de no consolidación 13730+/-5873 pg/ml

Comparando nuestros resultados con otras patologías:

- pacientes alcohólicos con enfermedad hepática (n=79) 19822+/-12282 pg/ml (78)
- pacientes con macroprolactinomas (n=28) 23900+/-10300 pg/ml (77)
- pacientes con prolactinomas invasivos (n=29) 24.100 +/- 9900pg/ml (77)

Podemos decir por tanto que las cifras de nuestra muestra fueron cifras cercanas a la de una muestra de sujetos sanos (especialmente en el grupo de no consolidación) no siendo tan elevadas como por ejemplo lo son en los pacientes con procesos tumorales malignos y agresivos, lo que ratifica la "benignidad" de la pseudoartrosis como proceso patológico.

Lo misma reflexión podemos extrapolar a TGF-B2 cuyas cifras medias en nuestro estudio oscilaron entre 449,6+/-98,5 pg/ml en el grupo consolidación y 417+/-87 pg/ml en el grupo de no

consolidación; mientras que, por ejemplo, en los adenocarcinomas pancreáticos duplican estas cifras : 885,95 +/-143 pg/ml tal y como muestran Vicente, D et al 2019 (79) en una muestra de 14 pacientes mediante tecnología Multiplex.

#### **7.4 Aproximación al biomarcador ideal**

Pountos et al (38) describieron los requisitos que debería tener un biomarcador ideal:

- Alta sensibilidad / especificidad
- Capacidad de predicción precoz de la evolución de la patología y del éxito o fracaso del tratamiento aplicado.
- Fácil de obtener, mediante técnicas poco invasivas.
- Fácil de reproducir
- Coste / efectivo.

Por la experiencia de nuestra investigación y lo descrito en la literatura podemos decir que TGF-B1 y TGF-B2 todavía están lejos de demostrar tener alta sensibilidad, especificidad, así como capacidad de detección precoz en el contexto de la consolidación ósea. Se necesitan mas estudios, con n mayores para poder ratificar o refutar estas virtudes. Sin embargo, creemos que es un biomarcador de fácil obtención (sangre periférica) y que en el marco de un protocolo específico de manejo de muestra y contando con un centro de referencia donde se realicen de manera rutinaria análisis mediante ELISA o Multiplex, puede ser un marcador de fácil reproducibilidad. En términos de costes y dado que es una molécula cuyo uso no está ampliamente extendido, los costes son todavía hoy día elevados, si bien la tecnología Multiplex consigue minimizarlos, dado que permite analizar diferentes moléculas al mismo tiempo siendo además una técnica más rápida y reproducible.

#### **7.5 Cuantificación de la consolidación ósea**

Aunque no sea el objetivo de esta investigación o creemos relevante destacar la dificultad para cuantificar la consolidación ósea mediante técnicas de imagen (Rx y TC) no existiendo una unidad de criterios o consenso internacional claro (24). Ello ha derivado en la generación de escalas cuantitativas de consolidación ósea como la Radiographic Union Score (RUS) simple y modificada (25)(26)(27). Su uso no está muy extendido pero se trata de una herramienta útil para unificar criterios y establecer puntos de corte. Las limitaciones de esta escala se hacen evidentes fundamentalmente cuando evaluamos la consolidación tras fracturas tratadas mediante placas de osteosíntesis. Al trabajar en dos planos, anteroposterior y lateral, la superposición del material de

síntesis dificultad la evaluación de cada una de las corticales dando falsos resultados (28). Esta limitación, unida a la mayor sensibilidad del TC, ha llevado a desarrollar la Tomographic Union Score (TUS). Escala muy similar a la RUS pero con mucha más sensibilidad y fiabilidad inter e intraobservador (30). Se están desarrollando nuevos métodos de cuantificar la consolidación ósea por TC siendo las Unidades Hounsfield (UH) una de las perspectivas de futuro. Así se ha descrito el uso de estas unidades como elemento para medir la osteoporosis, como predictor de fracturas (80) (81)(82), o incluso valorar la consolidación ósea. Conteduca et al (32) evalúan la consolidación de osteotomías tibiales tratadas con aloinjerto vs aloinjerto con nanohidroxiapatita en un ensayo clínico mediante el uso UH en mediciones de TC a la semana, 2 meses y 12 meses definiendo 3 regiones óseas de interés (ROIs) y obteniendo el valor medio de ellas en cada uno de los tiempos de análisis. Nuestra pretensión en este estudio también ha sido la de proponer una nueva forma de cuantificar la consolidación ósea mediante UH pero estableciendo en lugar de valores absolutos como Conteduca, valores porcentuales de generación ósea respecto a la cortical sana del mismo paciente. Hemos obtenido una correlación muy fuerte entre los resultados de la escala TUS y nuestro modelo de medición por UH (Rho Spearman 0,961, p0,001), por lo que pensamos que ha de ser un método a tener en cuenta y nos anima a iniciar una nueva línea de investigación y a continuar ampliando resultados con una muestra más amplia. Creemos que debe hacerse extensible el uso de herramientas que cuantifiquen objetivamente la consolidación ósea bien sea la TUS, la RUS, o las UH; y abandonar los criterios cualitativos mucho más subjetivos que imperan actualmente.

### **7.6 Otras consideraciones**

Nos gustaría destacar, por último, que tradicionalmente medimos los tiempos de consolidación ósea basándonos en el modelo o patrón de la fractura aguda. Sin embargo, a juzgar por lo observado en nuestros pacientes a estudio, los tiempos de regeneración / consolidación ósea si partimos desde una situación patológica (pseudoartrosis no hipertrófica) son más lentos. De los 8 pacientes que en el mes 12 no alcanzaron la consolidación radiológica, 4 lo hicieron en el mes 18. Los otros 4 requirieron de gestos quirúrgicos añadidos para alcanzar la consolidación. Es decir, de la muestra global analizada (17 pacientes), 13 alcanzaron la consolidación tanto clínica como radiológica al mes 18 (76,4%) con una sola cirugía. Esto concuerda con las ratios descritas en la literatura para esta patología. (10) (11) (12) (13) (14).

## **8.CONCLUSIONES**



- Las cifras de TGF-B1 en pacientes afectados de pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos se sitúan en unos valores medios iniciales de 26.702,4 +/- 14537 pg/ml. Estos valores descienden de manera importante en las 2 primeras semanas una vez instaurado el tratamiento quirúrgico para después estancarse y ascender de manera progresiva a partir del tercer mes hasta el 12 sin alcanzar nunca los valores iniciales (17203 +/- 4916 pg/ml).
- Las cifras de TGF-B2 en pacientes afectados de pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos se sitúan en unos valores medios iniciales de 307,8 +/- 83 pg/ml. Estos valores ascienden de manera importante durante el primer mes una vez instaurado el tratamiento quirúrgico a cifras de 557 +/- 67 pg/ml para después estancarse y descender en el sexto mes. Finalmente vuelven a elevarse de manera progresiva hasta alcanzar niveles de 498 +/- 47 pg/ml.
- Encontramos diferencias estadísticamente significativas para TGF-B1 en el mes 12 al comparar el grupo de pacientes que alcanzan la consolidación frente a los que no. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas para TGF-B2 en ninguno de los puntos a estudio.
- No encontramos diferencias estadísticamente significativas para TGF-B1 y TGF-B2 al comparar los pacientes en función del tratamiento asignado XCEL-MT-OSTEO-ALPHA® vs autoinjerto con cresta iliaca.
- TGF-B1 puede ser un marcador serológico de regeneración ósea si bien con los resultados de nuestro estudio no podemos decir que sea un biomarcador que permita la detección precoz del fallo en la consolidación ósea. La misma conclusión sería aplicable a TGF-B2.



