

**UNIVERSIDAD DE LEÓN**



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CIRUGÍA Y  
ANATOMÍA VETERINARIA**

**EFECTO DE LA IMPLANTACIÓN DE CELULAS  
MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSEO  
DIFERENCIADAS A OSTEÓBLASTOS EN LA  
REPARACIÓN DE DEFECTOS CAVITARIOS DEL  
FÉMUR EN UN MODELO EXPERIMENTAL  
OVINO**

**Andrés Saldaña Díaz**

**- 2010-**



*A Blanca, María y Andrés*



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quería expresar mi agradecimiento a Blanca, por su ayuda y paciencia, sin las cuales no hubiera tenido la fuerza necesaria para desarrollar este trabajo; y al resto de mi familia, por su continuo apoyo personal y profesional.

Agradecer de manera muy especial al Dr. Luis R. Ramos Pascua, ejemplo de constancia, trabajo y resolución, por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto y trabajar a su lado, desde el más profundo respeto que le profeso.

Al Dr. Javier Iglesias y a todos los profesionales del Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco, por facilitarme los medios y la colaboración necesaria para desarrollar el trabajo, del cual son protagonistas indiscutibles; y especialmente a Marta, cuyo trabajo y entrega, a pesar de las dificultades iniciales, fueron fundamentales.

Al Dr. Manuel Gonzalo-Orden y a todo el personal de la Facultad de Veterinaria de León que me ayudaron (Marta, Jose, Victor..), que colaboraron decisivamente en el trabajo y me permitieron retomar el pulso al ambiente universitario.

Al personal de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial de León, en especial al Dr. Francisco Izquierdo y a Raquel, que me enseñaron y participaron en la interpretación anatómo-patológica de las muestras de manera desinteresada.

Al Dr. Rafael González Celador, profesor Titular de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Salamanca, por su amabilidad y cercanía, al que no pudimos incluir como co-director del estudio por motivos administrativos, mereciéndoselo, cuyos conocimientos y asesoramiento estadístico fueron básicos en el trabajo.

Al Dr. Fernández del Busto y a Domingo Vega, por haberme ayudado a abrirme paso, desde el principio, en el camino de la Medicina.

Finalmente, a mis compañeros y al personal no facultativo del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial de León, a los que tanto debo, que me han soportado durante 5 años de trabajo

## CONFLICTO DE INTERESES

Parte de este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación obtenida de los siguientes proyectos de investigación:

1. *Efecto de la inyección percutánea de células mesenquimales de tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos embebidas en un gel de plasma rico en plaquetas (PRP) en la reparación de defectos cavitarios del fémur.* Proyecto de investigación en biomedicina, biotecnología y ciencias de la salud de la Gerencia Regional de Salud del Sacyl aprobado por Resolución de 18 de agosto de 2008, con una dotación de 38.000 euros (código GRS/291/A/08).
2. *Evolución radiográfica del implante de células mesenquimales de tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos embebidas en plaquetas durante la reparación de defectos cavitarios del fémur.* Proyecto de investigación financiado por la Fundación MAPFRE en las Ayudas de Investigación 2008.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1. El hueso. Anatomía y fisiología.....	2
1.1 Estructura.....	2
1.2 Composición.....	3
1.2.1 Mátriz ósea.....	3
1.2.1.1 Fracción orgánica.....	4
1.2.1.2 Fracción inorgánica.....	5
1.2.2 Células óseas.....	5
1.2.2.1 Osteoblastos.....	5
1.2.2.2 Osteocitos.....	6
1.2.2.3 Células osteoprogenitoras.....	6
1.2.2.4 Osteoclastos.....	6
1.3 Biomecánica.....	7
1.3.1 Biomecánica del hueso esponjoso.....	8
1.3.2 Biomecánica del hueso cortical.....	8
1.4 Dinámica del tejido óseo.....	9
1.4.1 Crecimiento óseo.....	9
1.4.2 Modelado óseo.....	10
1.4.3 Remodelado óseo .....	10
1.4.4 Reparación o consolidación ósea .....	12
2. Defectos patológicos del hueso .....	12
3. Injertos y sustitutivos óseos.....	15
3.1 Injertos óseos .....	16
3.1.1 Autoinjerto o injerto autólogo.....	16
3.1.2 Homoinjerto o aloinjerto.....	17
3.1.3 Isoinjerto o injerto singénico .....	18
3.1.4 Xenoinjerto o heteroinjerto.....	19
3.1.5 Injerto óseo vascularizado.....	19
3.2 Andamiajes sintéticos.....	20
3.2.1 Cerámicas.....	20
3.2.1.1 Cerámicas bioabsorbibles.....	20
3.2.1.1.1 Fosfato cálcico.....	21
3.2.1.1.2 Fosfato tricálcico .....	22
3.2.1.1.3 Hidroxiapatita .....	22
3.2.1.1.4 Sulfato cálcico.....	24



3.2.1.2 Cerámicas bioactivas.....	24
3.2.1.3 Cerámicas bioinertes.....	24
3.2.2 Polímeros.....	24
3.3 Biomateriales.....	25
3.3.1 Matriz ósea desmineralizada.....	25
3.3.2 Colágeno .....	26
3.3.3 Sustitutos óseos sintéticos .....	26
3.4 Compuestos “Lincon-Based”.....	27
3.4.1 Cristales bioactivos.....	27
3.4.2 Vidrio ionomérico.....	27
3.4.3 Sustratos osteoconductivos no biológicos .....	27
3.5 Injertos combinados.....	28
4. Ingeniería Tisular.....	29
4.1 Introducción .....	29
4.2 Células.....	30
4.2.1 Conceptos.....	30
4.2.2 Biología de las MSCs.....	32
4.2.2.1 Fase expansiva.....	32
4.2.2.2 Plasticidad celular... ..	32
4.2.2.3 Heterogenicidad ... ..	33
4.2.2.4 Capacidad inmunógen .....	33
4.2.2.5 Adhesión celular .....	33
4.2.3 Obtención de las MSCs.....	34
4.2.4 Aislamiento de las MSCs.....	35
4.2.5 Diferenciación de las células troncales mesenquimales.....	37
4.2.6 Células troncales procedentes del tejido graso.....	38
4.3 Matrices.....	40
4.4 Factores de crecimiento .....	40
5. Estado actual del problema.....	43
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	45

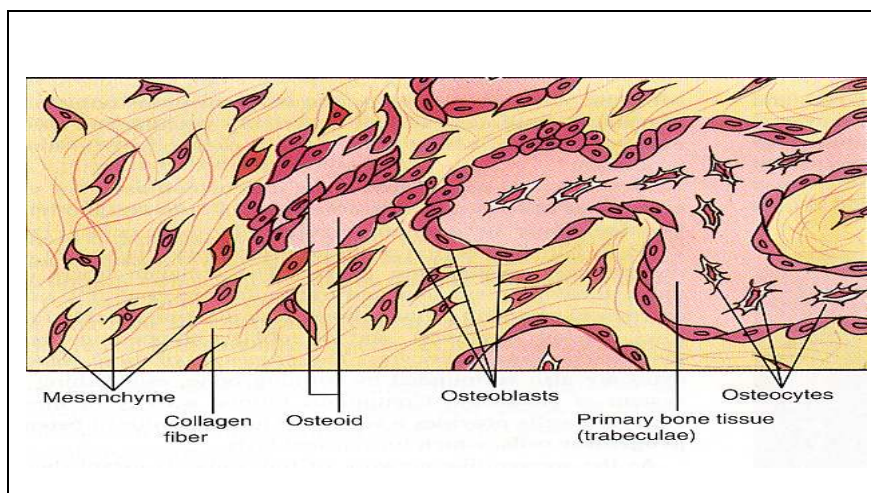
3. MATERIAL Y MÉTODO.....	48
3.1 Diseño del estudio .....	49
3.2 Ámbito del estudio.....	50
3.3 Obtención de las muestras.....	51
3.4 Materiales, conceptos y clasificaciones.....	54
3.5 Cronograma y fases del estudio.....	60
3.6 Métodos instrumentales .....	62
3.7 Manejo y análisis de la información .....	77
3.8 Limitaciones del estudio .....	78
4. RESULTADOS.....	79
4.1 Resultados de la puesta a punto del trabajo .....	80
4.2 Resultados radiológicos .....	84
4.3 Resultados anatomopatológicos .....	96
4.4 Resultados histomorfométricos.....	105
5. DISCUSIÓN.....	112
5.1 Discusión general .....	113
5.2 Discusión del método .....	123
5.3 Discusión de los resultados .....	127
6. CONCLUSIONES .....	132
7. BIBLIOGRAFÍA.....	134



# INTRODUCCIÓN

## 1. EL HUESO. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

El tejido óseo es una variedad especial de tejido conjuntivo que está compuesto por células y sustancia intercelular (Figura 1.1). La característica que lo distingue es la mineralización de su sustancia intercelular, lo que le imparte gran dureza y lo hace capaz de proporcionar sostén y protección. Además, desempeña un importante papel en la regulación de la calcemia.



**Fig. 1. 1.**  
*Representación esquemática de los componentes óseos. Tomado de Gartner Hiatt<sup>1</sup>.*

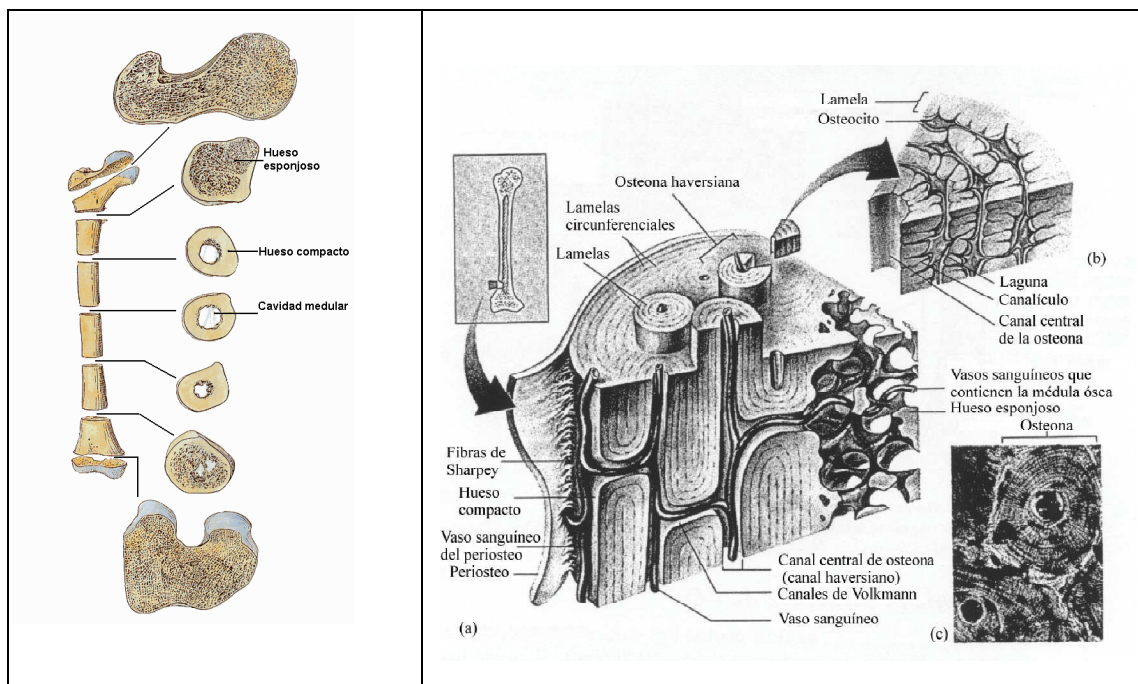
### 1.1. ESTRUCTURA

Los huesos son órganos del sistema esquelético y, como el resto de los órganos, están compuestos de varios tejidos: tejido óseo, otros tejidos conjuntivos de varias clases (hematopoyético, adiposo), vasos sanguíneos, nervios y cartílago hialino o fibrocartílago. La capacidad de los huesos para desempeñar su función esquelética se debe a los tejidos óseo y cartilaginoso<sup>2</sup>.

Macroscópicamente el hueso puede dividirse en una parte externa denominada cortical, o hueso compacto, que representa el 70% del total del esqueleto, y una parte interna, denominada trabecular o esponjoso (Figura 1.2). Dicha estructura permite una función mecánica óptima con un peso mínimo.

Estructuralmente se distinguen 2 tipos de tejido óseo: primitivo y adulto. El primero, también denominado fibroso, embrionario, fetal, inmaduro o reticular, está formado por fibras colágenas orientadas en fascículos irregulares, de forma anárquica, y tiene menor capacidad de carga, con osteocitos de mayor tamaño y número. Es el tejido del recién nacido, formado por osificación endocranal o membranosa; o el que aparece cuando se forma tejido óseo rápidamente en un proceso patológico (metástasis osteoblásticas, enfermedad de Paget, etc) o fisiológico (callo de fractura, zonas de crecimiento). Este tejido será sustituido por tejido óseo adulto, también conocido como laminar, secundario o maduro.

El tejido óseo adulto está formado por laminillas adosadas, cada una de las cuales contiene fibras de colágeno dispuestas en una misma dirección, aunque distinta a la de las laminillas adyacentes. Según la organización de las laminillas podemos distinguir 2 variedades: tejido óseo adulto esponjoso y compacto (que definen el hueso trabecular y el hueso cortical) (Figuras 1.2 y 1.3). Ambos presentan los mismos elementos, pero diferente estructura y función. Estructuralmente, el 80-90% del volumen cortical está calcificado (15-25% de volumen trabecular, que tiene mayor superficie que el hueso cortical); mientras que funcionalmente el hueso cortical tiene una misión mecánica y protectora, en tanto que la del hueso trabecular es metabólica.



**Figs. 1.2 y 1.3.** A la izquierda, esquema de la morfología macroscópica del hueso compacto y esponjoso. A la derecha, estructura microscópica del hueso cortical: (a) esquema tridimensional del hueso compacto mostrando sus unidades estructurales (sistemas haversianos); (b) corte de un sistema haversiano, donde se muestra la situación de los osteocitos dentro de las lagunas; y (c) fotomicrografía de un sistema haversiano completo. Tomada de Fridez y cols<sup>3</sup>.

## 1.2. COMPOSICIÓN

El hueso está formado principalmente por matriz ósea (orgánica e inorgánica), células y agua.

### 1.2.1 Matriz ósea

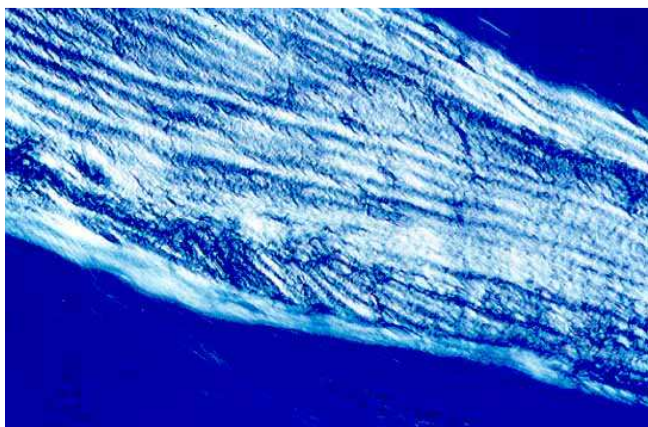
La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del tejido óseo, de tal manera que el hueso esponjoso se encuentra mineralizado en alrededor de un 99.2 % y el cortical en un 99.9 %. La matriz ósea no mineralizada recibe el nombre de osteoide y representa menos del 1.0 % del volumen total, pudiendo observarse en

forma de ribetes de unos 10  $\mu\text{m}$  de espesor revistiendo algunas trabéculas y cavidades intracorticales. El periodo de latencia entre el depósito del osteoide y su mineralización oscila entre unos 10 y 20 días.

La mineralización se inicia en la interfaz entre el osteoide y el hueso preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de espesor que se denomina frente de mineralización. A medida que este frente se desplaza, va dejando tras de sí una matriz ósea mineralizada en forma de cristales de hidroxiapatita. La matriz ósea está conformada por una fracción orgánica, cuyo peso representa alrededor de un 25.0 %, y una fracción inorgánica que equivale a un 75.0 %.

### 1.2.2.1 Fracción orgánica

La matriz orgánica del hueso se parece a la matriz del tejido fibroso denso, como son los cartílagos articulares. Está formada por colágeno, principalmente del tipo I, con pequeñas cantidades del tipo V y XII, constituyendo el 90 por ciento de la matriz orgánica (Figura 1.3). El 10 por ciento restante está formado por glicoproteínas no colágenas y otras sustancias específicas del hueso. Dota al hueso de su forma y contribuye a la capacidad de resistencia a la tracción, mientras que la fracción inorgánica o mineral contribuye a la resistencia a la compresión.