## 9. BIBLIOGRAFÍA



1. Tzioupis C, Giannoudis P V. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury*. 2007 May;38 Suppl 2:S3-9.
2. Ekegren CL, Edwards ER, de Steiger R, Gabbe BJ. Incidence, costs and predictors of non-union, delayed union and mal-union following long bone fracture. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(12).
3. Rodriguez Alvarez J. Pseudoartrosis: Epidemiología. In: Lopez-Duran L, editor. *Manual Curso SECOT: Pseudoartrosis*. 1ª. Madrid: Fundación SECOT; 2008. p. 31–2.
4. Andrzejowski P, Giannoudis P V. The ‘diamond concept’ for long bone non-union management. *J Orthop Traumatol*. 2019;20(1).
5. Fisher JS, Kazam JJ, Fufa D, Bartolotta RJ. Radiologic evaluation of fracture healing. *Skeletal Radiol*. 2019;48(3):349–61.
6. Lopez-Oliva F. Clasificación de las pseudoartrosis. In: Forriol F, editor. *Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. 2º. Madrid: Panamericana; 2010. p. 140–3.
7. Navarro A. Bases científicas de la consolidación de las fracturas. In: Forriol F, editor. *Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. 2ª. Madrid: Panamericana; 2010. p. 130–40.
8. Copuroglu, C Calori, G Giannoudis P. Fracture non-union : Who is at risk ? *Injury*. 2013;44:1379–82.
9. Giannoudis, PV Einhorn, TA Marsh D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury*. 2007;38(4):S3–6.
10. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*. 2007;38(SUPPL. 1):2–7.
11. Moghaddam A, Zietzschmann S, Bruckner T, Schmidmaier G. Treatment of atrophic tibia non-unions according to “diamond concept”: Results of one- and two-step treatment. *Injury*. 2015;46:S39–50.
12. Miska M, Findeisen S, Tanner M, Biglari B, Studier-Fischer S, Grötzner PA, et al. Treatment of nonunions in fractures of the humeral shaft according to the Diamond Concept. *Bone Jt J*. 2016;98B(1):81–7.
13. Calori GM, Giannoudis P V. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: The role of the biological chamber. *Injury*. 2011;42(11):1191–3.
14. Giannoudis P V., Gudipati S, Harwood P, Kanakaris NK. Long bone non-unions treated with the diamond concept: A case series of 64 patients. *Injury*. 2015;46:S48–54.

15. Christodoulou A, Boutsiadis A, Christodoulou E, Antonarakos P, Givissis P, Hatzokos I. Iliac Crest Regeneration. *Clin Spine Surg.* 2014;30(2):E83–9.
16. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis P V. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. *Injury.* 2011;42(SUPPL. 2):S3–15.
17. Fayaz HC, Giannoudis P V., Vrahas MS, Smith RM, Moran C, Pape HC, et al. The role of stem cells in fracture healing and nonunion. *Int Orthop.* 2011;35(11):1587–97.
18. Caminal M, Vélez R, Rabanal RM, Vivas D, Batlle-Morera L, Aguirre M, et al. A reproducible method for the isolation and expansion of ovine mesenchymal stromal cells from bone marrow for use in regenerative medicine preclinical studies. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(12):3408–16.
19. Vélez R, Hernández-Fernández A, Caminal M, Vives J, Soldado F, Fernández A, et al. Treatment of femoral head osteonecrosis with advanced cell therapy in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2012;132(11):1611–8.
20. Vivas D. Optimisation of a tissue engineering product based on mesenchymal stromal cells aiming to regenerate bony tissue (Dissertation). Universidad Barcelona; 2018.
21. Hernandez A. Estudio clínico de terapia celular autóloga con células madre adultas expandidas ex vivo, en el tratamiento de la osteonecrosis de la cabeza femoral (Tesis Doctoral). Universidad Autonoma Barcelona; 2015.
22. Prat S, Gallardo-Villares S, Vives M, Carreño A, Caminal M, Oliver-Vila I, et al. Clinical translation of a mesenchymal stromal cell-based therapy developed in a large animal model and two case studies of the treatment of atrophic pseudoarthrosis. Vol. 12, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2018. p. e532–40.
23. Chaverri D, Vives J. Toward the clinical use of circulating biomarkers predictive of bone union. *Biomark Med.* 2017;11(12):1125–33.
24. Corrales LA, Morshed S, Bhandari M, Miclau T. Variability in the assessment of fracture-healing in orthopaedic trauma studies. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2008;90(9):1862–8.
25. Whelan DB, Bhandari M, Stephen D, Kreder H, McKee MD, Zdero R, et al. Development of the radiographic union score for tibial fractures for the assessment of tibial fracture healing after intramedullary fixation. *J Trauma.* 2010 Mar;68(3):629–32.
26. Leow JM, Clement ND, Tawonsawatruk T, Simpson CJ, Simpson AHRW. The radiographic union scale in tibial (RUST) fractures. *Bone Joint Res.* 2016;5(4):116–21.
27. Litrenta, J Tornetta, P Mehta, S Jones, C O’Toole, R Bhandari M. Determination of Radiographic Healing: An Assessment of Consistency Using RUST and Modified RUST in

- Metadiaphyseal Fractures. *J Orthop Trauma*. 2015;29(11):516–20.
28. Perlepe V, Omoumi P, Larbi A, Putineanu D, Dubuc JE, Schubert T, et al. Can we assess healing of surgically treated long bone fractures on radiograph? *Diagn Interv Imaging*. 2018;99(6):381–6.
  29. Bhattacharyya T, Bouchard KA, Phadke A, Meigs JB, Kassarian A, Salamipour H. The accuracy of computed tomography for the diagnosis of tibial nonunion. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88(4):692–7.
  30. Perlepe V, Omoumi P, Lecouvet F, Berg B Vande. A radiographic and CT scoring system for quantification of the healing process in delayed-unions of long bone fractures: a feasibility study. *ECR (European Soc Radiol)*. 2013;1–13.
  31. Grigoryan M, Lynch JA, Fierlinger AL, Guermazi A, Fan B, MacLean DB, et al. Quantitative and qualitative assessment of closed fracture healing using computed tomography and conventional radiography. *Acad Radiol*. 2003 Nov;10(11):1267–73.
  32. Conteduca F, Di Sette P, Iorio R, Caperna L, Argento G, Mazza D, et al. Nanohydroxyapatite promotes the healing process in open-wedge high tibial osteotomy: A CT study. *Knee*. 2016;23(5):763–9.
  33. Gausden E, Garner MR, Fabricant PD, Warner SJ, Shaffer AD, Lorich DG. Do clinical outcomes correlate with bone density after open reduction and internal fixation of tibial plateau fractures. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2017;137(6):755–60.
  34. Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury*. 2014 Jun;45 Suppl 2:S8–15.
  35. Morshed S. Current Options for Determining Fracture Union. *Adv Med*. 2014;2014:1–12.
  36. Zimmermann G, Schmeckenbecher KHK, Boeuf S, Weiss S, Bock R, Moghaddam A, et al. Differential gene expression analysis in fracture callus of patients with regular and failed bone healing. *Injury*. 2012;43(3):347–56.
  37. Huang W, Zhang K, Zhu Y, Wang Z, Li Z, Zhang J. Genetic polymorphisms of NOS2 and predisposition to fracture non-union: A case control study based on han Chinese population. *PLoS One*. 2018;13(3):1–10.
  38. Pountos I, Georgouli T, Pneumaticos S, Giannoudis P V. Fracture non-union: Can biomarkers predict outcome? *Injury*. 2013;44(12):1725–32.
  39. Grgurevic L, Macek B, Durdevic D, Vukicevic S. Detection of bone and cartilage-related proteins in plasma of patients with a bone fracture using liquid chromatography-mass spectrometry. *Int Orthop*. 2007;31(6):743–51.
  40. Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H, Imamura Y, Fukuda M. Expression of various growth

- factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *Eur J Histochem.* 2000;44(3):269–78.
41. Sousa CP, Dias IR, Lopez-Peña M, Camassa JA, Lourenço PJ, Judas FM, et al. Bone turnover markers for early detection of fracture healing disturbances: A review of the scientific literature. *An Acad Bras Cienc.* 2015;87(2):1049–61.
  42. Zimmermann G, Henle P, Küsswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A, Richter W, et al. TGF- $\beta$ 1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone.* 2005;36(5):779–85.
  43. Zimmermann G, Moghaddam A, Reumann M, Wangler B, Breier L, Wentzensen A, et al. TGF- $\beta$ 1 als pathophysiologischer faktor bei der frakturheilung. *Unfallchirurg.* 2007;110(2):130–6.
  44. Ohishi T, Takahashi M, Yamanashi A, Suzuki D, Nagano A. Sequential changes of bone metabolism in normal and delayed union of the spine. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(2):402–10.
  45. Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vécsei V, Aharinejad S. VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: A comparison between impaired and normal fracture healing. *J Orthop Res.* 2009;27(10):1293–7.
  46. Goebel S, Lienau J, Rammoser U, Seefried L, Wintgens KF, Seufert J, et al. FGF23 is a putative marker for bone healing and regeneration. *J Orthop Res.* 2009;27(9):1141–6.
  47. Wang CJ, Yang KD, Ko JY, Huang CC, Huang HY, Wang FS. The effects of shockwave on bone healing and systemic concentrations of nitric oxide (NO), TGF- $\beta$ 1, VEGF and BMP-2 in long bone non-unions. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2009;20(4):298–303.
  48. Marchelli D, Piodi LP, Corradini C, Parravicini L, Verdoia C, Olivieri FM. Increased serum OPG in atrophic nonunion shaft fractures. *Optim Eng.* 2009;10(2):55–8.
  49. Sarahrudi K, Mousavi M, Thomas A, Eipeldauer S, Vécsei V, Pietschmann P, et al. Elevated levels of macrophage colony-stimulating factor in human fracture healing. *J Orthop Res.* 2010;28(5):671–6.
  50. Moghaddam A, Müller U, Roth HJ, Wentzensen A, Grützner PA, Zimmermann G. TRACP 5b and CTX as osteological markers of delayed fracture healing. *Injury.* 2011;42(8):758–64.
  51. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Köttstorfer J, Kecht M, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) levels in human fracture healing. *Injury.* 2011;42(8):833–7.
  52. Granchi D, Devescovi V, Pratelli L, Verri E, Magnani M, Donzelli O, et al. Serum levels of fibroblast growth factor 2 in children with orthopedic diseases: Potential role in predicting

- bone healing. *J Orthop Res.* 2013;31(2):249–56.
53. Ajai S, Sabir A. Evaluation of Serum Alkaline Phosphatase as a Biomarker of Healing Process Progression of Simple Diaphyseal Fractures in Adult Patients. *Int Res J Biol Sci* *Int Res J Biol Sci.* 2013;2(2):2278–3202.
54. van Baardewijk LJ, van der Ende J, Lissenberg-Thunnissen S, Romijn LM, Hawinkels LJAC, Sier CFM, et al. Circulating bone morphogenetic protein levels and delayed fracture healing. *Int Orthop.* 2013;37(3):523–7.
55. Patil AS, Sable RB, Kothari RM. An update on transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ): Sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J Cell Physiol.* 2011;226(12):3094–103.
56. Wakefield L. TGF-B1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1995;1:129–36.
57. Tao J, Dong B, Yang LX, Xu KQ, Ma S, Lu J. TGF- $\beta$ 1 expression in adults with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):9539–44.
58. Kaiser G, Thomas A, Köttstorfer J, Kecht M, Sarahrudi K. Is the expression of Transforming Growth Factor-Beta1 after fracture of long bones solely influenced by the healing process? *Int Orthop.* 2012;36(10):2173–9.
59. Sarahrudi K, Kaiser G, Thomas A, Michel M, Wolf H, Mousavi M, et al. The influence of low molecular weight heparin on the expression of osteogenic growth factors in human fracture healing. *Int Orthop.* 2012;36(5):1095–8.
60. Assoians RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming Growth Factor- $\beta$  in Human Platelets. *J Biol Chem.* 1983;258(11):7155–60.
61. Jeon JH, Kim YS, Choi EJ, Cheon S, Kim S, Kim JS, et al. Implication of co-measured platelet factor 4 in the reliability of the results of the plasma transforming growth factor- $\beta$ 1 measurement. *Cytokine.* 2001;16(3):102–5.
62. Zhao L, Wang L, Ji W, Lei M, Yang W, Kong FM. The influence of the blood handling process on the measurement of circulating TGF- $\beta$ 1. *Eur Cytokine Netw.* 2012;23(1):1–6.
63. Grau-Voster M, Rodriguez, L Torrents-zapata, S Vivas, D Codinach, M Blanco, M Oliver-Vila, I Garcia-Lopez JVJ. Levels of IL-17F and IL-33 correlate with HLA-DR activation in clinical-grade human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cell expansion cultures. *Cytotherapy.* 2019;21(1):32–40.
64. Lopez-Fernández A. Tratamiento con células madre mesenquimales en un modelo experimental ovino de osteonecrosis de cabeza femoral (Tesis Doctoral). Universidad Autonoma Barcelona; 2018.

65. Kellam JF, Meinberg EG, Agel J, Karam MD, Roberts CS. AO/OTA Fracture and dislocation classification compendium - 2018. Vol. 32, Journal of Orthopaedic Trauma. 2018. 1–173 p.
66. Romero Barco CM, Manrique Arijia S, Rodríguez Pérez M. Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatol Clin.* 2012;8(3):149–52.
67. Zhang Y, Khan D, Dellling J, Tobiasch E, Sousa CP, Dias IR, et al. FGF23 is a putative marker for bone healing and regeneration. *J Orthop Res.* 2009;27(5):1141–6.
68. Elshal, M McCoy J. Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA. *Methods.* 2013;71(2):233–6.
69. Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: Comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2004;61(1):35–9.
70. Hernández Ramírez DF, Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatol Clin.* 2010;6(3):173–7.
71. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005;19(10 Suppl):S4-6.
72. Weiss S, Baumgart R, Jochum M, Strasburger CJ, Bidlingmaier M. Systemic regulation of distraction osteogenesis: A cascade of biochemical factors. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1280–9.
73. Ripamonti U, Parak R, Klar RM, Dickens C, Dix-Peek T, Duarte R. The synergistic induction of bone formation by the osteogenic proteins of the TGF- $\beta$  supergene family. *Biomaterials.* 2016;104:279–96.
74. Takeyama K. TGF $\beta$ 2 signaling is essential for osteoblast migration and differentiation. *Bone.* 2016;86:68–78.
75. Kalinichenko SG, Matveeva NY, Kostiv RE, Puz' A V. Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Transforming Growth Factor- $\beta$ 2 in Rat Bone Tissue after Bone Fracture and Placement of Titanium Implants with Bioactive Bioresorbable Coatings. *Bull Exp Biol Med.* 2017;162(5):671–5.
76. Letterlo J. Transforming Plasma Breast and Cancer Growth Is Unchanged Circulates in Normal Metastatic Human in Advanced. 1995;1(January):129–36.
77. Elenkova, A Atanassova, I Kirilov, G Visilev, V Kalinov, K Zacharieva S. Transforming growth factor  $\beta$ 1 is not a reliable biomarker for valvular fibrosis but could be a potential serum marker for invasiveness of prolactinomas. *Eur J Endocrinol.* 2013;169:299–306.
78. Martin-Gonzalez C. Transforming Growth Factor Beta 1 and Vascular Risk in Alcoholics. *Alcohol Alcohol.* 2019;1–5.