**Fig. 1.4.** Imagen de la disposición de las fibras de colágeno mediante luz polarizada. En el hueso maduro las fibras de colágeno se disponen en láminas paralelas. Tomada de Gurley y cols <sup>4</sup>.

Lo que se conoce como sustancia interfibrilar, amorfa o fundamental da cohesión a las fibras de colágeno y representa el 5% de la sustancia orgánica. Está formada por precursores del colágeno, mucoproteínas, lípidos en escasa proporción y mucopolisacáridos. Estos son la fracción más importante, incluyendo ácido hialurónico, condroitín sulfato y queratán sulfato. Los mucopolisacáridos son moléculas muy hidrófilas con grupos carboxílicos en su composición, polianiones y grupos sulfato, lo que hace que presenten apetencia por iones calcio.

Finalmente, en el sistema lámino-canalicular (15%), embebiendo las fibras de colágeno, los mucopolisacáridos y los cristales minerales (85%), se encuentra el agua intersticial, cuya cantidad varía en relación inversa a la mineralización y al grado de polimerización de los mucopolisacáridos.

### **1.2.2.2 Fracción inorgánica**

La fracción inorgánica o mineral de la matriz ósea realiza dos funciones esenciales: sirve de reserva de iones y confiere al hueso la mayor parte de su rigidez y resistencia. Aproximadamente el 90% del calcio del cuerpo, el 85% del fósforo y entre un 40 y un 60% del total del sodio y magnesio del cuerpo se encuentra en los cristales minerales óseos, que suponen cerca de dos tercios del peso seco total del hueso a modo de pequeños cristales en forma de agujas, placas y bastoncillos alrededor de las fibras de colágeno. Químicamente se trata de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), aunque no de forma pura sino como otros constituyentes (carbonato, citrato, magnesio, sodio, flúor y estroncio). También existe una pequeña proporción de citratos, sodio, magnesio y hierro. El principal componente es el fosfato cálcico formando la hidroxiapatita. Entre los cristales existen espacios ocupados por mucopolisacáridos, iones y agua intersticial, si bien fuera de los cristales existe una capa iónica (carbonato, magnesio, sodio, citrato, etc) y por fuera de esta capa de hidratación, un intercambio iónico entre el cristal y el agua.

### **1.2.2. Células óseas**

Existen 4 tipos celulares que se asocian con el tejido óseo: las células de revestimiento óseo u osteoprogenitoras, el osteoblasto, el osteocito y el osteoclasto (Figura 1.5). Este último es el único de los 4 tipos celulares que tiene su origen en una línea celular diferente, mientras que el resto pueden considerarse como una forma modulada del mismo tipo celular.

#### **1.2.2.1. Osteoblastos**

El osteoblasto es la célula diferenciada formadora de hueso que se encarga de sintetizar la matriz ósea. Secreta colágeno y la sustancia fundamental que constituye el hueso inicial no mineralizado u osteoide. También participa en la calcificación de la matriz. El proceso de calcificación parece ser iniciado por los osteoblastos mediante la secreción hacia la matriz de pequeñas vesículas matriciales (50-250 nm) que están limitadas por una membrana. Estas vesículas son ricas en fosfatasa alcalina, que se secreta sólo durante el periodo en el que la célula produce matriz ósea.

Los osteoblastos tienen forma cuboide o poliédrica debido a su distribución monoestratificada en la superficie donde se está formando hueso. Como la matriz recién sintetizada no se calcifica de inmediato, apenas se tiñe en comparación con la matriz madura mineralizada. Su citoplasma es marcadamente basófilo y el aparato de Golgi, debido a su tamaño, a veces se ve como un área clara alrededor del núcleo. Con el microscopio electrónico se identifican prolongaciones citoplasmáticas muy delgadas que atraviesan el osteoide producido por ellos a su alrededor y que se unen a prolongaciones de células similares por medio de nexos (maculae communicans) que sirven de comunicación.



### **1.2.2.2. Osteocitos**

El osteocito es la célula ósea madura encargada del mantenimiento de la matriz. Se encuentra rodeado por ésta, que antes sintetizó como osteoblasto; es decir, que el osteocito es un osteoblasto transformado. Poseen la capacidad de sintetizar, así como de reabsorber, matriz ósea, contribuyendo a la homeostasis del calcio sérico. La muerte de los osteocitos por traumatismos o envejecimiento celular trae como consecuencia la reabsorción de la matriz por acción de los osteoclastos, seguida por reparación o remodelación del tejido óseo debido a la actividad de los osteoblastos.

Cada osteocito ocupa un espacio (laguna u osteoplasto) que se amolda a la forma lenticular de la célula. Los osteocitos extienden sus prolongaciones citoplasmáticas a través de finos túneles o canalículos en la matriz para entrar en contacto con prolongaciones de células vecinas por medio de los nexos o maculae comunicans. El osteocito es típicamente más pequeño debido a la escasa cantidad de citoplasma perinuclear.

### **1.2.2.3. Células osteoprogenitoras**

La célula osteoprogenitora suele considerarse como una célula de reposo, latente o de reserva, que puede ser estimulada para transformarse en un osteoblasto e iniciar la síntesis de matriz ósea. Se las encuentra en la superficie ósea durante el crecimiento normal y en los adultos durante la remodelación ósea. Estas células comprenden la población celular de la capa más interna (profunda) del periostio, las células endósticas que rodean la cavidad medular y las células de revestimiento de los conductos de Havers y de Volkmann. Poseen la capacidad de dividirse y proliferar. En los huesos en crecimiento, estas células aparecen aplanadas y contienen un núcleo alargado u ovoide pálido y un citoplasma acidófilo, ligeramente basófilo, poco visible. En las fotomicrografías electrónicas se aprecian cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER), ribosomas libres, un aparato de Golgi pequeño y otras organelas. La estimulación de la célula osteoprogenitora la transforma en una célula secretora más activa: el osteoblasto.

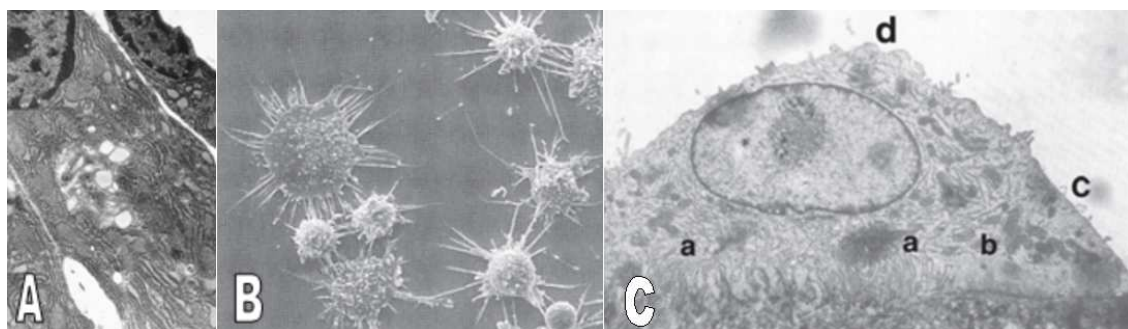
En el adulto, en quien no se está produciendo remodelación de los huesos, las superficies óseas se hallan revestidas por una capa de células muy aplanadas con citoplasma muy delgado y escasas organelas mas allá de la zona perinuclear. Estas células, que se denominan de revestimiento óseo, son análogas a las células osteoprogenitoras, aunque es probable que se encuentren en una fase más latente que aquéllas en las zonas donde se está produciendo crecimiento óseo.

### **1.2.2.4. Osteoclastos**

El osteoclasto es una célula multinucleada grande cuya función es reabsorber tejido óseo. Se originan a partir de monocitos y adquieren sus múltiples núcleos por varias replications del DNA y divisiones nucleares sin división del citoplasma, o bien por la fusión de muchos monocitos. Cuando están activos descansan directamente sobre la superficie ósea donde se producirá la reabsorción. Como resultado de su actividad se forma en el hueso inmediatamente por debajo del osteoclasto una excavación poco

profunda llamada laguna de Howship o laguna de reabsorción. La célula no es evidente por su tamaño sino también por su marcada eosinofilia.

La zona de la célula en contacto directo con el hueso puede dividirse en dos partes: 1) una región central que contiene muchos repliegues de la membrana plasmática a la manera de microvellosidades y recibe el nombre de borde desflecado o borde festoneado y 2) un perímetro de citoplasma anular menor, la llamada zona clara, que delimita más o menos el área de hueso que se está reabsorbiendo.



**Fig. 1.5.** A) Osteoblastos sobre un ribete de osteoide. El osteoide se observa como un material finamente fibrilar de color gris, por debajo del cual se sitúa el hueso mineralizado en color negro. Tomada de Ross y cols.<sup>2</sup>. B) Osteocitos aislados por inmunofluorescencia. Tomada de Klein y cols.<sup>5</sup>. C) Imagen de microscopía electrónica de un osteoclasto en función resortiva (**a** = borde rugoso, **b** = zona de sellado, **c** = membrana basal y **d** = dominio secretorio funcional). Tomada de Kalervo y cols.<sup>6</sup>.

### 1.3. BIOMECÁNICA

El hueso posee una resistencia a la tensión similar a la del hierro, pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible. El esqueleto se adapta a su función específica en el organismo tanto con respecto a su configuración como a su estructura microscópica. La naturaleza suele seguir, en general, la ley del mínimo, de tal manera que las funciones mecánicas de carga y de protección se consiguen con el mínimo peso y la máxima eficacia.

Las distintas cargas que actúan sobre los huesos del esqueleto se encuentran relacionadas con las diversas actividades del individuo, tanto compresivas, como de tracción o de cizallamiento. El hueso esponjoso trabaja principalmente a compresión, en cambio, el hueso cortical debe soportar fuerzas de compresión, tracción y cizallamiento. En líneas generales, la fase mineral del hueso le confiere su resistencia a la compresión y cizallamiento, mientras que el colágeno le proporciona su resistencia a la tracción.

El hueso responde con un patrón característico a las fuerzas aplicadas sobre su superficie, el que depende del tipo de fuerza, densidad, arquitectura y composición del tejido. La primera fase es elástica y genera una deformación temporal que se mantiene mientras actúa la fuerza, para luego recuperar su forma original. Si la fuerza aumenta, se entra en una fase plástica y el hueso, aunque se recupera parcialmente, queda deformado. Por último, cuando la fuerza aplicada es superior a la resistencia del tejido se produce la fractura.

Los huesos largos, formados fundamentalmente por tejido cortical, son elásticos y poco plásticos, por lo que su resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica de manera vertical al sentido de la carga. Cuando la fuerza actúa de forma oblicua la fase plástica se acorta y el hueso se fractura con mayor rapidez. En los huesos integrados por tejido esponjoso, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica a lo largo de su eje vertical. Estos huesos, al ser menos densos, son más plásticos y menos elásticos, por lo que pueden resistir deformaciones mayores. En los huesos esponjosos las fracturas se producen con variaciones de longitud de alrededor de un 7 %, en cambio, en los huesos corticales bastan modificaciones de alrededor de un 2 %.

### **1.3.1. Biomecánica del hueso esponjoso**

El hueso esponjoso se caracteriza por poseer una estructura porosa que se mide mediante la densidad aparente o estructural. Para diferenciar ésta de la densidad de la matriz mineralizada se debe descontar el volumen de los poros de la masa total. De esta forma, la densidad aparente es directamente proporcional a la porosidad del hueso. El aumento del área ocupada por los poros implica una disminución de las propiedades mecánicas del hueso. Por otra parte, la estructura del tejido esponjoso se adapta a la función particular de cada hueso. Así, un hueso más resistente a las sollicitaciones en flexión es el más adecuado para la absorción de energía de impactos, en cambio, en áreas como la epífisis proximal de la tibia, el hueso esponjoso presenta mayor resistencia a las sollicitaciones en carga axial.

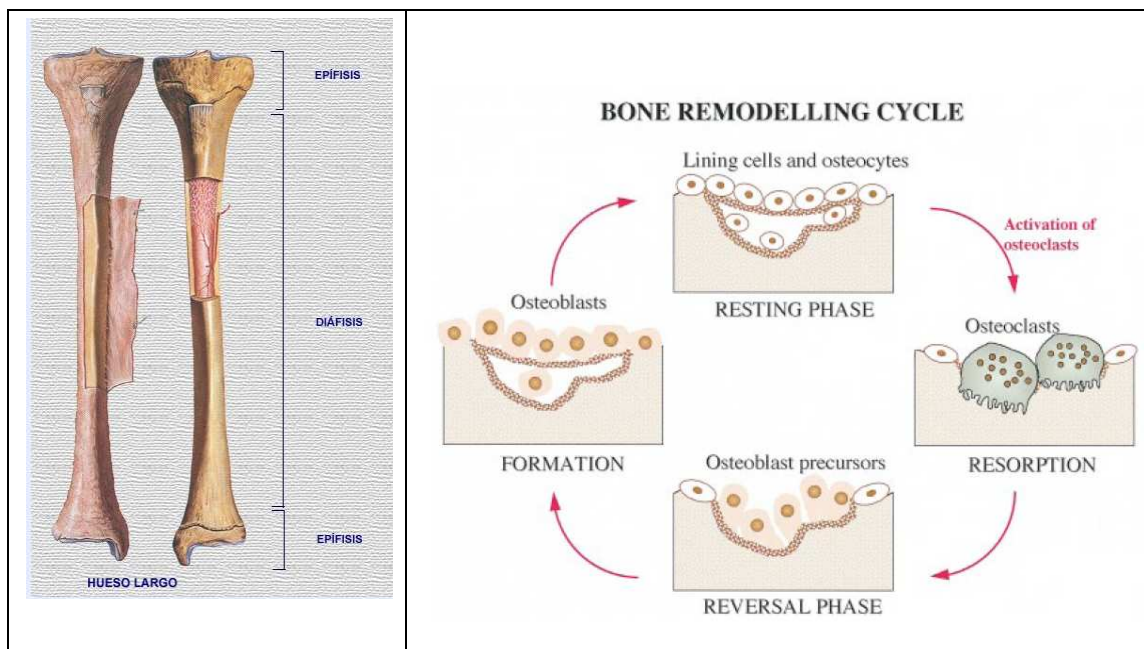
### **1.3.2. Biomecánica del hueso cortical**

El hueso cortical es altamente anisotrópico, por lo que su resistencia depende de la orientación de la carga respecto a la dirección de las osteonas. Además, en los huesos largos se admite la existencia de un isotropismo transversal cuya dirección de referencia es determinada por su eje longitudinal. De esta manera, la resistencia del hueso cortical depende de la dirección y forma en que se aplican las cargas, de modo tal que la resistencia a la compresión es mayor que a la tracción en todas las direcciones. La resistencia a la torsión suele tener un valor de, aproximadamente, un tercio de la correspondiente a la compresión.

La particular distribución del tejido óseo cortical en los huesos minimiza las tensiones generadas por las cargas fisiológicas que deben soportar. De esta forma, una estructura tubular como la diáfisis femoral es la más adecuada para enfrentar las sollicitaciones en compresión, tracción, flexión y torsión, en cambio, la sección triangular de la diáfisis tibial es óptima para absorber las sollicitaciones en flexión en el plano sagital, que predominan durante la marcha.

## 1.4. DINÁMICA DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido muy dinámico, sometido a procesos tales como el crecimiento (que en longitud depende del cartílago de crecimiento, entre la epífisis y la metáfisis (Figuras 1.6), el modelado, el remodelado y la reparación (Figuras 1.7).



**Figs. 1.6 y 1.7.** En los huesos largos, la longitud supera ampliamente a las otras dos dimensiones y presentan un cuerpo o diáfisis y dos extremidades o epífisis. La parte de la epífisis que está en contacto con la diáfisis se llama metáfisis y se extiende desde el límite diafisario hasta la línea epifisaria. Durante el crecimiento, entre la metáfisis y la epífisis se sitúa la fisis. A la derecha se representan las fases de la remodelación ósea (Fase resortiva: activación de los osteoclastos; fase de inversión o cambio: proliferación y diferenciación local de células osteoprogenitoras a osteoblastos; fase formativa: los osteoblastos forman nueva matriz ósea; y fase de descanso: los osteoblastos maduran a osteocitos diferenciados). Tomada de Hills y cols <sup>7</sup>.

### 1.4.1. Crecimiento óseo

El crecimiento óseo se inicia en la vida embrionaria y continúa hasta la pubertad por medio de la adición de hueso nuevo a la cara diafisaria de la placa de crecimiento o fisis, que es una estructura con forma de disco que se localiza entre la epífisis y la diáfisis. Su región central está constituida por cartílago hialino, en el que se diferencian cuatro capas: zona germinal, proliferativa, de cartílago hipertrófico y de cartílago calcificado.

La región periférica de la placa de crecimiento se denomina zona de Ranvier y corresponde a un anillo de sección triangular y base externa que rodea la región central de la fisis. Esta zona se encuentra constituida por células inmaduras con diferenciación condroblástica y osteoblástica. Las primeras contribuyen al crecimiento circunferencial de la placa de crecimiento y las segundas colaboran con el incremento longitudinal de la cortical diafisaria.

El crecimiento del espesor del hueso se obtiene mediante la aposición concéntrica subperióstica de tejido óseo. Las células de la capa más interna del periostio se diferencian en osteoblastos que depositan hueso sobre la superficie externa de la cortical diafisaria, a través de una osificación de tipo intramembranoso. El crecimiento óseo depende de factores genéticos y, además, es influido por factores sistémicos (hormonales) y locales (de tipo mecánico y nervioso).

### **1.4.2. Modelado óseo**

En las metafisis, el crecimiento óseo se asocia a fenómenos de reabsorción en la superficie externa y de formación ósea en la interna, mientras que en las diáfisis ocurre lo contrario. Este proceso se denomina modelado óseo y permite que los distintos huesos conserven su forma durante el crecimiento. También permite la renovación constante del esqueleto.

El modelado está programado genéticamente, pero es probable que los factores mecánicos locales también influyan sobre el mismo. Se considera que la tensión que ejerce el manguito perióstico sobre ambos extremos óseos es un factor que contribuye a que aparezcan osteoclastos sobre la superficie externa del cono metafisario.

### **1.4.3. Remodelado óseo**

Un ciclo de remodelado se inicia con la aparición de osteoclastos sobre la superficie ósea que va a ser remodelada. Los osteoclastos, que presentan en su superficie de contacto con el hueso un fruncido característico de la membrana celular, excavan el hueso subyacente dando lugar a imágenes en sacabocados conocidas como lagunas de Howship. Durante el proceso de reabsorción las células se desplazan sobre el tejido óseo mediante movimientos de vaivén que podrían compararse con los del cepillo de un carpintero. La superficie de reabsorción que cada osteoclasto abarca mediante estos desplazamientos se conoce con el nombre de dominio osteoclástico, cuya extensión es de 1,5 a 3 veces mayor que la superficie de contacto de la célula con el hueso. La fase de reabsorción de un ciclo de remodelado dura de 1 a 3 semanas, y el espesor de la capa de hueso que se reabsorbe oscila entre 50 (en el hueso esponjoso) y 100 micras (en el hueso compacto).

En el remodelado óseo se distingue una fase de reposo y una de formación. En la primera, de reposo o inversión y que dura de 1 a 2 semanas, los osteoclastos son sustituidos por células mononucleadas de citoplasma escasamente tingible. Estas células corresponden a preosteoblastos y se originan probablemente a partir de precursores medulares de estirpe fibroblástica. En la fase de formación los osteoclastos revisten la cavidad labrada por los osteoblastos, que rellenan con hueso nuevo la zona previamente excavada. Esta fase de formación, incluyendo periodos de inactividad transitoria, dura unos 3 meses (hueso trabecular y cortical).

El hueso nuevo es depositado inicialmente en forma de matriz ósea no mineralizada u osteoide, integrado principalmente por colágeno tipo I y proteoglicanos. Los osteoblastos depositan el osteoide sobre el hueso preexistente hasta formar un ribete de 8 a 10 micras de espesor medio. Con posterioridad, tras un periodo de latencia, el

osteoide se mineralizará progresivamente para dar lugar al hueso maduro. El periodo de tiempo que transcurre entre la formación de osteoide y la primera fase de su mineralización (mineralización primaria) se denomina tiempo medio de retardo de la mineralización y tiene una duración de 10 a 20 días. La mineralización primaria se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina frente de mineralización. A medida que este frente se desplaza, va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada mediante la formación de cristales de hidroxapatita. Por consiguiente, siempre que existe mineralización activa, el frente se sitúa entre el osteoide y el hueso mineralizado. La mineralización primaria es controlada activamente por los osteoblastos. Mediante este proceso el hueso nuevo alcanza en pocos días un 70% de la máxima densidad mineral posible.

Una vez completada la mineralización primaria, el hueso nuevo continua incrementando su densidad mineral, pero a una velocidad mucho menor. Este proceso se denomina mineralización secundaria, dura de 3 a 6 meses y finaliza cuando el hueso alcanza una densidad máxima del 90 al 95%.

Un ciclo de remodelado (reabsorción, inversión y formación, sin contabilizar la mineralización secundaria) dura unos 4 meses. El conjunto de osteoblastos y osteoclastos que actúan en coordinación para completar un ciclo de remodelado se denomina unidad de remodelado óseo (bone remodeling unit, BRU), en tanto que el resultado final de cada ciclo es una nueva unidad estructural ósea (bone structural unit, BSU) (Tabla 1.1).

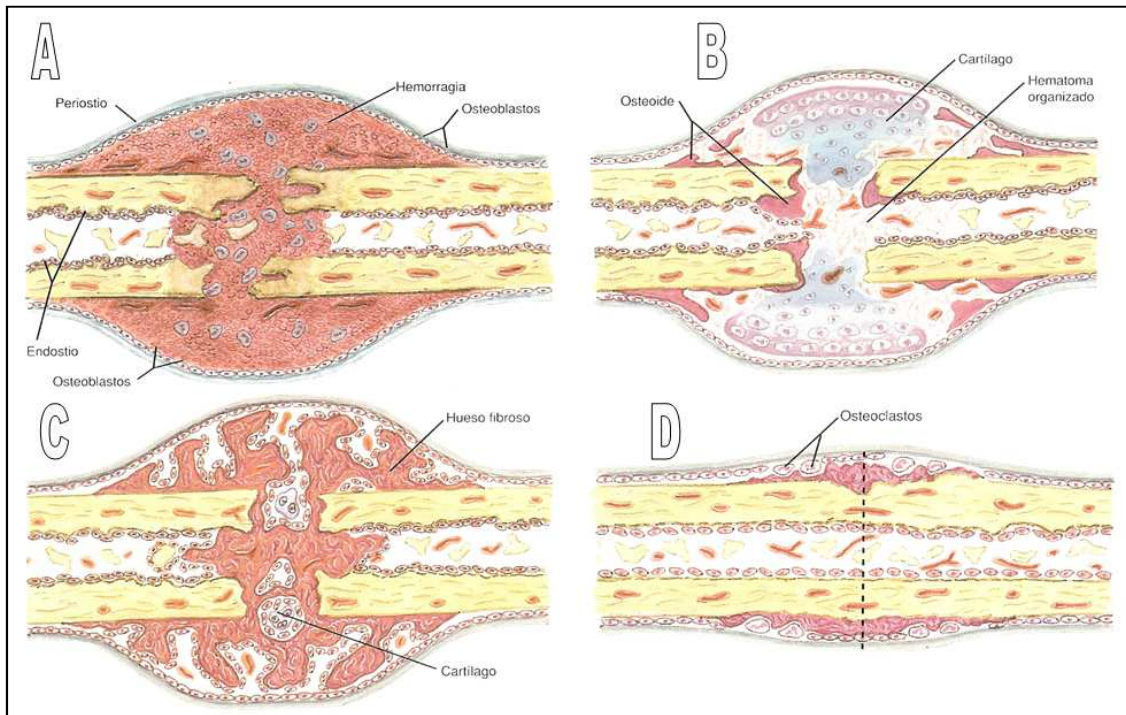
En el hueso compacto o cortical, los osteoclastos, a partir de los canales de Havers o de Volkmann, excavan túneles que después rellanarán los osteoblastos para dar lugar a nuevas BSU corticales u osteonas. Estas BSU tendrán forma cilíndrica y estarán centradas por un nuevo canal de Havers. En el hueso esponjoso, los osteoclastos, a partir de la superficie trabecular, dan lugar a excavaciones poco profundas y de base ancha que a continuación serán rellenas con hueso nuevo por los osteoblastos. Como resultado de este proceso se formarán nuevas BSU trabeculares (paquetes trabeculares, osteonas trabeculares) de forma planoconvexa (1 mm de longitud, 0,6 mm de anchura y 0,040 mm de espesor medio). Así pues, el hueso está integrado por unidades estructurales de forma y tamaño variables, que a modo de ladrillos están unidas entre sí por superficies de cementación.

	<b>Remodelado cortical</b>	<b>Remodelado trabecular</b>
Efecto de la reabsorción	Cono de reabsorción	Laguna de Howship
Duración de reabsorción	10 días	
Duración de inversión	15 días	15 días
Duración de formación	3 meses	4-6 meses
% hueso adulto remodelado/ año	4%	25%
Nº unidades funcionales activadas/hora	100	800
Resultado final: UNIDAD ESTRUCTURAL ELEMENTAL	Osteona cortical o sistema de Havers	Osteonas trabeculares

**Tabla 1.1.** Comparación del remodelado cortical con el trabecular.

### 1.4.4. Reparación o consolidación ósea

El hueso es un órgano único por su capacidad para reparar una lesión que afecta a todo su espesor mediante una regeneración completa y no mediante la producción de tejido cicatricial. Las fases de consolidación de una fractura son: el impacto y la formación del hematoma, la inducción, la inflamación, el callo blando, el callo duro y la remodelación (Figura 1.8). A medida que el proceso normal de consolidación avanza se producen cambios en el aporte sanguíneo, en la tensión de oxígeno y en el movimiento en el foco de fractura.



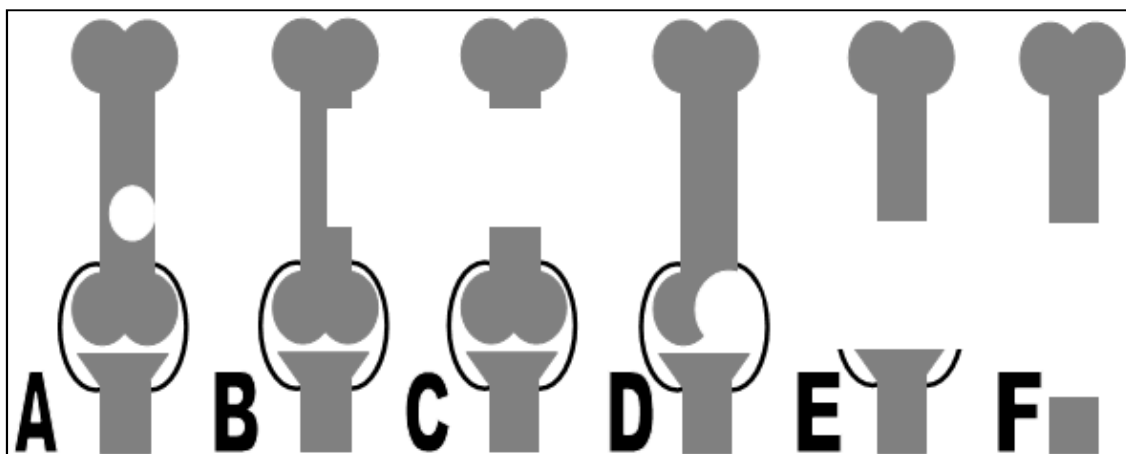
**Fig. 1.8.** Proceso de consolidación ósea. 4 fases. 1. Fase de inflamación. 2. Fase de formación de callo blando. 3. Fase de formación de callo duro. 4. Fase de remodelación. Tomada de Netter<sup>8</sup>.

## 2. DEFECTOS PATOLÓGICOS DEL HUESO

Un defecto es una carencia o imperfección de las cualidades propias de algo. En el caso del hueso sería una falta de hueso y se podrían clasificar en tres grupos (tabla 1.2), teniendo en consideración que sus distintas características pueden combinarse entre sí (Figuras 1.9-1.12).

FORMA Y TAMAÑO	LOCALIZACIÓN ANATÓMICA	TIPO DE TEJIDO ÓSEO
Defectos cavitarios Defectos segmentarios	Defectos epifisarios Defectos metafisarios Defectos diafisarios Intercales y terminales	Defectos esponjosos Defectos corticales

**Tabla 1.2.** Clasificación de los defectos óseos en función de la forma y tamaño, localización y tipo de tejido óseo afectado.



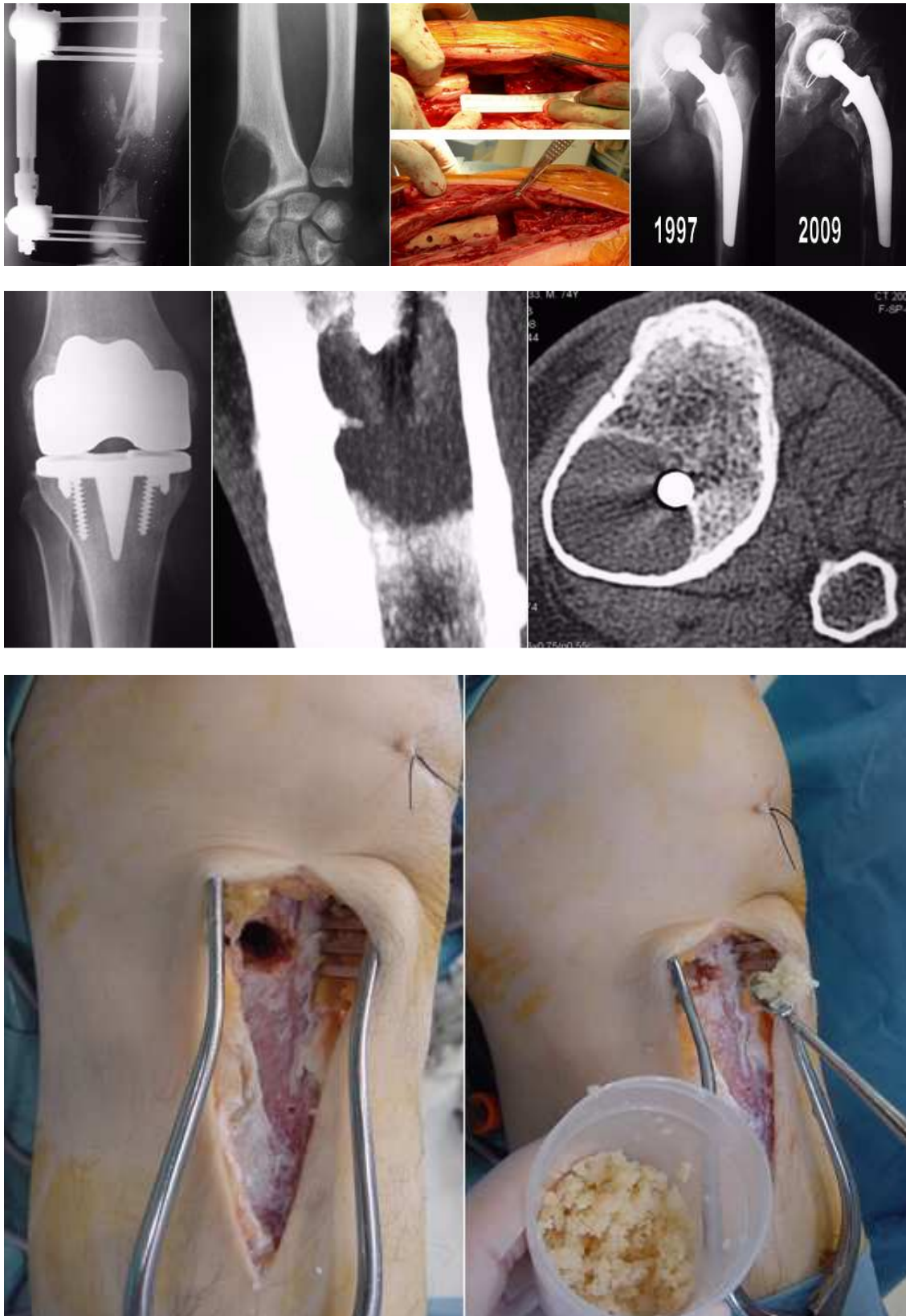
**Fig. 1.9.** Esquema de defectos óseos: intercalares (cavitario –A-; hemicortical –B-; y cortical –C-) y terminales (hemiarticulares –D-; y articulares –E y F-).

Un defecto óseo cavitario es aquél en el que existe una ausencia localizada de tejido óseo que respeta la continuidad anatómica del hueso (Figura 1.12). Estos defectos pueden tener origen tumoral como el quiste óseo simple; infeccioso, como la osteítis; metabólico, como el pseudoquiste hemofílico; o postquirúrgico. Algunas fracturas y pseudoartrosis también pueden comportarse como defectos óseos cavitarios.

En un defecto óseo segmentario el defecto provoca una solución de continuidad anatómica del hueso. Estos defectos pueden tener origen traumático, como es en la mayoría de las fracturas conminutas y en pseudoartrosis; tumoral, en lesiones benignas y malignas; o postquirúrgico, como son los grandes defectos óseos encontrados en los recambios protésicos.