79. Vicente D, Lee AJ, Hall CS, Lucci A, Lee JE, Kim MP, et al. ScienceDirect Association for Academic Surgery Circulating Tumor Cells and Transforming Growth Factor Beta in Resected Pancreatic Adenocarcinoma. *J Surg Res.* 2019;243:90–9.
80. Schreiber JJ, Anderson PA, Rosas HG, Buchholz AL, Au AG. Hounsfield units for assessing bone mineral density and strength: A tool for osteoporosis management. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2011;93(11):1057–63.
81. Meredith DS, Schreiber JJ, Taher F, Cammisa FP, Girardi FP. Lower preoperative hounsfield unit measurements are associated with adjacent segment fracture after spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013;38(5):415–8.
82. Nguyen HS, Soliman HM, Patel M, Li L, Kurpad S, Maiman D. CT Hounsfield Units as a Predictor for the Worsening of Traumatic Vertebral Compression Fractures. *World Neurosurg.* 2016;93:50–4.



## **10. ANEXOS**



ANEXO I

 <p>XCELIA</p>	<p><b>HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE</b></p>	<p>Código: XCEL-PSART-01                  Versión: 3.0                  Fecha: 19 noviembre 2014                  Página: 12/13</p>
---	---	---

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO DE DONACIÓN DE SANGRE PARA INVESTIGACIÓN**

**Título del estudio**

"Estudio clínico piloto de fase IIa, unicéntrico, prospectivo, aleatorizado, paralelo, de dos brazos de tratamiento, abierto con evaluación ciega y de dosis-única para la evaluación de células mesenquimales troncales adultas autólogas expandidas "ex vivo" conjugadas en matriz ósea de origen alógeno (XCEL-MT-OSTEO-ALPHA) en el tratamiento de la pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos"

(Código del estudio: XCEL-PSART-01; N° EudraCT: 2013-005025-23)

Además de las analíticas destinadas a éste estudio (4 en total), se le propone la donación de una cantidad adicional de sangre, siendo 9 el total de muestras de de sangre que se le van a extraer. En las 4 extracciones correspondientes al estudio se le extraerán los 20 ml de sangre planeados + 3 ml de sangre adicionales (23 ml de sangre en total para cada muestra). Además, a lo largo del estudio se extraerán otras 5 muestras de 3 ml cada una de ellas (3 durante el ingreso hospitalario y otra al mes y a los 2 meses de la intervención). En resumen:

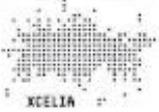
PROGRAMA de VISITAS	Evaluación inicial	Intervención quirúrgica (ingreso hospital)			1 m	2 m	3 m	4 m	5 m	6 m	9 m	12 m
		Pre IQ	1S	2S								
Análítica Control (Estudio)	X				X					X		X
Muestras adicionales	X	Pre IQ	1S	2S	X	X	X			X		X
ml de sangre	23ml	3ml	3ml	3ml	23ml	3ml	3ml			23ml		23ml

Debe saber que:

- La sangre donada será congelada y se guardará siguiendo la normativa vigente para ello, durante un máximo de 5 años. Pasado este tiempo, si las muestras no se hubieran utilizado para ninguna investigación el laboratorio de ASEPEYO y/o del Banc de Sang i Teixits procederá a su destrucción.
- La sangre donada se dedicará a investigaciones que serán lideradas por ASEPEYO y tendrán la colaboración de XCELIA-División de Terapias Avanzadas del Banc de Sang i Teixits. Las líneas de investigación son sólo de interés científico y se basarán en la realización de investigaciones para determinar biomarcadores relacionados con la pseudoartrosis y su evolución
- Esperamos que los resultados de estas investigaciones proporcionen conocimientos científicos que puedan aplicarse en futuros ensayos clínicos y que otros pacientes que vayan a recibir el tratamiento puedan beneficiarse de ello.
- Estas 9 extracciones de sangre se producirán a lo largo de 1 año, en el Hospital ASEPEYO. No es de esperar que la extracción de estas muestras tenga algún efecto en su salud. Sin embargo, si su

Versión 3 (19 noviembre 2014)

Firmar por duplicado (un ejemplar para el paciente y otro para el centro/investigador)

 <p>XCELIA</p>	<b>HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE</b>	Código: XCEL-PSART-01 Versión: 3.0 Fecha: 19 noviembre 2014 Página: 13/13
---	--	--

- médico creyera que este hecho pudiera perjudicarlo de algún modo, se procedería a interrumpirlas.
- Entiendo que si las investigaciones no son favorables o que si así se decidiera por los responsables de la investigación la muestra congelada se destruirá siguiendo los procedimientos estandarizados para ello.
  - No se va a practicar ningún estudio sobre material genético.
  - Las muestras de sangre no serán utilizadas para uso clínico.

Declaro que la información que me ha sido dada al respecto ha sido comprensible y mis preguntas contestadas, por lo cual tomo libremente la decisión de autorizar este procedimiento, entendiéndolo que:

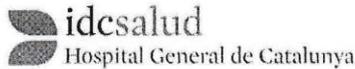
- Esta donación es altruista y no se derivará ninguna compensación de ella.
- La donación es voluntaria y puedo decidir no donar mi sangre sin que esto afecte a mi relación médico-paciente.
- Con posterioridad a alguna de las donaciones puedo libremente revocar el consentimiento de donación. En este caso se procederá a la destrucción de las muestras que ya fueron donadas.

**Firma del paciente o testigo**  
Nombre y apellidos:  
DNI:  
Fecha:

**Firma del responsable que proporciona la información**  
Nombre y apellidos:  
DNI:  
Fecha:

*Versión 3 (19 noviembre 2014)  
Firmar por duplicado (un ejemplar para el paciente y otro para el centro/investigador)*

## ANEXO II



### DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACION CLÍNICA

Dña. MONTSERRAT GRANADOS PLAZA, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (CEIC) DE IDCSalud HOSPITAL GENERAL DE CATALUNYA, sito en c/ Pedro i Pons 1, 08195 SANT CUGAT DEL VALLÈS (Barcelona)

#### CERTIFICA:

Que este Comité ha EVALUADO en fecha 28/02/2014 (acta 02/2014) las respuestas solicitadas a la propuesta del **promotor Banc de Sang i Teixits**, correspondiente al estudio:

Nº EUDRACT **2013-005025-23**

Código de protocolo del promotor **XCEL-PSART-01**

Versión/fecha del protocolo **Versión 2 de fecha 7 enero 2014**

Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado **Versión 2.0 de fecha 7 enero 2014**

Manual del Investigador **Versión 2.0 de fecha 2 diciembre 2013**

Título **Estudio clínico piloto de fase IIa, unicéntrico, prospectivo, abierto con evaluación ciega, aleatorizado, paralelo, de brazos de tratamiento y de dosis única para la evaluación de células mesenquimales troncales adultas autólogas expandidas "ex vivo" conjugadas en matriz ósea de origen alogénico (XCEL-MT-OSTEO-ALPHA) en el tratamiento de la pseudoartrosis no hipertrófica de huesos largos.**

Y tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan.
- Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- El seguro o la garantía financiera previstos.
- El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos, el plan de reclutamiento de sujetos y las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.

Este Comité, emite INFORME FAVORABLE para la realización de dicho estudio en:

- Hospital ASEPEYO, Sant Cugat del Vallès, Barcelona.  
Investigador Principal: Dr. Fernando Granell Escobar.

Lo que firmo en Sant Cugat del Vallès, a 31 de enero de 2014.