El defecto óseo esponjoso epifisario es una ausencia de tejido óseo esponjoso a nivel de la epífisis del hueso, que puede ser de origen tumoral o postraumático. El defecto óseo esponjoso metafisario es una falta de hueso a nivel de la metafisis, que es un área anatómica muy rica en tejido óseo esponjoso. Suelen tener origen postraumático, como en el caso de las fracturas con hundimiento trabecular, o tumoral. El defecto óseo cortical diafisario es la ausencia de un fragmento de cortical de la diáfisis de un hueso largo, cuyo origen puede ser postquirúrgico, como en el caso de defectos secundarios a recambios protésicos, o tumoral, como en las metástasis diafisarias.





**Figs. 1.10, 1.11 y 1.12.** Ejemplos de defectos óseos de diferente naturaleza. En la fila superior, defecto postraumática, tumoral, tras la resección de los extremos óseos en una pseudoartrosis y en una enfermedad de las partículas en una artroplastia total de cadera. En la fila inferior, ejemplo de un defecto óseo cavitario en torno a un tornillo en una prótesis total de rodilla. En la fila inferior, ejemplo de defecto óseo cavitario y relleno del mismo con injerto triturado

### 3. SUSTITUTOS ÓSEOS

Los sustitutos óseos son los tejidos y materiales empleados para reparar defectos óseos con la finalidad de obtener la regeneración esquelética. Se clasifican en injertos óseos y biomateriales<sup>9</sup>, aunque pueden considerarse otros grupos, como serían los andamiajes sintéticos, los compuestos “licon-based” y los injertos combinados. Idealmente debieran poseer propiedades de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, además de ser biocompatibles, contar con la capacidad de una buena fijación biológica y poder ser biorreabsorbibles. Por fijación biológica entendemos el proceso por el que un componente implantado llega a estar firmemente unido al hueso por el crecimiento de éste sobre y hacia el interior del implante, sin la utilización del cemento óseo<sup>10</sup>. También deben tener una estructura similar a la del hueso sano, deben ser fáciles de usar y contar con una relación coste-beneficio favorable.

Históricamente, el primero que usó un sustituto del hueso fue Von Meek´eren. Durante el siglo XX el material más utilizado fue, sin embargo, el injerto óseo autógeno, que en las últimas décadas ha cedido terreno a favor del alogénico y de los andamiajes sintéticos<sup>11</sup>. En la actualidad, si bien existen muchos sustitutos óseos, el fundamental, “gold-estandar” de todos, sigue siendo el injerto autólogo de cresta iliaca (Tablas 1.3 y 1.4).

SUSTITUTOS ÓSEOS	CARACTERÍSTICAS
Osteogénesis	- Aspirado de médula ósea
Osteoinducción	- Matriz ósea desmineralizada - Proteínas morfogenéticas - Factores de crecimiento - Terapia génica
Osteoconducción	- Sulfato cálcico - Cemento de fosfato cálcico - Cerámicas - Colágeno - Polímeros sintéticos
Injertos compuestos	- Combinados

**Tabla 1.3.** *Propiedades de algunos sustitutos óseos.*

TIPO	INJERTO	OSTEOGÉNESIS	OSTEOINDUCCIÓN	OSTEOCONDUCCIÓN
Hueso	Autólogo	2	2	3
Biomateriales	DBM	0	2	1
	Colágeno	0	0	2
Cerámicas	TCP	0	0	1
	HA	0	0	1
	CPC	2	2	3
Injertos combinados	β-TCP/BMA BMP/compuestos sintéticos	-	3	-

**Tabla 1.4.** *Propiedades de diferentes tipos de sustitutos óseos (DBM: matriz ósea desmineralizada. TCP: Fosfato tricálcico. BMA: Aspirado de médula ósea. BMP: Proteínas morfogenéticas. CPC: Cemento de fosfato cálcico. 0 = nada. 3 = excelente).*

### 3.1. INJERTOS ÓSEOS

Un injerto óseo es un fragmento de tejido óseo que se implanta con fines reparativos o estéticos. El ideal es el procedente del mismo individuo en el que se va a implantar, debido a que cuenta con las tres propiedades básicas para la regeneración ósea: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción<sup>12</sup> (Tabla 1.5).

INJERTO ÓSEO	RESISTENCIA ESTRUCTURAL	OSTEOGÉNESIS	OSTEOINDUCCIÓN	OSTEOCONDUCCIÓN
Autólogo				
Esponjoso	No	+++	+++	+++
Cortical	+++	++	++	++
Alogénico				
Esponjosa Congelado	No	No	+	++
Esponjosa Liofilizado	No	No	+	++
Cortical congelado	+++	No	No	+
Cortical liofilizado	+	No	No	+

**Tabla 1.5.** *Propiedades de diferentes tipos de injertos autólogos y aloinjertos.*

#### 3.1.1. Autoinjerto o injerto autólogo

Un autoinjerto es el injerto extraído de una parte del esqueleto y transferido a otra localización en el mismo individuo<sup>13</sup>. Como ya hemos dicho, es el “gold estándar” de los sustitutos óseos, aportando óptimas propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas (Figuras 1.13 y 1.14). Además, es histocompatible y no inmunógeno, no transmite enfermedades y normalmente se incorpora bien en el sitio del injerto. Las desventajas con las que se asocia son su volumen limitado, el tiempo de intervención quirúrgica (que alarga), la pérdida hemática y la disrupción temporal de la estructura normal de la zona donante, además de las complicaciones que puede deparar (Tabla 1-6). Otra limitación a su uso es la edad y los antecedentes del donante, no pudiendo obtenerse de niños, ancianos o pacientes con enfermedades malignas.

La localización más frecuente y accesible de donde se obtiene un autoinjerto es la cresta iliaca. También podría obtenerse de la tibia, del peroné, del olecranon, del radio distal o de las costillas. En la cresta iliaca la zona donante suele ser la anterior o la posterior, de donde se podrían extraer cantidades de 12,87 ml y 30,31ml, respectivamente. En un 8,5-20% los pacientes presentan complicaciones<sup>14</sup>.



**Fig. 1.13.** *Autoinjerto esponjoso de cresta ilíaca empleado como aporte biológico en pseudoartrosis en transporte óseo.*



**Fig. 1.14.** Secuencia de incorporación de un autoinjerto estructural en la reconstrucción de un defecto óseo creado por la resección del primer metatarsiano por un tumor óseo.

<b>MENORES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infección superficial</li> <li>- Seroma</li> <li>- Hematoma</li> </ul>
<b>MAYORES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hernia abdominal</li> <li>- Complicación vascular y/o nerviosa</li> <li>- Infección profunda</li> <li>- Hematoma profundo</li> </ul>

**Tabla 1.6.**  
Complicaciones de la toma de autoinjertos.

### 3.1.2. Homoinjerto o aloinjerto

Un homoinjerto o aloinjerto es un tejido trasplantado entre miembros genéticamente no idénticos de la misma especie<sup>13</sup>. Se puede obtener de donantes vivos, como en el caso de las cabezas femorales extraídas en las artroplastias de cadera, de donantes multiorgánicos o de donantes de tejidos. Constituyen la primera alternativa como sustituto óseo y, por este motivo, su uso se ha incrementado en 15 veces en la pasada década, suponiendo en la actualidad un tercio de los sustitutos óseos utilizados en los Estados Unidos, donde la FDA lo considera como tejido para transplantar utilizado sin aditivos<sup>15</sup>. Con este fin se mantiene en establecimientos de tejidos (Figuras 1.15 y 1.16).



**Fig. 1.15.** Establecimiento de tejidos de la Fundación Clínica San Francisco, en León.

La conservación de un homoinjerto se hace por diferentes métodos: de congelación, criopreservación o liofilización; y puede ser fresco, congelado o procesado alternativamente para minimizar la posible respuesta inmunógena a la que se expondría al huésped al que se implanta el material. También puede clasificarse en cortical o

esponjoso (Figuras 1.17 y 1.18). El homoinjerto fresco se utiliza menos frecuentemente que el procesado por la dificultad para realizar el screening de enfermedades.

El riesgo de transmisión de enfermedades con injertos frescos y la dificultad para su almacenamiento y distribución, ha generalizado el uso de injertos frescos-congelados y liofilizados, con propiedades fundamentalmente de osteoconducción, aunque también conservan un número variable de proteínas osteoinductivas. Estas propiedades osteoinductivas varían de acuerdo al tipo de injerto y al procesamiento utilizado en su preparación, esterilización y almacenamiento.

Las ventajas de los homoinjertos incluyen su amplia disponibilidad, que depende de la oferta de los bancos de tejidos, su reducida inmunogenicidad y su buena tolerancia por parte del receptor. Entre sus inconvenientes se citan el comportamiento biológico inferior al del autoinjerto óseo, su elevado costo de mantenimiento, el riesgo de infección, una mayor incidencia de fracturas y la posibilidad de transmisión de enfermedades (SIDA, hepatitis, leucemia, tuberculosis, sífilis, cáncer, encefalopatía de Creutzfeldt-Jakob, etc).

En relación con la incorporación del aloinjerto al esqueleto del huésped donde se trasplanta, el proceso comienza con una osteoconducción pasiva, a la que sigue la formación ósea estimulada por las sustancias osteoinductoras. Los injertos corticales se incorporan por trepación-sustitución a través de un proceso de formación intramembranosa en las uniones corticales (Figura 1-16). El injerto cortical finaliza con una exposición medular al canal que se incorpora por osificación endocondral. Este proceso crea una estructura con una fortaleza débil, que es reabsorbida y, posteriormente, convertida en hueso nuevo. En contraste, el injerto medular se incorpora exclusivamente por formación endcondral, permitiendo la formación de hueso dentro del marco osteoconductor, aportando fortaleza desde el principio <sup>16</sup>.

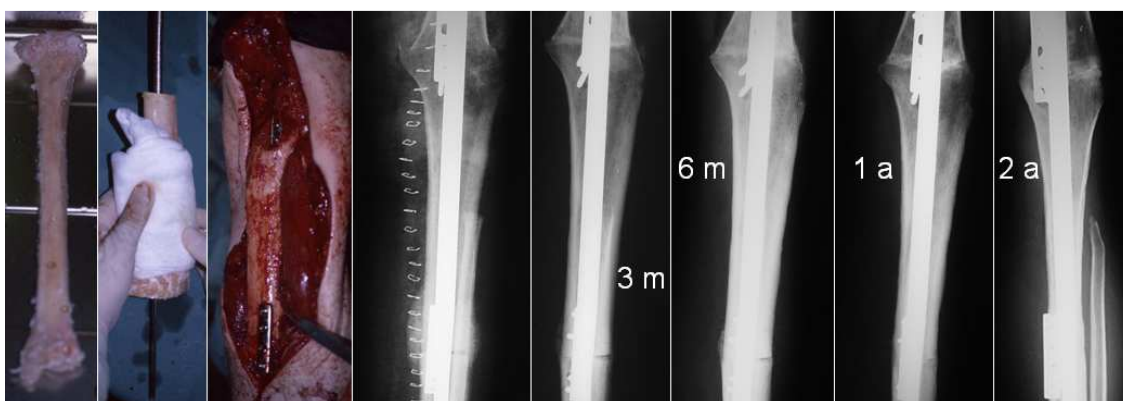
Finalmente, en cuanto a los métodos de esterilización para erradicar la posibilidad de la presencia de bacterias, hongos y virus, para disminuir a la mínima expresión el riesgo de su transmisión, lo que se descarta mediante screening para el VIH-1, VIH-2, VHC, VHB, HTLV-I, HTLV-II, sífilis y citomegalovirus <sup>17</sup>, existen dos fundamentales: mediante radiación gamma o con óxido de etileno. El primero ofrece mejores efectos sobre la actividad mecánica, pero, como el óxido de etileno, afecta a las propiedades osteoinductivas del hueso <sup>17</sup>. Es el método de esterilización que se utiliza con más frecuencia y su objetivo es la obtención de tejidos que posean un aceptable margen de seguridad y cambios mínimos en su estructura y comportamiento. No obstante, como ya dijimos, disminuye las propiedades osteoinductivas y las características biomecánicas del tejido. El segundo método se desaconseja por la toxicidad de sus residuos.



**Fig. 1.16.** Secuencia de triturado de homoinjertos de cabezas femorales.



**Fig. 1.17.** Homoinjerto triturado (A) y estructural (B y C). A la derecha, homoinjerto osteocondral del extremo proximal del húmero con la cápsula y el manguito de los rotadores íntegros.



**Fig. 1.18.** Secuencia de consolidación de un homoinjerto estructural en la reconstrucción de un defecto óseo intercalar cortical.

### 3.1.3. Isoinjerto o injerto singénico

Los isoinjertos son los efectuados entre individuos isogénicos, es decir, genéticamente idénticos, como es el caso de los gemelos monocigóticos idénticos.

### 3.1.4. Xenoinjerto o heteroinjerto

Los xenoinjertos son los injertos que se implantan entre individuos de especies diferentes<sup>13</sup>. Son el centro de interés de muchos estudios debido a que se pueden conseguir con facilidad. Sin embargo, su capacidad inmunogénica, tanto de las células como de la matriz orgánica, limita su utilización y hace necesaria su desproteinización.

### 3.1.5. Injerto óseo vascularizado

El injerto óseo vascularizado es un injerto óseo que conserva su irrigación sanguínea y se implanta en el sitio receptor mediante técnicas microquirúrgicas de anastomosis vascular. En rigor se trata de un trasplante óseo y habitualmente corresponde a un autoinjerto.

## 3.2. ANDAMIAJES SINTÉTICOS

La principal diferencia que existe entre los andamiajes sintéticos y los injertos es que los segundos aportan células a la zona receptora con la finalidad de reconstruirla y los primeros no. Estos podemos clasificarlos en biotolerables, bioinertes y bioactivos.

Los materiales biotolerables son aquéllos en los que el hueso nuevo se forma a distancia del implante, es decir, implante y hueso están separados por una capa de tejido conectivo. Dentro de este grupo se encontrarían el cemento óseo, el acero inoxidable y las aleaciones de cromo-cobalto. El crecimiento óseo que sucede con este tipo de implantes se denomina osteogénesis a distancia. Los materiales bioinertes son los que presentan una elevada estabilidad in vivo y resistencia mecánica. En este grupo se encuentran la alúmina. El crecimiento que se produce con este tipo de implantes se denomina osteogénesis por contacto. Los materiales bioactivos son los que presentan propiedades osteoconductoras, con buena biocompatibilidad pero pobres características mecánicas. El crecimiento óseo que se produce con este tipo de implante se denomina osteogénesis de unión, ya que el hueso crece hacia el material y es capaz de establecer uniones fisicoquímicas con él <sup>10</sup>.

### 3.2.1. Cerámicas

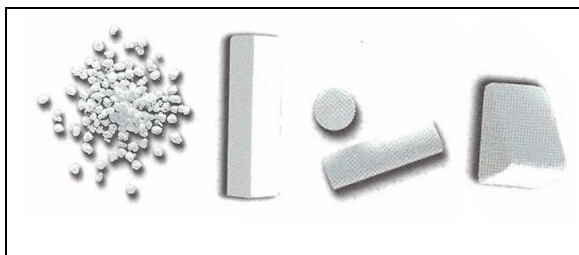
Las cerámicas son materiales no metálicos e inorgánicos que presentan una estructura cristalina y se obtienen generalmente por la aplicación de altas temperaturas y presiones. Se clasifican en bioabsorbibles, bioinertes y bioactivas.

#### 3.2.1.1. Cerámicas bioabsorbibles

Las cerámicas bioabsorbibles fueron las primeras sustancias sintéticas utilizadas en el trasplante óseo, y por eso son con las que más experiencia clínica contamos. Actualmente están consideradas como medicamentos por la FDA, sometidas a una estricta legislación para su comercialización <sup>18</sup> (Tabla 1.7 y Figura 1.19).

TIPO	PRODUCTO DE FOSFATO CÁLCICO	CASA COMERCIAL
Fosfato tricálcico sintético	Mimix	Biomet
Beta-tricalcio fosfato	Cerasorb	Curasan
Beta-tricalcio fosfato	Chornos	Synthes
Beta-tricalcio fosfato	Vitoss	Orthovita
Hidroxiapatita coralina	Pro Osteon	Interpore Cross
Hidroxiapatita porosa	Endobon	Biomet/Merck

**Tabla 1.7.** Cerámicas bioabsorbibles comercializadas en la actualidad.



**Fig. 1.19.** Estructura macroscópica de diferentes compuestos de fosfato cálcico. Tomado de Calsiresorb Cerapatite. Les phosphatesde calcium. Ceraver.

Las cerámicas bioabsorbibles son sustancias osteoconductoras que facilitan la formación ósea por este aporte de matriz, sobre la que las células del huésped crearían hueso nuevo a partir de sus propios factores osteoinductivos<sup>19</sup>. Si a aquéllas se le añadieran sustancias osteoinductivas tales como factores de crecimiento o proteínas morfogenéticas (BMPs) se sumaría el efecto osteoinductor. No aportan un alto grado de soporte estructural porque son frágiles y tienen baja resistencia tensional.

Los materiales pueden comercializarse como implantes porosos, no porosos densos o partículas granulares con poros. En cuanto a su porosidad, el tamaño óptimo de los poros es de 150 a 500 micrómetros<sup>20</sup>, de tal forma que, a medida que el tamaño del poro aumenta, la fortaleza del implante disminuye (Figura 1.20). La excepción son las cerámicas derivadas de materiales como los corales, las cuales presentan un poro biológico interconectado en una malla.



**Fig. 1.20.** Estructura macropórica (100-400  $\mu\text{m}$ ) de biomateriales de fosfato cálcico. En el centro, gránulo de  $\beta$ -TCP (x 1000) y a la derecha, detalle de su microestructura (x 2000). Tomado de Calsiresorb Cerapatite. Les phosphatesde calcium. Ceraver.

### 3.2.1.1.1. Fosfato cálcico

Las cerámicas de fosfato cálcico tienen una estructura altamente cristalina que se crea por calentamiento de sales minerales a temperatura mayor de 1.000°, mediante el proceso conocido como sinterización. Presentan un rango variable de osteointegración basado en el tamaño de los cristales y su estequiometría, siempre más lenta que la de los materiales de sulfato cálcico<sup>21</sup>. Por cuanto respecta a su reabsorción, todavía no se ha demostrado en estudios en humanos. En animales parece que el 80% del cemento se reabsorbe en 10 semanas, con resorción y reemplazamiento de hueso durante 30 semanas<sup>22;23</sup>.

El fosfato cálcico se encuentra disponible en una gran variedad de formas y productos, incluyendo cerámicas, polvos y cementos y su utilidad como material de



relleno en defectos óseos ha sido documentada en animales de experimentación y en humanos <sup>24;25</sup>. Aquí, fundamentalmente empleado como cemento, se ha utilizado en fracturas del radio distal <sup>26-29</sup>, en fracturas de mesetas de la tibia <sup>30;31</sup>, de calcáneos, caderas y columnas <sup>32-34</sup>. Sus propiedades mecánicas son comparables a las del hueso esponjoso, con la posibilidad añadida de poder incorporarse y remodelarse en el hueso donde se implanta. No obstante, su resistencia inicial disminuye después de 4 meses en un 30-40% <sup>35</sup>. Por todo, cuando se quiera utilizar para soportar fuerzas de torsión hay que asociarlo a una estabilización rígida. Si se va a hacer uso de él en lugares de pocas demandas torsionales los complementos de estabilización podrían obviarse.

Parece que no se asocia a efectos adversos tempranos la utilización de estas cerámicas, ni a la aparición de reacción inflamatoria de cuerpo extraño. Los hallazgos radiográficos muestran la persistencia de este material durante un periodo largo de tiempo debido al fallo de la completa remodelación. El fosfato tricálcico que es el más biodegradable, aparece más incorporado al hueso, pero no completamente del todo. Una ventaja de este tipo de fosfato cálcico absorbible es que se pega bastante bien al hueso del huésped. Pero este tipo de cerámicas no poseen propiedades osteoinductivas, por lo que la unión entre el hueso y el injerto se consigue por afinidad local de los factores de crecimiento, que sirven en el proceso de regeneración.

### **3.2.1.1.2. Fosfato tricálcico**

El fosfato tricálcico se presenta en bloques, gránulos, polvo o en masilla, obteniéndose por tratamiento termoquímico, con fosfato amónico, dejando el fosfato tricálcico con una estructura y porosidad similar al hueso medular <sup>36</sup>.

### **3.2.1.1.3. Hidroxiapatita**

La hidroxiapatita, que se puede obtener de forma natural (bovina, coralina o ficógena) o sintética (cerámica o no cerámica), es una apatita compuesta principalmente por fósforo y calcio. Su fórmula corresponde a  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , con una relación calcio/fósforo de 1,67. Aunque muchos materiales han sido llamados hidroxiapatita, en realidad presentan relaciones Ca/P variables que van de 2,0 a valores tan bajos como 1,3. Para evitar estos problemas, la American Society for Testing and Materials ha determinado los patrones de referencia, de modo que su pureza pueda ser determinada y controlada.

El componente mineral del hueso humano incluye varios tipos de fosfatos de calcio hidratados, siendo el más común la hidroxiapatita. La hidroxiapatita del hueso es un cristal plano de 20 a 80 nm de largo y de 2 a 5 nm de espesor, y supone el 65% de la fracción mineral del hueso (Figuras 1.21 y 1.22). Entre sus características mecánicas destacan la rigidez y la dureza, que se combinan con la elasticidad y continuidad del colágeno, principal componente orgánico, para dar al hueso sus particulares propiedades. Así, los cristales de hidroxiapatita aumentan la rigidez de la matriz ósea de modo que, sin ellos, el hueso podría doblarse con extrema facilidad <sup>10</sup>.



**Figs. 1.21 y 1.22.** Bloques y gránulos de Pro Osteon®, una hidroxiapatita derivada del coral con una porosidad similar a la del tejido esponjoso humano (Pro Osteon® 500 en el centro y hueso esponjoso humano a la derecha).

La hidroxiapatita es biocompatible y presenta una buena capacidad de unión al hueso, permitiendo una buena osteointegración. Su perfil biológico incluye una falta de toxicidad local o sistémica, ausencia de reacción inflamatoria o reacción de cuerpo extraño al aplicarse en bloques o partículas sueltas y ausencia de respuesta piógena. En contra a lo que sucede con los fosfatos tricálcicos, es poco soluble al ser implantada en tejido óseo.

Desde el punto de vista biomecánico, las cerámicas del tipo de los fosfatos cálcicos presentan una resistencia a la tensión y al impacto débil y son frágiles. Al ser utilizadas como medio para rellenar defectos óseos, la hidroxiapatita se aplica en forma de estructuras coralinas, formadas por poros interconectados, de modo que permitan el crecimiento del hueso del huésped hacia su interior. Este relleno ha demostrado ser capaz de proporcionar al implante unas características de resistencia similares al hueso normal <sup>10</sup>.

Aunque existen estudios animales que sugieren que la hidroxiapatita puede tener propiedades osteoinductivas <sup>37</sup>, debido su escasa formación de hueso, al lento grado de reabsorción y a su elevada fragilidad, la hidroxiapatita no suele utilizarse de forma aislada. Combinada con el fosfato tricálcico, menos frágil y con una reabsorción del 95% a las 26-28 semanas en estudios animales <sup>38</sup>, da lugar a un compuesto de fosfato cálcico bifásico que tiene una reabsorción más rápida de la hidroxiapatita pura (Tabla 1.8).

CARACTERÍSTICA	FOSFATO TRICÁLCICO	HIDROXIAPATITA
Fragilidad	Menor	Mayor
Tasa de reabsorción	Más lenta	Más rápida
Tasa de resorción	Más rápida	Más lenta
Transformación	Mayor	Menor

**Tabla 1.8.** Comparación de las propiedades del fosfato tricálcico y la hidroxiapatita.

### 3.2.1.1.4. Sulfato cálcico

El yeso, un hemihidrato de sulfato cálcico (CaO<sub>4</sub>S), es una cerámica bioabsorbible. La primera en utilizarse como injerto óseo. El yeso tiene una rápida transformación y se reabsorbe durante las primeras semanas de la implantación. Además, no inhibe la osteogénesis ni agrava la infección cuando se utiliza en cavidades infectadas. Es barato y de fácil preparación; puede ser esterilizado; y su vida media es indeterminada. Sin embargo, no aporta fortaleza interna ni soporte y sólo puede ser

utilizado en pequeños defectos cavitarios. El tamaño natural del poro de yeso es un poco grande, lo que impide la interconexión de las trabéculas. En la actualidad la utilización del sulfato cálcico está resurgiendo, debido a la creación de tabletas de este material.

### **3.2.1.2. Cerámicas bioactivas**

Las cerámicas bioactivas son las que interaccionan con el medio produciéndose una unión físico-química, generando una osteogénesis adhesiva por la liberación de iones al medio y la inclusión de éstos en el metabolismo óseo. En general, contienen menos de un 60 % de  $\text{SiO}_2$ , un elevado  $\text{Na}_2\text{O}$  y  $\text{CaO}$  y un porcentaje de  $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$  similar al encontrado en el hueso nativo. Cuando ponemos en contacto estos materiales con agua la superficie del cristal se convierte en altamente reactiva, produciéndose una rápida formación de cristales de hidroxil carbonato apatita (HCA) a lo largo de la superficie. Varias combinaciones de diferentes elementos han sido utilizados para crear diferentes cristales. Estos materiales no se reabsorben para dejar paso a la formación de nuevo hueso, de hecho el valor de estos injertos es por la adhesión que consiguen entre ellos y el huésped. Esta adhesión puede aumentarse, añadiendo apatita o cristales de wollastonita

### **3.2.1.2. Cerámicas bioinertes**

Las cerámicas bioinertes son aquellas que no reaccionan con tejidos vivos. Consiguen la mayor resistencia mecánica de todos los injertos materiales y una gran biocompatibilidad. Generalmente están compuestos de óxido de metales, como la alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), el zirconio ( $\text{ZrO}_2$ ) o el titanio ( $\text{TiO}_2$ ), mostrando una excelente resistencia a la compresión. De hecho, este tipo de materiales se utiliza como componentes de prótesis articulares. Puesto que no se adhieren al hueso, su aplicación se limita a las reparaciones que no requieran resistencia a la torsión.

### **3.2.2. Polímeros**

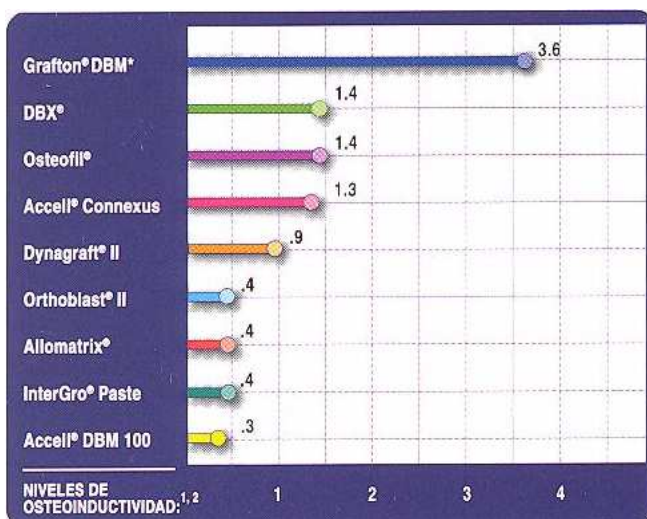
Los polímeros de cemento, como el polimetacrilato (PMMA) se han utilizado durante décadas como sustitutos de hueso para reparar defectos y en la reconstrucción de fracturas complejas. Debido a que el PMMA produce una inflamación gigante celular de cuerpo extraño cuando se fragmenta y no se reemplaza por nuevo hueso en el lugar del defecto, se considera que los polímeros interfieren con los osteogénesis y la reparación normal.

Actualmente se están introduciendo polímeros parcialmente reabsorbibles, como el poliglicólico (PGA) o el polilactico (PLLA), que permiten la formación de nuevo hueso y se degradan. Estos polímeros han sido diseñados con forma de tornillo y se han utilizados con cierto éxito en la fijación de fracturas de huesos largos. También podrían utilizarse para transportar sustancias tales como antibióticos o agentes osteoinductivos.

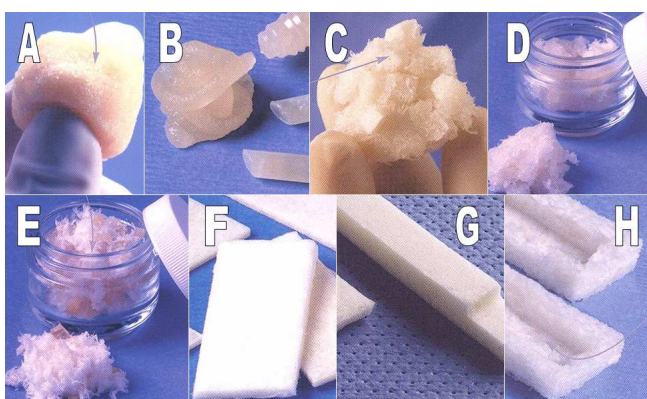
### 3.3. BIOMATERIALES

#### 3.3.1. Matriz ósea desmineralizada

La matriz ósea desmineralizada (DBM) es un biomaterial que se obtiene de la decalcificación del hueso cortical. Mantiene la estructura trabecular de colágeno del tejido original y puede servir como andamiaje biológico osteoconductor, aunque pierde cierta resistencia en este proceso<sup>23</sup>. La desmineralización no elimina completamente los factores de crecimiento, por lo que estos injertos pueden ser más osteoinductivos que el resto<sup>24</sup>. Los resultados clínicos con su uso, no obstante, no son uniformemente buenos, debido principalmente a que el procesamiento no se realiza de manera uniforme, aunque mediante él se disminuye el riesgo de infección y de respuesta alérgica por parte del huésped. La DBM suele utilizarse como complemento de otros sustitutos óseos y se presenta de diferentes formas (Figuras 1.23 y 1.24)<sup>12</sup>.



**Fig. 1.23.** Representación de los niveles de osteoconductividad en diferentes DBM en modelos de rata atómica. Tomado de Grafton. Matriz ósea desmineralizada (MOD). Osteotech, Inc. 2008.



**Fig. 1.24.** Formas de presentación de una matriz ósea desmineralizada (Grafton®): pasta (A), gel (B), orthoblend (C), putty (D), cruch (E), flex (F), matriz strips (G) y matriz plf (H).

#### 3.3.2. Colágeno

La matriz ósea extracelular es muy abundante en colágeno (Figura 1.25). Éste ayuda al depósito mineral, al crecimiento vascular, retiene los factores de crecimiento y

favorece un entorno para la regeneración ósea. Además, en estudios recientes se ha demostrado útil como transportador de factores osteoconductivos, osteoinductivos y osteogénicos<sup>23</sup>. Como inconvenientes, puede crear reacciones inmunitarias y aporta poco poder estructural.



**Fig. 1.25.** La matriz Mastergraft® es una sustancia osteoconductora reabsorbible formada por una esponja de colágeno (obtenida de tendón bovino, rico en colágeno tipo I) unida a gránulos de cerámica (con 15% de hidroxipatita y 85% de Beta-fosfato tricálcico) de estructura porosa para permitir la penetración de fluidos biológicos y el crecimiento óseo. A la izquierda, la esponja de colágeno; en el centro, la representación gráfica de la mezcla, con una fuerza compresiva de 489 N; y a la derecha, arriba un gránulo de cerámica (0.5-1.6 mm de tamaño) y abajo un poro (500  $\mu$  de diámetro mayor y 125  $\mu$  de diámetro menor interno), con magnificación de 25X. Tomado de Technical Guide. Mastergraft® Matriz. Medtronic. 2005.

### 3.3.2. Sustitutos óseos sintéticos

En la última década se han conseguido grandes avances con los denominados sustitutos sintéticos, que muestran características exclusivamente de osteointegración y osteoconducción y continúan en investigación bajo su composición en calcio, silicona o aluminio. Idealmente también debieran ser biocompatibles, mostrar mínima reacción fibrosa, capacidad de remodelación y permitir la creación de nuevo hueso. Desde el punto de vista mecánico, deberían mostrar una resistencia similar a la del hueso cortico-esponjoso al que sustituyera. Entre las desventajas estarían un bajo grado de reabsorción, la dificultad para su obtención y pobres resultados clínicos con alguna reacción inflamatoria de cuerpo extraño en las pocas experiencias al respecto<sup>39</sup>.

## 3.4. COMPUESTOS “LICON-BASED”

### 3.4.1. Cristales bioactivos

Los cristales bioactivos son compuestos duros, sólidos (no porosos), compuestos de calcio, fósforo y dióxido de silicio (el sílice es su principal compuesto). Variando las proporciones de óxido de sodio, óxido de calcio y dióxido de silicio, pueden producirse todo el rango de formas, desde soluble a no reabsorbible. Tienen propiedades osteoconductivas y osteointegradoras, y presentan una resistencia mecánica mayor que las preparaciones de fosfato cálcico, similares a las cerámicas con hidroxipatita. Los cristales bioactivos resisten al taladro y al tallado, pero pueden romperse en el proceso. Son difíciles de fijar al esqueleto y han sido utilizados satisfactoriamente como expansores de sustitutos óseos<sup>40</sup>.