Firmado:

Dña. Montserrat Granados Plaza  
Secretaria CEIC  
IDCSalud Hospital General de Catalunya



## **11. APÉNDICE**



Perspective

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

**Biomarkers  
in Medicine**



## Toward the clinical use of circulating biomarkers predictive of bone union

Daniel Chaverri<sup>\*1</sup> & Joaquim Vives<sup>\*\*2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Hospital ASEPPEYO Sant Cugat, Avinguda Alcalde Barnils, 54–60, Sant Cugat del Vallès, 08174 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Servei de Teràpia Cel·lular, Banc de Sang i Teixits, Edifici Dr. Frederic Duran i Jordà, Passeig Taulat, 116, 08005 Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig de la Vall d'Hebron 129–139, 08035 Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Musculoskeletal Tissue Engineering Group, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig de la Vall d'Hebron 129–139, 08035 Barcelona, Spain

\* Author for correspondence: Tel.: +34 605 392 395; [danichaverriferro@gmail.com](mailto:danichaverriferro@gmail.com)

\*\* Author for correspondence: Tel.: +34 93 5573500, Ext. 6708; [jvives@bst.cat](mailto:jvives@bst.cat)

Current methods for diagnosis of bone healing after treatment of trauma injuries rely on clinical findings and the use of imaging methodologies that provide conclusive results but only at mid/long-term post-intervention. In this Perspective we present and discuss incipient evidence on biomarkers that may serve for monitoring the progression of bone healing as well as predicting eventual nonunion outcomes.

First draft submitted: 29 May 2017; Accepted for publication: 25 August 2017; Published online: 28 November 2017

**Keywords:** biomarker • nonunion • osteogenesis • pseudoarthrosis • regenerative medicine • TGF- $\beta$ 1

Limited self-healing response to bone fractures halts successful repair in 5–10% of cases, which progress into nonunion or pseudoarthrosis causing functional disability and leaving suffering patients on hold up to 9 months before having conclusive imaging-based diagnosis (Figure 1) [1,2]. This situation leads to a delay in taking potential corrective actions, thus impeding patient reinsertion in the labor market or even daily life activity. Another inconvenience of imaging methodologies is their cost and that patients are subjected to radiation (Table 1). Undoubtedly, early detection of circulating biomarkers of bone healing may facilitate adopting alternative therapeutic approaches in an attempt to speed up the recovery time of patients and mitigate the risks of progression into pseudoarthrosis. For the identification of relevant biomarkers, it is important though to understand the nature of the surgical interventions and the biological processes involved in bone repair. First of all, treatments of fractures rely on three key parameters: mechanical stability at the fracture site; adequate vascular supply; and presence of biological stimuli [3]. If successful, these approaches result in an increment of bone mass produced by a specialized cell type named osteoblasts that work in tight coordination with other cell types (Figure 2).

Indeed bone-building osteoblasts play a central role in bone formation. They differentiate from mesenchymal progenitors, either directly or via an osteochondroprogenitor. The direct pathway is typically observed in intramembranous ossification of the skull and clavicles, while the latter is a hallmark of endochondral ossification of the axial skeleton and limbs. The two pathways converge at the level of preosteoblasts, which develop through three stages: proliferation; maturation of the extracellular matrix (ECM); and mineralization. Osteoblasts become osteocytes after getting trapped within the ECM that they secrete, populating narrow interconnecting channels within the bone matrix [4]. Apart from differentiating into osteoblastic cells, mesenchymal progenitors also secrete angiogenic and anti-inflammatory molecules that facilitate tissue reparative processes [5]. Such cellular activity or the lack of it, can be taken as an opportunity to identify biomarkers of bone healing.

### Biomarkers of bone healing

The ideal biomarker of bone healing must fulfil several criteria including: measurability with accuracy, high sensitivity and specificity from blood or urine samples in a simple, rapid and inexpensive manner, and predictive of the success of bone union [6]. Further to some existing preclinical data [7], a few candidate biomarkers displaying signs of potential predictive power of nonunion or delayed bone union have been investigated in humans, although limited to case series and case–control studies with a small number of patients (Table 2). The lack of clinical data

Future  
Medicine



**Figure 1. Diagnostic imaging of pseudoarthrosis is only reliable at mid/long term after intervention.** Anteroposterior and lateral x-ray from a 42-year-old male, who suffered metaphyseal-diaphyseal tibial fracture (AO 41-A2) treated with a Less Invasive Stabilization System (LISS plate, Synthes). Radiological control at 9 months, x-ray and computerized tomography (axial and coronal planes). Please note the absence of bone healing at the fracture site.

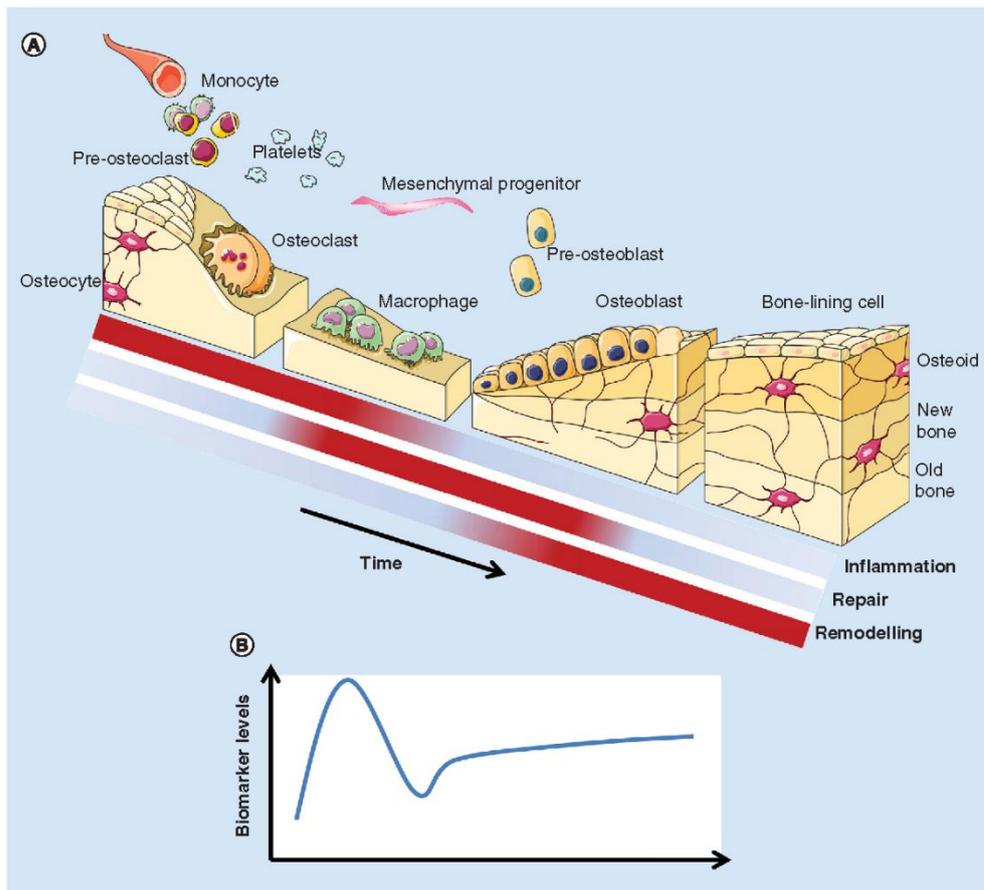
of higher level of evidence, particularly from properly powered randomized clinical trials, makes difficult to draw conclusions as to which biomarker could be reliably used clinically for following up patients and predictive of nonunion. However, although still inconclusive, incipient evidence supports the molecules described in Table 2 as potential candidates, which may serve as predictors of potentially (un)successful fracture union [6].

To date, candidate biomarkers under investigation include signaling molecules, enzymes and components of the ECM.