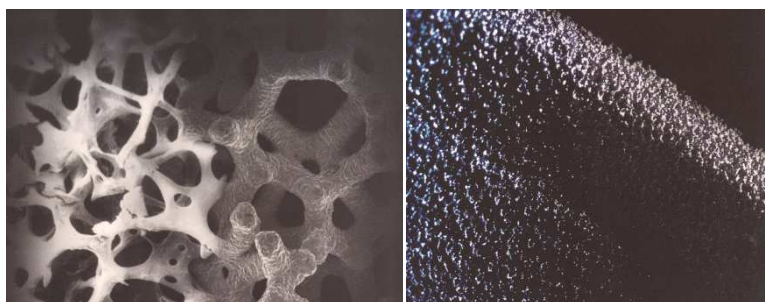
Las cerámicas bioactivas, una nueva variación, son más fuertes que los cristales bioactivos en cuanto a sus propiedades mecánicas. Aun así, continúan siendo frágiles y se rompen cuando se someten a ciclos de carga. Para intentar mejorar la resistencia se le han añadido fibras de acero inoxidable y partículas de cerámica, como el zirconio

### 3.4.2. Vidrio ionomérico

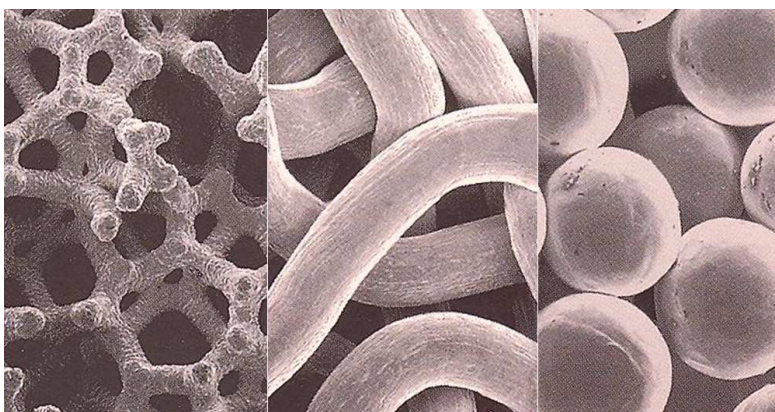
Los cementos de vidrio ionoméricos, compuestos de calcio, aluminio y fluorosilicato mezclado con ácido policarboxílico, consisten en una pasta que se endurece a los 5 minutos de ponerla en contacto con el agua, adquiriendo en 24 horas una resistencia compresiva y una elasticidad comparable a la del hueso cortical. Son biocompatibles, se osteointegran de manera similar a los cristales bioactivos y su estructura porosa favorece la osteoconducción y, por consiguiente, el crecimiento óseo. Al no ser reabsorbibles, sin embargo, no se recambian por hueso. Los cristales ionoméricos han sido considerados como los sustitutos del polimetil metacrilato, pero sin producir la reacción exotérmica <sup>12</sup>.

### 3.4.2. Sustratos osteoconductivos no biológicos

Los sustratos no biológicos (polímeros degradados a partir de los cuales se fabrican metales, como los poros de tantalio) ofrecen un control absoluto final sobre la estructura, no son inmunógenos y presentan una excelente biocompatibilidad <sup>12</sup>. Entre ellos, el Metal Trabecular, con un alto índice de resistencia a la carga y propiedades similares a las del hueso, con una alta ductilidad que le permite la deformación sin romperse (Figuras 1.26 – 1.28).



**Figs. 1.26 y 1.27.** Metal trabecular, consistente en poros interconectados que dan como resultado una estructura porosa en un 80%. Se fabrica mediante técnicas de deposición de vapor que crean una configuración de celdas metálicas similares a las del hueso trabecular, propiciando la aposición ósea directa (izquierda). A la derecha, aspecto de su textura macroscópica.



**Fig. 1.28.** Microfotografías comparativas de tres tipos de recubrimientos porosos: metal trabecular (izquierda), malla porosa (centro) y microesferas sinterizadas (derecha). Tomado de Trabecular Metal Technology. Zimmer.

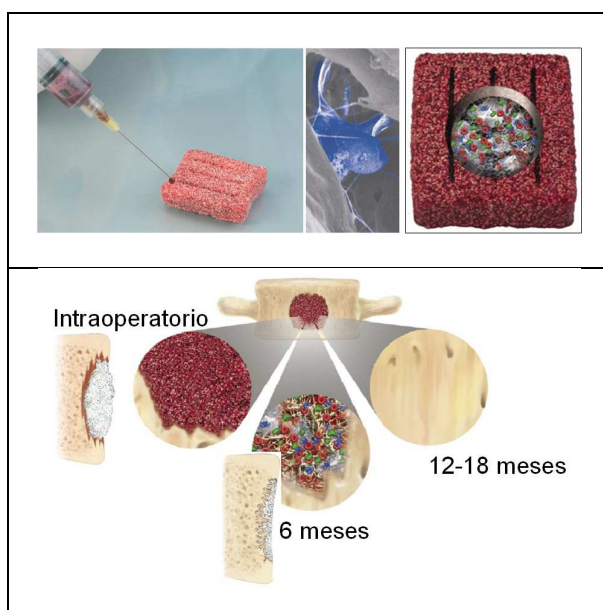
### 3.5. INJERTOS COMBINADOS (BIOLÓGICOS Y SINTÉTICOS)

Los sustitutos compuestos son injertos de células osteogénicas, factores de crecimiento osteoinductivos y matriz osteoconductiva. Las mezclas pueden ser múltiples: médula ósea con compuesto sintético, ultraporos de  $\beta$ -TCP con matriz ósea desmineralizada, factores de crecimiento osteoinductivos con compuestos sintéticos, BMP con compuestos de polímeros de ácido poliglicólico y matriz ósea desmineralizada con BMP y compuestos polímeros de ácido poliglicólico (Figuras 1.29 -1.31) <sup>12</sup>.

Los estudios preliminares muestran una funcionalidad comparable a la de los injertos autólogos y alogénicos, sin sus desventajas, debido al hecho de ser sintéticos. Un injerto compuesto combinado con una matriz osteoconductiva, con agentes bioactivos que aporten propiedades osteoinductivas y osteogénicas, sería una réplica de un injerto autólogo. La matriz osteoconductiva sería un sistema de liberación para los agentes bioactivos, requiriendo menos quimiotaxis y menos migración de progenitores osteoblásticos al sitio del injerto. Se comportaría, pues, como un transportador de células y factores de crecimiento y regularía su localización y tiempo de liberación, a diferencia de los geles y PELETs, que sólo controlan el tiempo de liberación. La infusión directa de las células progenitoras permitiría una mayor y más rápida reparación del hueso facilitando el reemplazo del armazón osteoconductor por el hueso nuevo mediante “creeping substitution”.



**Fig. 1.29.** Secuencia de la técnica de aspiración de médula ósea. Tomado de *Aspiration Technique. Mastergraft® Matriz. Medtronic. 2005.*

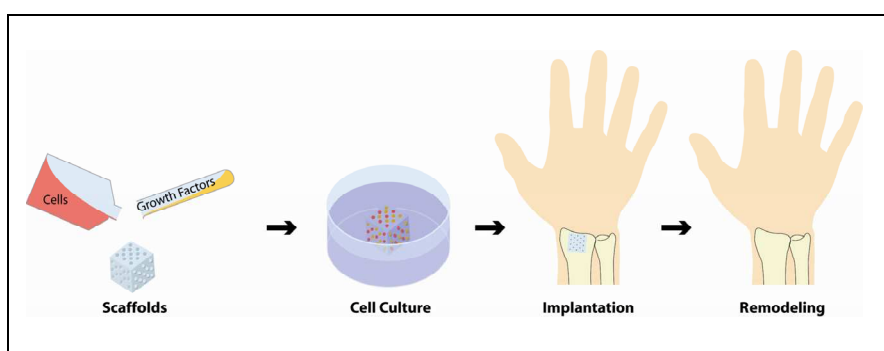


**Figs. 1.30 y 1.31.** Arriba, de izquierda a derecha, adición de células osteogénicas obtenidas mediante aspirado de médula ósea a una matriz osteoconductiva (Mastergraft®); detalle de la fijación de las células (centro); y representación esquemática del sustituto óseo, con las células añadidas en el armazón (derecha). Abajo, representación esquemática de la curación de un defecto óseo al que se ha añadido una matriz y células obtenidas de aspirado de médula ósea. El reemplazo del armazón osteoconductor por hueso nuevo mediante “creeping substitution” se vería acelerado. Tomado de *Technical Guide. Mastergraft® Matriz. Medtronic. 2005.*

## 4. INGENIERÍA TISULAR

### 4.1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular puede definirse como la creación o inducción de la formación de un tejido específico, en una localización específica, por medio de la manipulación y selección de células, matrices y estímulos biológicos (Figura 1.32) <sup>41</sup>. En nuestro campo se refiere fundamentalmente a la creación de tejido óseo de la mejor calidad posible. Actualmente la ingeniería tisular combina el aporte de células, indiferenciadas o no, que se colocan sobre una matriz a la cuál se pueden añadir factores de crecimiento que aceleren su proliferación e indiferenciación para ser trasplantadas a una estructura dañada y conseguir su regeneración <sup>42</sup>.



**Fig. 1.32.** Esquema de la necesidad de células madre embrionarias, factores de crecimiento y andamiaje para la reparación de fracturas. Tomada de Drosse y col <sup>43</sup>.

El primer caso de sustituto óseo con fines terapéuticos fue descrito en 1668 por el cirujano alemán Job Van Meek'ren. Desde entonces han sido múltiples las ocasiones en las que se han utilizado injertos óseos, factores de crecimiento y células para conseguir la reparación ósea <sup>23</sup>. El conocimiento de las células estromales multipotenciales, sin embargo, es más reciente, remontándose sólo a 1968, cuando Friedenstein y cols <sup>44</sup> las identificaron como células adherentes que formaban clones, no fagocíticas y fibroblásticas, definidas como colony-forming units-fibroblastic (CFU-U).

## 4.2. CÉLULAS

### 4.2.1. Conceptos

La reparación y la regeneración del hueso se produce a través de una secuencia ordenada de acontecimientos celulares que están influenciados por diversos condicionantes biológicos y mecánicos. El primer condicionante biológico es la necesidad de la presencia de células osteoprogenitoras capaces de formar hueso <sup>23</sup>. Estas células son pluripotenciales y, por tanto, capaces de diferenciarse siguiendo varias líneas tisulares.

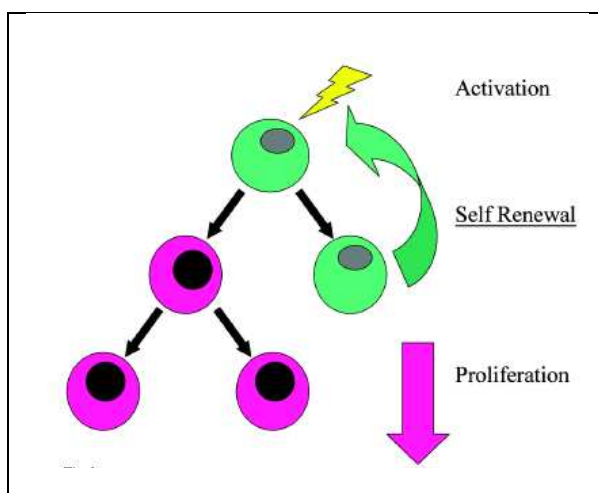
Las células madre pueden dividirse según su potencial de diferenciación en tres grupos: células totipotenciales, capaces de generar tejido embrionario y extraembrionario; células pluripotenciales, capaces de diferenciarse a tejidos de las tres



capas embrionarias; y células multipotenciales, capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares de la misma capa embrionaria <sup>45</sup>.

Durante el desarrollo embrionario, las células de la capa mesodérmica se diferencian a múltiples tipos de tejidos, incluyendo hueso, cartílago, tendones, músculo, grasa y estroma medular. Estos precursores celulares, también presentes en la etapa postnatal, se denominan células mesenquimales troncales o MSCs <sup>46;47</sup> y son células no hematopoyéticas, estromales, que presentan multilinaje, con capacidad para diferenciarse a diferentes tejidos <sup>47</sup>.

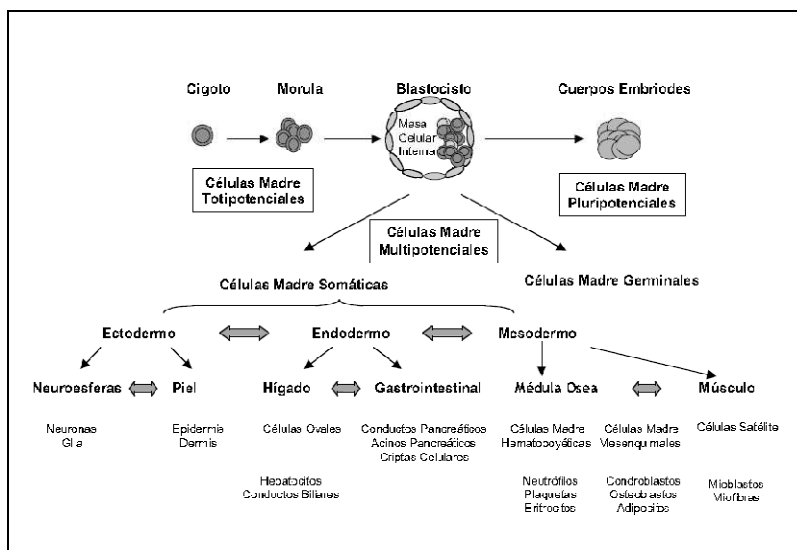
En el año 2006 la sociedad internacional de Terapia Celular (International Society Cellular Therapy – ISCT-) propuso tres criterios para definir las células troncales mesenquimales (MSCs): debían ser adherentes en cultivo; expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos, como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y ser capaces de diferenciarse in vitro en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo. Adicionalmente mostrarían la posibilidad de autorrenovarse, de desarrollarse en múltiples líneas celulares y de proliferar sin límite (Figura 1.33) <sup>48</sup>.



**Fig. 1.33.** *Proceso de autorrenovación células madre. Tomado de Mushler y cols <sup>49</sup>.*

Las células troncales mesenquimales adultas (MSCs) o células madre adultas (ASCs), que son células pluripotenciales, se encuentran entre las células diferenciadas de un órgano o tejido adulto y pueden replicarse y diferenciarse hacia los fenotipos celulares especializados del tejido en el que residen en respuesta al estímulo adecuado (Figura 1.34) <sup>50</sup>. Su función en un organismo vivo consiste principalmente en el mantenimiento y reparación del tejido en el que se encuentran. Si antes se pensaba que se podían diferenciar únicamente en el linaje celular del tejido en el que se encontraban, actualmente se sabe que tienen un mayor grado de diferenciación plástica. De tal forma, se ha conseguido diferenciar células musculares a partir de células troncales neurales <sup>51</sup>, y obtener células musculares, células grasas o células neurales a partir de células troncales de la dermis <sup>52</sup>.

Las MSCs se localizan principalmente en la médula ósea, originando fibroblastos medulares o celulares reticulares, adipocitos, osteoblastos y condrocitos <sup>45</sup>, pero también en el periostio, en el músculo, en la grasa, en el cerebro y en la piel.



**Fig. 1.34.** Esquema modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial. Tomado de Prosper y cols<sup>53</sup>.

## 4.2.2. Biología de las MSCs

Las MSCs son células capaces de diferenciarse al linaje osteoblástico in vitro y de mantener su habilidad de difusión cuando se implantan in vivo. Su migración, diferenciación y posterior desarrollo de la capacidad para formar tejidos están controlados por factores de crecimiento<sup>54</sup>.

Las células osteogénicas son células capaces de producir hueso o de diferenciarse a células formadoras de hueso. Se localizan en el periostio, en el tejido blando peritrabecular y en la médula ósea obtenida por aspiración. Se supone que derivan de un pequeño grupo de células troncales pluripotenciales indiferenciadas del tejido conectivo cuya localización y características específicas se desconocen. Los progenitores osteoblásticos se pueden encontrar también en tejidos blandos.

### 4.2.2.1. Fase expansiva

A la producción de la célula hija proliferativa sigue un periodo de proliferación o expansión. Durante esta fase, el número de progenitores aumenta considerablemente. A nivel óseo se estima que una célula hija puede dividirse de 6 a 14 veces de media antes de convertirse en una con fenotipo de hueso maduro<sup>55</sup> mediante un fenómeno conocido como secuencia replicativa<sup>50</sup>.

### 4.2.2.2. Plasticidad celular

La plasticidad o transdiferenciación celular se define como la capacidad de una célula para diferenciarse en células maduras distintas a las de su tejido de origen. Es la flexibilidad de una célula para sobrepasar la barrera de linaje y adoptar perfiles de

expresión y fenotipos funcionales de células de otros tejidos <sup>56</sup>. En numerosos estudios se ha demostrado que la diferenciación celular terminal puede cambiar su fenotipo bajo los estímulos apropiados <sup>27;57;58</sup>. De tal forma, las MSCs pueden diferenciarse no sólo a células del mesodermo, sino también a un destino endodermal o ectodermal <sup>45</sup>.

#### 4.2.2.3. Heterogeneidad

Otro aspecto a tener en cuenta es la heterogeneidad de las MSCs. Las colonias individuales derivan de precursores únicos, muestran una naturaleza heterogénea en términos de proliferación celular y potencial de diferenciación multilinaje. De hecho, solo una menor proporción de colonias (17%) que derivan de la médula ósea adulta humana continúa su crecimiento más allá de 20 divisiones, mientras que la mayoría de las células muestran envejecimiento precoz.

#### 4.2.2.4. Capacidad inmunógena

Las MSCs son hipoinmunógenas y pueden eludir el sistema inmune del receptor. Expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y no el de clase II en su superficie <sup>50</sup>, CD40, CD80, CD86 <sup>59</sup>. La expresión de MHC clase I ayuda a proteger a las MSCs de las células NK (natural killer); mientras que la ausencia de las de clase II les permite no ser reconocidas por los CD4+ T. Por otra parte, las MSCs contienen un conjunto de MHC de clase II en su interior que pueden expresarse en superficie cuando las tratamos con interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ). En relación con el poder cancerígeno de las MSCs en su uso terapéutico, en la actualidad no existen pruebas al respecto <sup>50</sup>.

#### 4.2.2.5. Adhesión celular

Las MSCs se movilizan en la sangre periférica en respuesta a agresiones tales como quemaduras, lesiones musculoesqueléticas o en respuesta a lesiones hipóxicas <sup>50;60-62</sup>. En esta función intervendrían muchas de las moléculas que se encuentran relacionadas con la captura, atrapamiento, rodamiento, adhesión y trans migración de los leucocitos de la sangre a los tejidos, también expresadas en las MSCs. Incluyen integrinas, selectinas y receptores de quimioquinas.

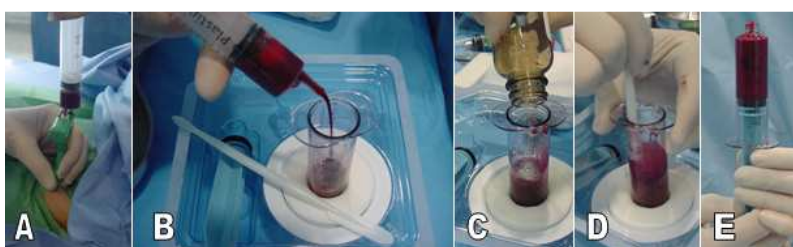
Entre las integrinas que se expresan en las MSCs en relación con su adhesión al endotelio tenemos a las  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$ . También intervienen la P-selectina y la VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3, ALCAM, y la endoglobulina/CD105 <sup>63</sup>; y, en la mitad de los casos, la VLA-4,  $\alpha 4\beta 1$  y CD49d. Sin embargo, la E y la L-selectina, relacionadas con la primera etapa del rodamiento leucocitario, no han demostrado expresión, o lo han hecho mínimamente. Cuando los anticuerpos neutralizan las integrinas, presentan una gran adherencia a las células endoteliales <sup>59</sup>.

### 4.2.3. Obtención de las MSCs

Las MSCs pueden obtenerse mediante la implantación de osteoblastos, sin capacidad inmunógena y con la posibilidad de expandirse in vitro después de obtenerse (con las limitaciones de exigir bastante tiempo, dar lugar a relativamente pocas células viables después de su obtención del tejido primario, ya que su grado de multiplicación es relativamente bajo); o mediante el uso de células de donantes no humanos (células xenogénicas), lo que solventaría el problema del bajo número celular. Sin embargo, la inmunogenicidad de estas células, la posibilidad de transmisión de agentes infecciosos y los problemas sociales y éticos derivados de su uso, han disminuido el entusiasmo por este tipo de método <sup>64</sup>. En este contexto, la célula madre parece ser la mejor opción.

Desde que se inició la utilización de células madre con fines terapéuticos han sido múltiples los estudios que se han realizado para entender y mejorar su obtención, habida cuenta de su demostrada capacidad para diferenciarse a células de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico <sup>65</sup>. La célula ideal para aplicaciones regenerativas debiera estar en número suficientemente amplio (millones o billones de células), debiera poder obtenerse por procedimientos mínimamente invasivos, debiera poderse diferenciar a distintos linajes y debiera poderse trasplantar de manera eficaz y segura a un mismo paciente o como implante alogénico <sup>65</sup>.

La proporción de células osteoprogenitoras en la médula ósea ha sido motivo de múltiples estudios. Según Muschler <sup>66</sup> sería de un progenitor osteogénico por  $23 \times 10^3$  células nucleadas en médula ósea humana. La determinación se realizó mediante la prueba de la fosfatasa alcalina. Además, se observó que existía una correlación positiva con el número de células nucleadas y una correlación negativa con la edad de los pacientes <sup>67</sup>. En el aspirado de médula ósea la prevalencia de células madre mesenquimales sería de 1 por 1.000 a 1 por 10.000 células nucleadas, lo que equivaldría a una fracción del 0,001 al 0,01% (Figuras 1.35 y 1.36) <sup>68;69</sup>.



**Fig. 1.35.** Obtención de células de médula ósea de forma percutánea mediante aspiración (A-B) y mezcla con matriz ósea desmineralizada (C-E) durante la técnica de Rougraff en el tratamiento de un quiste óseo simple.



**Fig. 1.36.** Aspecto del quiste óseo simple antes de la inyección de la mezcla de aspirado de médula ósea y matriz ósea desmineralizada y, a la derecha, 11 meses después.

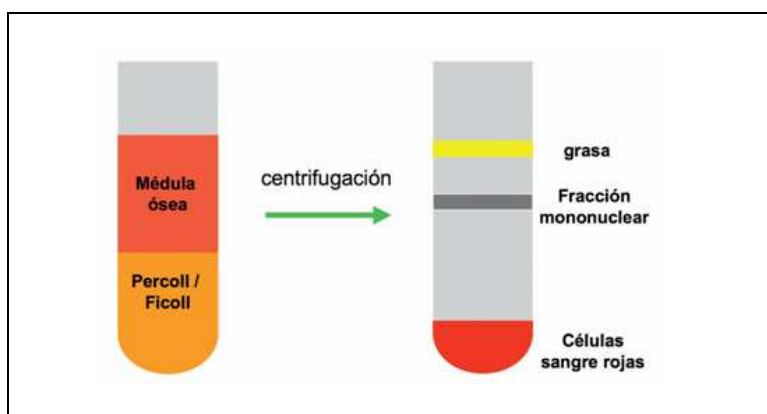
La cantidad de células madre o células progenitoras en la médula ósea es muy baja y disminuye de forma drástica con la edad. Un adulto joven y sano posee aproximadamente una célula progenitora por cada 100.000 células nucleadas de la médula ósea. A pesar de su escasez, la población de células progenitoras locales suele ser suficiente para formar hueso en respuesta a una lesión o a otros estímulos. Sin embargo, en algunos casos, cuando existen muy pocas células osteoprogenitoras o cuando su capacidad de respuesta está disminuida, el potencial osteogénico de la médula ósea local es insuficiente para cubrir las necesidades de formación de hueso nuevo. En estas situaciones, la formación ósea no es adecuada y se producen pseudoartrosis u otros fracasos de la reparación <sup>54</sup>.

#### 4.2.4. Aislamiento de MSCs

Desde los primeros estudios realizados por Friedenstein y Owen <sup>70</sup> se encontró que la población de células que se adhería al plástico en cultivo era heterogénea, tanto en morfología como en capacidad de diferenciación. Demostraron que no todas las unidades formadoras de colonias de fibroblastos o CFU-U tenían el mismo potencial para dar origen a células de distintos linajes.

La metodología establecida por Friedenstein consistía en cultivar células provenientes de médula ósea de organismos adultos. Después de un cierto tiempo, retiraba todas las células en suspensión y cultivaba las células adheridas a la caja de cultivo. Las células adherentes eran heterogéneas. Sin embargo, después de varias resiembras, predominaban células que crecían en forma de colonias fibroblastoides, denominadas células clonogénicas progenitoras de fibroblastos o unidades formadoras de colonias de fibroblastos <sup>71</sup>. En la década de los 90, Caplan y cols. <sup>72</sup> lograron obtener y diferenciar MSCs de humanos adultos modificando el método utilizado por Friedenstein.

Para el aislamiento de MSCs, intentando conseguir células más puras y homogéneas, se han utilizado diferentes protocolos, no existiendo datos que permitan su comparación (Figura 1.37) <sup>73</sup>. La obtención de médula ósea mediante gradientes de densidad tiene la desventaja de que en las primeras resiembras se encuentran tanto células endoteliales como macrófagos contaminando los cultivos, por lo que estos son muy heterogéneos <sup>45</sup>.

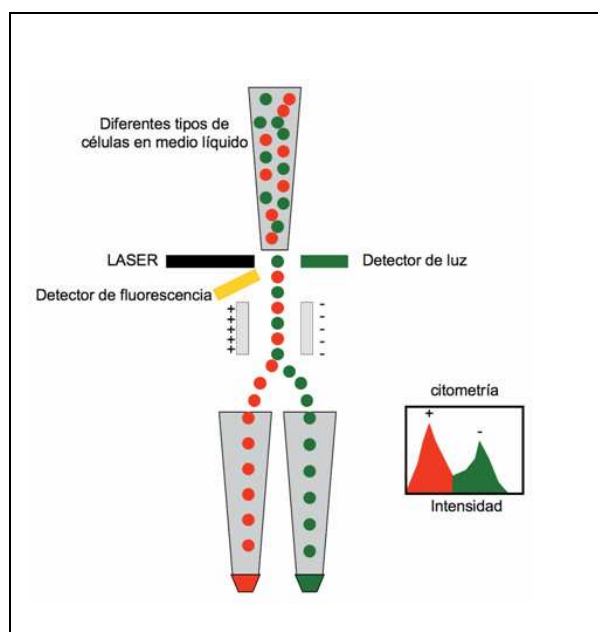


**Fig. 1.37.** Método para aislar MSCs por centrifugación. Tomado de Forriol y cols <sup>42</sup>

Los métodos de separación celular utilizados se basan en algunas de las características físicas de las células, como el tamaño, y en aspectos inmunofenotípicos. De acuerdo con éstos, las células pueden ser seleccionadas mediante dos métodos (selección positiva y selección negativa), que precisan del uso de un citómetro de flujo o de una columna inmunomagnética. La selección positiva se basa en el reconocimiento por un anticuerpo de una molécula presente en la célula de interés. Este método es muy útil cuando el antígeno utilizado para reconocer a la célula se expresa únicamente en ella. Su inconveniente es que hasta la fecha no se cuenta con un anticuerpo que reconozca únicamente a MSCs. La selección negativa se basa en la eliminación de células distintas a la población de interés. En el caso específico de las MSCs se utilizan anticuerpos dirigidos contra macrófagos, linfocitos, megacariocitos y células endoteliales.

Uno de los problemas que tenemos con las muestras para el aislamiento de MSCs es la contaminación por otros tipos celulares, como células madre hematopoyéticas, como resultado de la preparación. Para solventar este problema se recurre a dos procedimientos: el conteo magnético y el conteo por fluorescencia activada. La primera prueba utiliza epítomos positivos para MSCs que son marcados con anticuerpos. Posteriormente, un campo magnético externo se aplica para separar las formas negativas de las positivas. El conteo de células activados con fluoresceína (Fluorescence-Activated Cell Sorting –FACS–) permite que una población de células heterogéneas se caractericen y separen en base a la intensidad de la fluorescencia que emiten mientras pasan un iluminador (Figura 1.38). El citómetro sólo puede contar células que emita una determinada luz con parámetros definidos.

Otra alternativa para la obtención de MSCs de médula ósea es el aislamiento celular mediante digestión enzimática con colagenasas. Las colagenasas son enzimas capaces de partir las cadenas peptídicas en la molécula de triple hélice de colágeno. De esta forma, las células se separan del tejido y pueden ser fácilmente colectadas por lavado y centrifugación.



**Fig. 1.38.** Método para aislar MSCs por fluorescencia. Tomado de Forriol y cols.<sup>42</sup>.

#### 4.2.5. Diferenciación de células troncales mesenquimales

Las MSCs se pueden diferenciar a varias líneas celulares y esta diferenciación está estrechamente controlada por factores de crecimiento, hormonas, moléculas de la matriz extracelular y señales de direccionamiento. En la línea osteogénica, esta diferenciación puede ser inducida in vitro por el tratamiento de las MSCs con glucocorticoides sintéticos (como la dexametasona),  $\beta$ -glicerolfosfato, ácido ascórbico y 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>. La actividad fosfatasa alcalina y la calcificación de la matriz extracelular son marcadores típicamente utilizados para detectar preosteoblastos y osteoblastos maduros, respectivamente.

Los factores de crecimiento juegan un papel importante en la osteoinducción. De hecho, el tratamiento de MSCs humanas con factor de crecimiento insulínico (IGF-1), con factor de crecimiento epitelial (EGF) y con factor de crecimiento vascular (VEGF) aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización in vitro. En cambio, existe controversia en cuanto a los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF). Algunos sostienen que tienen un mínimo efecto inductor en la osteogénesis actuando sobre hMSC<sup>50</sup>, mientras que otros defienden su uso por lo contrario.

Aunque no hay marcadores únicos ni combinaciones específicas para las MSCs<sup>50</sup>, sí se ha descrito en su superficie positividad para SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124, SB10, SB20 y SB21 (Tabla 9). De hecho, el SB10 se ha propuesto como diferenciador de célula osteoprogenitora humana, aunque posteriormente se ha visto relacionado con otras especies<sup>46</sup>. Existe negatividad para CD14, CD34 y para el antígeno común leucocitario CD45<sup>74</sup>. Por otra parte, el SH3, SH4 y STRO-1 no están presentes en las células hematopoyéticas (Tabla 1.9)<sup>50</sup>.

MOLÉCULAS PRESENTES	MOLÉCULAS AUSENTES
INTEGRINAS	
$\alpha$ 1 (CD 49a), $\alpha$ 2 (CD 49b), $\alpha$ 3 (CD 49c), $\alpha$ 5 (CD 49e), $\alpha$ 6 (CD 49f), $\alpha$ v, $\beta$ 1, $\beta$ 3 (CD 61), $\beta$ 4 (CD 104)	$\beta$ 2 (CD 51), $\alpha$ 4(CD 49e), $\alpha$ L
RECEPTORES DE CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO	
bFGFR, rNGF, PDGFR (CD 140a), IL-1R, IL-3R (CD 123), IL-4R (CD 124), IL-6R (CD 126), IL-7R (CD 127), IFN- $\gamma$ R (CDw119), TNFIR and TNFIIR (CD 120), TGF $\beta$ R, TGF $\beta$ IIR	EGFR-3, IL-2R (CD 25)
CÉLULAS DE ADHESIÓN MOLECULAR	
ICAM-1 y -2, VCAM-1 (CD106), L-selectina (CD 62L), LFA-3 (CD 58), endoglobulina (CD105), CD72, ALCAM (CD166)	CAM-3, cadherin-5 (CD 144), E-selectina (CD 62E), P-selectina (CD 62P), PECAM-1 (CD31), LFA-1(CD18)
OTROS ANTÍGENOS	
Receptor de transferrina, STRO-1, HOP26, SB-10, CD9, Thy-1(CD90), SH-2(CD105), SH-3(CD73), SH-4, SB-20, SB-21, CD 29 subunidad $\alpha$ 1 integrina, CD 44, CD 71.	CD4, CD 11b, CD14, CD16, CD31, CD34,CD40, CD43, CD45, CD56, CD61, CD68, CD80, CD86, CD104,CD106, CD133 <sup>*</sup> , factor von Willebrand

**Tabla 1.9.** Perfil de marcadores de superficie celular de células troncales mesenquimales humanas (bFGFR = receptor factor de crecimiento fibroblástico básico; rNGF = factor de crecimiento neuronal; PDGFR = receptor factor de crecimiento derivado de las plaquetas; IL-1R, 2R, 3R, 4R, 6R, 7R = interleukinas-1, 2, 3, 4, 6, 7 receptor; IFN- $\gamma$ R = receptor interferon gamma; TNFIR =receptor factor I necrosis tumoral; TNFIIR = receptor factor II necrosis tumoral; TGFPIR = Receptor factor beta I transformador de crecimiento; TGFPIIR = Receptor factor beta II transformador de crecimiento; EGFR-3 = Receptor 3 factor de crecimiento epidérmico; CAM = Molécula de adhesión intercelular; VCAM = Molécula de adhesión vascular celular; LFA-3 = función linfocítica antígeno 3; ALCAM = célula de adhesión molecular leucocitaria activada; PECAM = célula de adhesión molecular plaquetaria endotelial; CD = Cluster Designation. Existe controversia en cuanto a la expresión del CD 133 -algunos autores no lo encuentran mientras que otros lo reportan incluso como método para obtenerlas<sup>45;59;73</sup>

#### 4.2.6. Células troncales procedentes del tejido graso

El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica embrionaria y contiene un estroma que es fácil de aislar, con adipocitos, células estromales (células musculares lisas, células endoteliales, fibroblastos, células de la sangre y preadipocitos) y células madre <sup>75;76</sup>. Estas células pueden ser digeridas enzimáticamente y separadas de los adipocitos flotantes por centrifugación. Esta población, denominada células madre o estromales derivadas del tejido adiposo (ADSCs), comparten muchas de las características de las células madre de la médula ósea, incluyendo el extenso potencial de diferenciación y la habilidad para la diferenciación multilínea (Figura 1.39). También se las conoce como células madre adultas derivadas del tejido adiposo (ADAS), células estromales adultas derivadas del tejido adiposo, células estromales adiposas (ASC), células madre adiposas mesenquimales (ADMSC), lipoblastos, pericitos, preadipocitos, células procesadas del lipoaspirado (PLA) y como “células madre derivadas del tejido adiposo” (ASCs), que es como la Sociedad Internacional para las Aplicaciones Tecnológicas de la Grasa ha decidido que se las conozca, con la particularidad de la multipotencialidad y adherencia al plástico <sup>65</sup>.