With respect to signaling molecules, a few growth factors have been investigated to date. These include FGF-2, FGF-23, TGF- $\beta$ 1, VEGF and BMP-2. Among those factors intrinsic to the skeletal tissues, FGF-2 is produced by cells of the osteoblastic and accumulates in bone matrix, acting as potent mitogen in an autocrine/paracrine fashion [8–11], particularly on mesenchymal progenitors, prechondrocytes and preosteoblasts rather than differentiated

RC target	Method	Pros	Cons
Bone union	X-ray	Noninvasive	Poor resolution; exposure to radiation
Bone union	PET/CT	Noninvasive; high resolution	Expensive; exposure to magnetic fields
Circulating biomarker	ELISA	Minimally invasive (blood sample); customizable assays	Nonspecific binding and high background
Circulating biomarker	xMAP technology (i.e., Luminex)	Minimally invasive (blood sample); multiplex; high sensitivity and specificity	Dependence on commercial kits
Protein expression	IHC	Shows location of the expression of specific proteins	Invasive (biopsy); labor intensive; time consuming
Gene expression	qRT-PCR	Quantitative measure of levels of genes expressed locally	Invasive (biopsy); labor intensive

Preferred use of detection methods in Research (R) and Clinical (C) practice and their advantages are presented.  
 ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; IHC: Immunohistochemistry; PET/CT: Positron emission tomography/computed tomography; qRT-PCR: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; xMAP: (multiplex) MultiAnalyte Profiler.



**Figure 2. Schematic view of events occurring during the process of bone healing and potential use of circulating biomarker levels in diagnostics and prognosis.** (A) The biological meaning of observed circulating levels of biomarkers needs to be understood in order to implement their use in clinical practice. (B) Diverse biomarker profiles may be observed according to their biological significance in either one of the three phases of bone healing (inflammation, repair and remodeling). Part of the figure was used from 'Medical Art Gallery' (Les Laboratoires Servier).

Molecule (source)	Level of evidence	Study design (number of patients)	Results	Ref.
TGF- $\beta$ 1 (serum)	Case control	Delayed union long bones 10 nonunion vs 10 union [42] 15 nonunion vs 15 union [43]	Significant differences at 4 (45ng/ml; $p \leq 0.01$ ), 8 and 12 week ( $p \leq 0.05$ )	[42,43]
CTX, PYR, DPD (urine and serum) OC N-mid (serum)	Case control	Nonunion vertebral fractures 9 nonunion vs 24 union	Significant differences for OC Nmid at 24 ( $p \leq 0.05$ ) and 48 ( $p \leq 0.01$ ) weeks (180% change)	[44]
VEGF (serum)	Case control	Delayed or nonunion long bones 11 nonunion vs 103 union	No significant differences at anytime	[45]
FGF 23 (serum)	Case control	Aseptic loosening THR 55 aseptic loosening THR vs 40 primary TH arthroplasty	Significant differences at day 1 (84.0+/-16.7 RU/ml), 4 (68.7+/-7.9 RU/ml) and 10 (57.6+/-7.1 RU/ml) ( $p \leq 0.01$ )	[23]
NO, TGF $\beta$ 1, VEGF and BMP-2 (serum)	Case series	42 nonunion long bones treated with extracorporeal shockwave treatment	Patients with bony union showed higher serum NO (92.1 $\pm$ 49.2 U/L), TGF $\beta$ 1 (59.166 $\pm$ 13.547 ng/ml), VEGF (476.7 $\pm$ 306.9 pg/ml) and BMP-2 (82.1 $\pm$ 26.9 pg/ml) levels ( $p \leq 0.05$ ) at 1 month after treatment vs persistent nonunion	[26]
M-CSF (serum)	Case control	Delayed or nonunion long bones 11 nonunion vs 103 union	No significant differences observed at any time	[46]
TRAcP 5b, CTX (serum)	Case control	Nonunion long bone 15 nonunions vs 15 unions	Significant differences in relative values TRAcP 5b at weeks 4 and 8 (120%). No significant differences in absolute values.	[28]
TGF- $\beta$ 1 (serum)	Case control	Delayed union long bones 9 nonunion vs 9 union	No significant differences at anytime	[47]
FGF-2 (serum)	Case series	88 children undergoing surgical treatment for orthopaedic conditions	Lower FGF-2 (7 pg/ml) serum levels were observed preoperatively in patients who did not heal after surgery	[21]
ALP (serum)	Case series	Simple traumatic diaphyseal fractures of both bones of leg (n = 95)	In normal healing group (n = 87), the mean values of serum ALP at 3 weeks were significantly higher than those found in the impaired healing group (689 U/l). In nonunion group (n = 8), the mean serum ALP levels remained within the normal limits (280 U/l)	[48]

DPD: Deoxypyridinoline, OC Nmid: N-mid portion of osteocalcin; PYR: Pyridoline, RU: Relative unit, THR: Total hip replacement.

osteoblasts [12]. In the clinical setting, Granchi and collaborators analyzed FGF-2 levels in 88 children receiving orthopedic treatment, finding lower levels of FGF-2 in patients with nonunion [13]. At the terminal phase of the bone remodeling cycle, osteocytes secrete factors such as sclerostin, which inhibits osteoblast activity and induce apoptosis and FGF-23 that suppresses osteoblast differentiation and bone matrix mineralization [14]. Goebel and collaborators found a threefold increase of FGF-23 levels on the third day post-intervention in patients with aseptic loosening after total hip replacement [15].

Delivery of TGF- $\beta$ 1 from platelets involved in the hematoma at the defect site is complemented by TGF- $\beta$ 1 expression from incipient osteoblasts generated in the region, leading to elevated levels of TGF- $\beta$ 1 in serum up to week 2 post-fracture. Thereafter a decrease is observed reaching the lowest levels within weeks 4 and 8, whereas an increase is observed thereafter, from week 12 up to week 24, corresponding to high osteoblastic activity in the bone remodeling phase (Figure 2) [16].

Wang and collaborators studied a group of 42 patients with pseudoarthrosis of long bones (femur and tibia) serum levels of nitric oxide, TGF- $\beta$ 1, VEGF and BMP-2 the day after and 1, 3 and 6 months after shockwave

treatment. Interestingly, 78.6% of patients that consolidated successfully showed higher levels of TGF- $\beta$ 1, VEGF, nitric oxide and BMP-2 within the first month than the 21.4% of patients with impaired healing [17].

Regarding enzymes, Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAcP) belongs to a group of metalloenzymes of widespread occurrence in the organism with functions in both the skeleton and the immune system. TRAcP is synthesized as a proenzyme composed of monomeric TRAcP (mTRAcP)/loop-TRAcP/serum TRAcP 5a. Proteolytic processing of the 5a isoform generates cleaved TRAcP 5b isoform that displays at least tenfold increased catalytic activity [18–21] and exerts several biological actions in bone including the dephosphorylation of both osteopontin and integrin-binding sialoprotein [22,23], the generation of reactive oxygen species for bone matrix degradation [24] and may be implicated in autoimmune disorders regulated by Th1 inflammatory responses [25]. Through the expression of TRAcP, osteoclasts, macrophages and dendritic cells play a critical role in skeletal development, the mineralization of bone, cytokine production and macrophage recruitment, maturation of dendritic cells, and collagen synthesis and degradation.

Finally, C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX), which is a component of the ECM, was found to show a positive association with bone formation in children aged 6–10 years and may be of use for monitoring skeletal development [26]. Moghaddam and collaborators analyzed serum levels of TRAcP 5b and CTX in 15 patients with delayed union in long bones that were then compared with 15 patients that consolidated normally, finding significantly different CTX levels at week 1, as well as for TRAcP 5b at weeks 4 and 8 [27].

### TGF- $\beta$ 1 as candidate biomarker of bone healing

TGF- $\beta$ 1 is a regulatory protein from the TGF- $\beta$  family that plays a pivotal role in the process of fracture healing by enhancing the proliferation and differentiation of mesenchymal progenitors and stimulating the production of ECM and chemotaxis of bone cells. It also has a key role promoting cartilage synthesis and increases the formation of callus and bone strength [16,28]. From the list of biomarkers described previously, TGF- $\beta$ 1 concentrates most of the scarce literature available on this topic and also highlights the need to fulfil two important requirements in the search for novel indicators of bone healing status and/or predictive of expected outcomes, namely: understanding of the biological meaning of difference between levels of nonunion and successful bone union at a given time for prognostic prediction; and definition of the minimum levels of biomarker at a given time predictive of eventual successful bone union. Zimmermann and colleagues observed that, 4 weeks after trauma, serum levels of TGF- $\beta$ 1 were significantly lower in patients with delayed union. These findings support the role of TGF- $\beta$ 1 in fracture healing and suggest that premature drops in serum levels of TGF- $\beta$ 1 below 45 ng/ml at 4 weeks post-intervention are indicative of impaired healing [29]. In a later study, however, results from Sarahrudi and colleagues conflicted with those from Zimmermann's work, showing a flatter profile of TGF- $\beta$ 1 levels along the follow-up time without significant differences among time points [30]. This brings up a third important point to consider, raised by Zhao and collaborators, who demonstrated the impact of blood handling processing on the measured levels of circulating TGF- $\beta$ 1. Importantly, they showed that: sample type (serum or plasma); waiting time; temperature; and centrifugal force, all these parameters influenced in the levels of TGF- $\beta$ 1 measured by ELISA. Indeed reliability and comparability of results is required for standardized methods but none of the previous studies provided details regarding the procedure of sample handling. Therefore, new studies must take into account and describe thoroughly how the sample is manipulated in order to draw valid conclusions from results obtained.

### TGF- $\beta$ 1 from platelets

The preparation of the fracture site prior to its treatment on the surgery day triggers an inflammatory response, which peaks 24 h later and is complete by the first week (Figure 2). During this time period, a complex cascade of proinflammatory signals and growth factors are released in a temporally and spatially controlled manner. Elevated levels of inflammatory mediators such as IL-1, IL-6, IL-11, IL-18 and TNF- $\alpha$  exert a recruiting effect on inflammatory cells and also promote angiogenesis within the first few days. In this initial inflammatory phase, platelets, which are small cellular fragments deriving from megakaryocytes, are activated by injury to blood vessels at the fracture site and stimulate proliferative capacity of different cell types by releasing intracellular granules rich in PDGF, FGF-2 and TGF- $\beta$ 1 (Figure 2) [31]. Both *in vitro* and *in vivo* data supports that platelet-derived products hold tissue regenerative properties [32]. In addition, osteoprogenitor cells contribute to the *milieu* of tissue regenerative signals at the fracture site by expressing bone morphogenetic proteins. These factors along with inflammatory mediators play a key role in the recruitment of mesenchymal progenitors and promote their proliferation and osteogenic differentiation. In fact, bone forming cells are modulated by TGF- $\beta$ 1 in an autocrine

fashion, which could explain as to why TGF- $\beta$ 1 receptors are highly expressed in osteoblasts [33], while articular cartilage contains high concentration of latent TGF- $\beta$ 1 detected by immunochemical assays in chondrocytes [34].

Platelets are the main reservoir of TGF- $\beta$ 1 in the human body, at levels 40–100 higher than other tissues [35], therefore their activation or degranulation during sample processing can result in misleading values of TGF- $\beta$ 1 levels [36]. Zhao and collaborators evaluated the influence of different parameters such as temperature, sample type (serum or plasma) and centrifugal force on TGF- $\beta$ 1 levels, concluding that the optimal procedure to measure circulating TGF- $\beta$ 1 levels is by using plasma obtained at high speed centrifugation immediately after blood extraction from patients or after a short time under refrigerated conditions [37].

### Analysis of TGF- $\beta$ 1 levels

Bead-based multianalyte profiling platforms, such as Luminex, offer some advantages over traditional ELISA techniques, including reliability of values from a broad range of concentrations (which makes possible to determine TGF- $\beta$ 1 levels in patients but also from experimental studies *in vitro* and in laboratory animals following the same technique and commercial kits), reproducibility, sensitivity, specificity, multiplex capabilities and ease to use (Table 1). When using blood samples, standardization of handling procedures is essential [36] and can be summarized as described next:

- Collection of peripheral blood in tubes containing 1.6 mg EDTA/ml;
- Cooling down of blood samples on ice for 5 min;
- Immediately next, centrifugation of samples at 2500  $\times$ g for 30 min at 4°C;
- Recovery of 1 ml of the upper a third phase of the plasma obtained by centrifugation;
- Storage at -80°C until analysis.

These analytical techniques and procedures can be validated by taking advantage of the osteogenic potential of mesenchymal progenitors, which can be differentiated *in vitro* in the presence of osteogenic media thus recapitulating osteogenesis in clean, test conditions without interference from molecules secreted by platelets [38,39]. In fact, multipotent mesenchymal stromal cells derived from bone marrow are an attractive stem cell source not only for *in vitro* testing but also for the regeneration of damaged tissues due to their osteogenic capacity, which has been investigated intensively [40] and recently translated to the clinical setting resulting in the successful treatment of pseudoarthrosis in combination with bone particles from tissue bank [41].

### Conclusion & future perspective

We envisage the use of clinically validated biomarkers predictive of bone union, in a much earlier time shift than current clinico-radiological diagnostic parameters, by measuring circulating molecules, which will result in a better clinical management of patients with a significant social and economic impact.

#### Executive summary

##### Background

- Patients with delayed bone union or pseudoarthrosis have to wait 9 months for proper diagnosis by imaging and further treatment.

##### Biomarkers of bone healing

- Biomarkers predictive of bone healing are urgently needed to enhance current clinico-radiological diagnostic parameters of delayed bone-union or pseudoarthrosis.

##### TGF- $\beta$ 1 as candidate biomarker of bone healing

- The lack of clinical data of high level of evidence, particularly from properly powered randomized clinical trials, makes difficult to set which biomarkers predictive of non-union could be reliably used for following up patients.

##### Analysis of TGF- $\beta$ 1 levels

- Methodologies required for assessment of biomarker levels present several disadvantages, from sample handling to detection methodologies, which are not commonly described in the literature and far from standardisation.

##### Outlook

- More research (*in vitro*, preclinical and clinical in a coordinated manner) is needed in order to find a robust biomarker (or panel of biomarkers) with predictive value of bone healing after surgical treatment.

**Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge C Mirabel and D Vivas for critical review of the manuscript.

**Financial & competing interests disclosure**

Work in our laboratory is supported by the Spanish Cell Therapy Network (TerCel, expedient No. RD16/0011/0028) and developed in the context of AdvanceCat with the support of ACCIÓ (Catalonia Trade & Investment, Generalitat de Catalunya) under the Catalanian ERDF operational program (European Regional Development Fund) 2014–2020.

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

**References**

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

- 1 Wheelless CR III. Wheelers Online Orthopaedic Textbook. [www.wheelsonline.com/](http://www.wheelsonline.com/)
- 2 Praemer A, Fumer S, Rice Dp, Kelsey JI. *Musculoskeletal injuries*. American Academy of Orthopaedic Surgeons, IL, USA, 85–124 (1992).
- 3 Giannoudis P, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38(Suppl. 4), S3–S6 (2007).
- **Definition of the 'diamond concept' for the successful treatment of pseudoarthrosis.**
- 4 Rutkovskiy A, Stenslokken K, Vaage J. Osteoblast differentiation at a glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 22, 95–106 (2016).
- 5 Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein L. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12(2), 126–131 (2011).
- 6 Pountos I, Georgouli T, Pneumaticos S, Giannoudis PV. Fracture nonunion: can biomarkers predict outcome? *Injury* 44(12), 1725–1732 (2013).
- **Excellent review on biomarkers.**
- 7 Sousa CP, De Azevedo JT, Reis RL, Gomes ME, Dias IR. Short-term variability in biomarkers of bone metabolism in sheep. *Lab. Anim. (NY)* 43(1), 21–26 (2014).
- 8 Hauschka PV, Mavrikos AE, Iafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J. Biol. Chem.* 261(27), 12665–12674 (1986).
- 9 Hurley MM, Abreu C, Gronowicz G, Kawaguchi H, Lorenzo J. Expression and regulation of basic fibroblast growth factor mRNA levels in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 269(12), 9392–9396 (1994).
- 10 Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* 8(2), 95–114 (1987).
- 11 Thomas KA. Fibroblast growth factors. *FASEB J.* 1(6), 434–440 (1987).
- 12 Weksler NB, Lunstrum GP, Reid ES, Horton WA. Differential effects of fibroblast growth factor (FGF) 9 and FGF2 on proliferation, differentiation and terminal differentiation of chondrocytic cells *in vitro*. *Biochem. J.* 342(Pt 3), 677–682 (1999).
- 13 Granchi D, Devescovi V, Pratelli L *et al*. Serum levels of fibroblast growth factor 2 in children with orthopedic diseases: potential role in predicting bone healing. *J. Orthop. Res.* 31(2), 249–256 (2013).
- 14 Garner P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone* 66, 46–55 (2014).
- 15 Gödel S, Lienau J, Rammoser U *et al*. FGF23 is a putative marker for bone healing and regeneration. *J. Orthop. Res.* 27(9), 1141–1146 (2009).
- 16 Pountos I, Georgouli T, Henshaw K, Bird H, Giannoudis PV. Release of growth factors and the effect of age, sex, and severity of injury after long bone fracture. A preliminary report. *Acta Orthop.* 84(1), 65–70 (2013).
- 17 Wang CJ, Yang KD, Ko JY, Huang CC, Huang HY, Wang FS. The effects of shockwave on bone healing and systemic concentrations of nitric oxide (NO), TGF- $\beta$ 1, VEGF and BMP-2 in long bone nonunions. *Nitric Oxide* 20(4), 298–303 (2009).
- 18 Fagerlund KM, Ylipahkala H, Tiitinen SL *et al*. Effects of proteolysis and reduction on phosphatase and ROS-generating activity of human tartrate-resistant acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 449(1–2), 1–7 (2006).
- 19 Funhoff EG, Ljusberg J, Wang Y, Andersson G, Averill BA. Mutational analysis of the interaction between active site residues and the loop region in mammalian purple acid phosphatases. *Biochemistry* 40(38), 11614–11622 (2001).
- 20 Lang P, Andersson G. Differential expression of monomeric and proteolytically processed forms of tartrate-resistant acid phosphatase in rat tissues. *Cell Mol. Life Sci.* 62(7–8), 905–918 (2005).
- 21 Ljusberg J, Ek-Rylander B, Andersson G. Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesized as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases. *Biochem. J.* 343(Pt 1), 63–69 (1999).
- 22 Ek-Rylander B, Andersson G. Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase. *Exp. Cell Res.* 316(3), 443–451 (2010).

- 23 Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269(21), 14853–14856 (1994).
- 24 Halleen JM. Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Anticancer Res.* 23(2A), 1027–1029 (2003).
- 25 Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 41(3), 218–223 (2008).
- 26 Herrmann D, Intemann T, Lauria F *et al*. Reference values of bone stiffness index and C-terminal telopeptide in healthy European children. *Int. J. Obes. (Lond.)* 38(Suppl. 2), S76–S85 (2014).
- 27 Moghaddam A, Muller U, Roth HJ, Wentzensen A, Grutzner PA, Zimmermann G. TRACP 5b and CTX as osteological markers of delayed fracture healing. *Injury* 42(8), 758–764 (2011).
- 28 Patil AS, Sable RB, Kothari RM. An update on transforming growth factor-beta (TGF-beta): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J. Cell Physiol.* 226(12), 3094–3103 (2011).
- 29 Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury* 45(Suppl. 2), S8–S15 (2014).
- 30 Sarahrudi K, Kaiser G, Thomas A *et al*. The influence of low molecular weight heparin on the expression of osteogenic growth factors in human fracture healing. *Int. Orthop.* 36(5), 1095–1098 (2012).
- 31 Fekete N, Gadelorge M, Furst D *et al*. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* 14(5), 540–554 (2012).
- 32 Pietramaggiore G, Kaipainen A, Czeuczuga JM, Wagner CT, Orgill DP. Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 14(5), 573–580 (2006).
- 33 Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor-beta: potential common mechanisms mediating its effects on embryogenesis, inflammation-repair, and carcinogenesis. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.* 14(4), 435–439 (1987).
- 34 Grimmud E, Heymann D, Redini F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(3), 241–257 (2002).
- 35 Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 258(11), 7155–7160 (1983).
- 36 Jeon JH, Kim YS, Choi EJ *et al*. Implication of co-measured platelet factor 4 in the reliability of the results of the plasma transforming growth factor-beta 1 measurement. *Cytokine* 16(3), 102–105 (2001).
- 37 Zhao L, Wang L, Ji W, Lei M, Yang W, Kong FM. The influence of the blood handling process on the measurement of circulating TGF-beta1. *Eur. Cytokine Netw.* 23(1), 1–6 (2012).
- **Highlights the influence of sample handling on the levels of TGF-β1, particularly: temperature, waiting times and centrifuge step.**
- 38 Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J. Cell Biochem.* 64(2), 295–312 (1997).
- 39 Grassel S, Stockl S, Jenzi-Lanzl Z. Isolation, culture, and osteogenic/chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol.* 879, 203–267 (2012).
- 40 Griffin M, Iqbal SA, Bayat A. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *J. Bone Joint Surg. Br.* 93(4), 427–434 (2011).
- 41 Prat S, Gallardo-Villares S, Vives M *et al*. Clinical translation of a mesenchymal stromal cell-based therapy developed in a large animal model and two case studies of the treatment of atrophic pseudoarthrosis. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* doi: 10.1002/term.2323 (2016) (Epub ahead of print).
- 42 Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M *et al*. TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 36(5), 779–785 (2005).
- **Levels of TGF-β1 were studied in human samples.**
- 43 Zimmermann G, Moghaddam A, Reumann M *et al*. [TGF-beta1 as a pathophysiological factor in fracture healing]. *Unfallchirurg* 110(2), 130–136 (2007).
- 44 Ohishi T, Takahashi M, Yamanashi A, Suzuki D, Nagano A. Sequential changes of bone metabolism in normal and delayed union of the spine. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466(2), 402–410 (2008).
- 45 Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vecsei V, Aharinejad S. VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. *J. Orthop. Res.* 27(10), 1293–1297 (2009).
- 46 Sarahrudi K, Mousavi M, Thomas A *et al*. Elevated levels of macrophage colony-stimulating factor in human fracture healing. *J. Orthop. Res.* 28(5), 671–676 (2010).
- 47 Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M *et al*. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) levels in human fracture healing. *Injury* 42(8), 833–837 (2011).
- **Levels of TGF-β1 were studied in humans following the same methodology as Reference 42 resulting in contradictory findings.**

Toward the clinical use of circulating biomarkers predictive of bone union Perspective

- 48 Singh A, Sabir A, Mahdi AA, Srivastava RN. Evaluation of serum alkaline phosphatase as a biomarker of healing process progression of simple diaphyseal fractures in adult patients. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2(2), 40–43 (2013).