El número aproximado de células madre que se obtienen de un lipoaspirado de tejido graso, aunque dependiente de la edad, del índice de masa corporal y del lugar de la obtención, es de 5.000 CFU-F por gramo de tejido adiposo. Es decir, al menos 500 veces más que las que se obtienen de la médula ósea, cuya prevalencia es de 100 a 1.000 por mililitro <sup>76;77</sup>. Zuk y cols <sup>78</sup>, de hecho, consiguieron aislar células madre adultas mediante lipoaspiración (procesed lipoaspirate –LPA-) del compartimento adiposo estromal en suficiente número, con un crecimiento estable y parámetros cinéticos en cultivo; y las mismas células se han conseguido diferenciar, con el tratamiento específico, a linajes mesenquimales clásicos (osteogénico, adiposo, miogénico y condrogénico <sup>79</sup>) y a linajes no mesenquimales <sup>76</sup>.

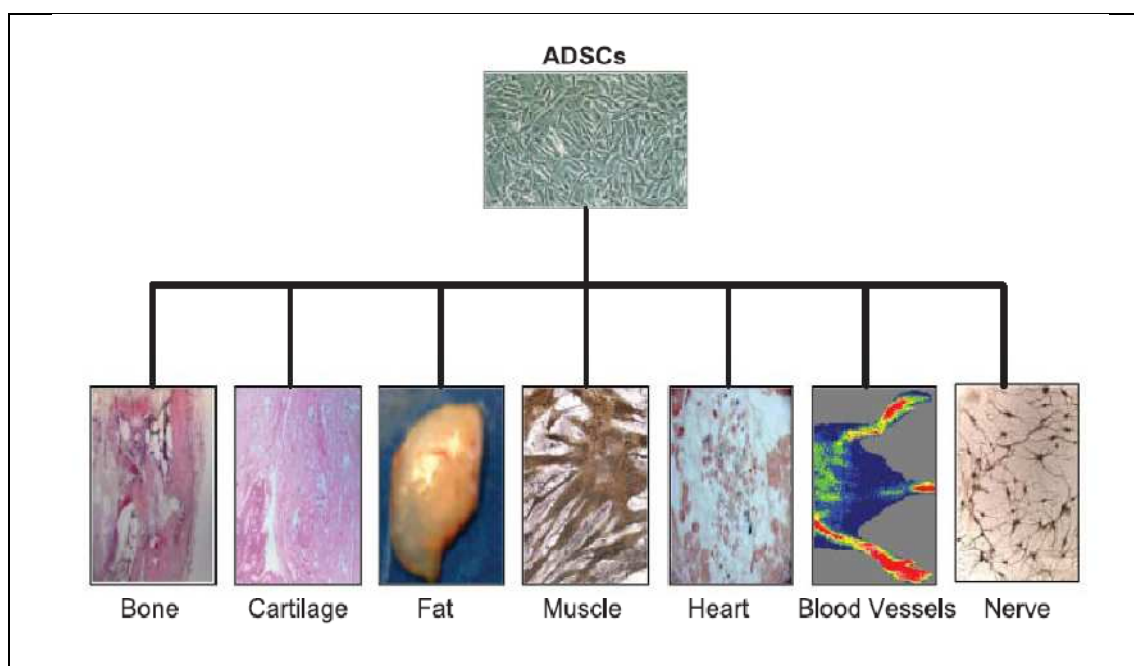


Fig. 1.39. Esquema de la multipotencialidad de las células madre ADSCs. Tomada de Strem y cols <sup>76</sup>.



El medio donde se cultiva una muestra tiene gran importancia sobre el crecimiento y la diferenciación de las ADSCs. Generalmente las células se siembran en cultivos que contienen una equilibrada solución de sales, como MEM (Minimal Essential Media), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI-1640, BME (Basal Medium Eagle), DMEM:F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12), a los que se añade suero (generalmente 10-20 % de suero fetal bovino). Puesto que éste contiene citocinas y factores de crecimiento (PDGF y EFG), un aumento del 10-15% de su concentración incrementaría la proliferación de MSCs. Sin embargo, la utilización de estos medios ha suscitado cierta preocupación por la posibilidad de transmisión de enfermedades, estimulando la creación de otros libres de proteínas o con bajos requerimientos de suero o con constituyentes de bajo peso molecular.

La diferenciación osteogénica in vitro de las ADSCs sucede a las 3-4 semanas de cultivar las células en un medio que contenga dexametasona,  $\beta$  glicerolfosfato, L-glutamina y ascorbato. El proceso de inducción produce matriz mineralizada extracelular de fosfato cálcico, osteocalcina, fosfatasa alcalina, osteopontina, colágeno tipo I y expresión de factores genéticos de transcripción (genes como Runx2 y Osx), demostrándose mediante las tinciones del Rojo de Alizarina y Von Kossa. La inducción osteogénica también se favorece por la adicción de FGF-2 al medio de cultivo, así como por miembros de la superfamilia de las TGF- $\beta$ , como serían las proteínas morfogenéticas. En relación con los mecanismos de transcripción de la osteogénesis y la participación del Runx2, éste actúa como mediador central ejecutando señales de las BMPs y las Wnt promoviendo un direccionamiento fenotípico y osteogénesis. Añadiendo BMP-2, BMP-4 y BMP-6 activamos el R-Smad y facilitamos la formación del complejo Runx2-Smad, que regula los genes objetivo. Runx-2 es una proteína DNA que actúa como andamiaje en la regulación de factores relacionados con la expresión genética del esqueleto para la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis esquelética<sup>80</sup>. Una vez que la célula madre se ha diferenciado, los osteoblastos producen proteínas de matriz extracelular que indican un fenotipo osteoblástico.

En humanos, el fenotipo de la célula de superficie de ADSCs es bastante similar a la MSCs. CD105, STRO-1 y CD166 (ALCAM) son tres marcadores comunes que se utilizan para identificar el potencial de diferenciación multilínea y que se expresan tanto en las ADSCs como en las MSCs. También el CD117 (factor receptor de célula madre) se expresa en células totipotenciales y pluripotenciales, incluyendo células madre embrionarias, MSCs y ADSCs. Además de estos marcadores multipotenciales, las ADSCs y las MSCs presentan otros marcadores de superficie: CD29 ( $\beta$ 1 integrina, que juega un papel importante en la angiogénesis), CD44 (receptor hialuronato, que es crucial en el desarrollo de la matriz extracelular y juega un importante papel en numerosos eventos patológicos y fisiológicos) y el CD49e ( $\alpha$ 5 integrina, importante para la adhesión a la fibronectina). Las ADSCs también expresan altos niveles de CD54 (ICAM-1) comparado con las MSCs. ICAM-1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y puede estar sobrerregulado en respuesta a numerosos mediadores inflamatorios y citocinas.

Por otra parte, las ADSCs no expresan marcadores hematopoyéticos o endoteliales, como son el CD3, CD4, CD11C, CD14, CD15, CD16, CD19, CD31, CD33, CD38, CD56, CD62p, CD104 y CD144; y menos del 1% expresan el HLA-DR. La mayoría, sin embargo, expresan moléculas MHC clase I, sugiriendo su potencial para el trasplante alogénico. Una diferencia en la expresión de marcadores de

superficie es en la expresión recíproca de VLA-4 (CD49d/CD29) y su receptor VCAM-1 (CD106) (Tabla 1.10).

MARCADORES DE SUPERFICIE	PATRONES DE EXPRESION	
	ADSCs	MSCs
CD9	+	+
CD10	+	+
CD13	+	+
CD29	+	+
CD31	-	-
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD49d	+	-
CD49e	+	+
CD54	+	+
CD55	+	+
CD59	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+
CD106	-	+
CD117	+	+
CD146	+	+
CD166	+	+
STRO-1	+	+

**Tabla 1.10.** Fenotipo de los marcadores de superficie de ADSCs y MSCs. Tomada de Strem y cols<sup>76</sup>.

### 4.3. MATRICES

Las matrices, entendidas como sustitutos óseos, son el sustrato donde colocamos las células y los factores de crecimiento para favorecer la regeneración ósea. Los materiales de los que se pueden componer son múltiples matrices, con la misma función osteoconductora.

### 4.4. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son proteínas secretadas por las células que, actuando sobre la célula objetivo, llevan a cabo una acción específica. Existen tres tipos diferentes de actuación: autocrina, en la cual el factor de crecimiento actúa sobre la célula de la que proviene o sobre células con idéntico fenotipo (por ejemplo, un factor de crecimiento producido por un osteoblasto ejerce su función sobre otros osteoblastos); paracrina, en la cual los factores de crecimiento ejercen su influencia sobre células vecinas con un fenotipo diferente a la célula origen (por ejemplo, factores de crecimiento producidos por osteoblastos son capaces de estimular la diferenciación de una célula indiferenciada) y, por último, endocrina, en la cuál los factores de crecimiento ejercen su influencia sobre una célula de fenotipo diferente y que se encuentra en una localización anatómica diferente (por ejemplo, factores de crecimiento

producidos por tejido neural en el sistema nervioso central estimulando la actividad osteoblástica). Estos factores de crecimiento pueden actuar sobre múltiples tipos celulares y pueden inducir diferentes actividades en varios tejidos (Tabla 1.11) <sup>21</sup>.

Los factores de crecimiento enlazan con el receptor de la célula diana e inducen un sistema de señales de transducción intracelular que finalmente culmina en el núcleo y con una respuesta biológica. La unión del factor de crecimiento y su receptor se conoce con el nombre de interacción ligando-receptor. Estas interacciones son muy específicas y pueden ser simples interacciones entre un factor de crecimiento y su ligando o complejas entre uno ó más ligandos con uno o más receptores. Por otra parte, existe una redundancia en este sistema biológico, ya que diferentes formas del mismo factor de crecimiento puede unirse a un único receptor o diferentes factores de crecimiento pueden ser activados por el mismo ligando <sup>21</sup>.

Una vez que se establece la interacción ligando-receptor, el receptor se activa a través de cambios en su conformación. Los receptores tienen dominios extracelulares que se unen al ligando, y dominios intracelulares que se unen y activan el sistema de transducción de señales. Parte de este sistema de transducción de señales se relacionan con el factor de transcripción, una proteína intracelular que es activada en el contexto de una secuencia de activación que se inicia a través del receptor del dominio intracelular. La activación del factor de transcripción llega al núcleo, se une al ADN nuclear e induce la expresión de un nuevo gen o conjunto de genes, que son los que cambian las características de la célula. El tipo de activación, así como el factor específico de transcripción, varían en función de la célula objetivo, la combinación del factor de crecimiento y su receptor y las características de las células <sup>21</sup>.

FACTOR DE CRECIMIENTO	FUENTE	TIPO DE RECEPTOR	FUNCIÓN
<b>FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE <math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>)</b>	Plaquetas, matriz ósea extracelular, matriz cartilaginosa	Serin-treonin sulfato	Factor de crecimiento pleotrópico que estimula la proliferación de células madre indiferenciadas
<b>PROTEINAS ÓSEAS MORFOGENÉTICAS (BMP)</b>	Células osteoprogenitoras, osteoblastos, matriz ósea extracelular	Serin-treonin sulfato	Promueve la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, osteoblastos. Promueve la diferenciación de osteoprogenitores a osteoblastos. Influye en los patrones de formación esquelética
<b>FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF)</b>	Macrófagos, células mesenquimales, condrocitos, osteoblastos	Tirosin-quinasa	Mitógeno para células mesenquimales, condrocitos y osteoblastos
<b>FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF)</b>	Matriz ósea, condroblastos y condrocitos	Tirosin-quinasa	Promueve la diferenciación y proliferación de células osteoprogenitoras
<b>FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS (PDGF)</b>	Plaquetas, osteoblastos	Tirosin-quinasa	Mitógeno para células mesenquimales y osteoblastos, quimiotaxis macrófagos

**Tabla 1. 11.** Factores de crecimiento. Tomada de Lieberman y cols <sup>21</sup>.

Aunque se conocen las señales de transducción de los factores de crecimiento y de sus receptores, existe un conocimiento limitado de las vías por las cuales estos factores de crecimiento actúan en la regulación de la reparación ósea<sup>21</sup>. En este ámbito, los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (Platelet Derived Growth Factor – PDGF-) son secretados por las plaquetas durante las fases precoces de la curación de las fracturas y estudios *in vivo* han demostrado que tienen actividad mitógena para los osteoblastos<sup>81</sup>. Aunque su actuación todavía no está claramente definida, pudieran favorecer la curación ósea<sup>82</sup>.

Con respecto a las proteínas morfogenéticas (BMP), desde que Urist descubrió en 1965 las propiedades osteoinductivas de la matriz ósea desmineralizada (MOD)<sup>83</sup>, las investigaciones se han centrado en el papel de aquéllas tanto en la formación del hueso embrionario como en la reparación del esqueleto postnatal. Las BMP son un grupo de glicoproteínas no colágenas pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$  -TGF- $\beta$ -). Se sintetizan localmente y ejercen sus efectos predominantemente mediante mecanismos autocrinos y paracrinos. Sus acciones están mediadas por un complejo de receptores tipo I (BMPR-1A y BMPR-2B) y tipo II que, una vez activados, transducen la señal hacia el interior de la célula por medio de la activación de las proteínas Smad, que forman complejos que se acumulan en el núcleo y regulan la expresión genética.

En la actualidad existen más de 15 BMP humanas diferentes y se han clonado sus genes, habiéndose demostrado que desencadenan una compleja serie de sucesos celulares que culminan en la formación ósea, participando también como mediadores fisiológicos en la reparación de las fracturas. Ejercen su acción principalmente mediante la inducción de la diferenciación de células mesenquimales hacia células formadoras de hueso y de cartílago, capaces de producir una osificación endcondral o una osificación directa, dependiendo del medio ambiente donde se ubiquen.

Las BMP más estudiadas por su capacidad para producir regeneración ósea han sido la BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) y la BMP-7 recombinante humana (rhBMP-7), también conocida como proteína osteogénica 1 (osteogenic protein-1 OP-1). Ambas se obtienen mediante técnicas de biotecnología en células de mamíferos y las investigaciones preclínicas y clínicas han demostrado que inducen la formación ósea y la reparación de defectos óseos, con resultados al menos comparables a los del injerto de hueso autólogo.

Finalmente, la asociación de aspirados de médula ósea de cresta iliaca a otros injertos y a factores de crecimiento derivados de la sangre parece lógica con el fin de facilitar la curación ósea<sup>84</sup>. El concepto nace de la idea de que determinadas partes de la sangre contienen factores de crecimiento que regulan la estimulación ósea, como sería el plasma derivado de las plaquetas (PRP) y/o factores de crecimiento autólogo (FCA).

## 5. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

La regeneración de órganos es un sueño de la medicina que, hasta que sea posible de forma verdaderamente eficaz, se sustituye por reimplantes, trasplantes o con la suplencia de la estructura dañada por elementos sintéticos (prótesis). En este contexto, la ingeniería tisular está desarrollándose con el mismo fin, basándose en la combinación de grandes poblaciones celulares, factores inductores de diferenciación celular y matrices<sup>85;86</sup>.

En el campo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología, la principal investigación en el campo de la ingeniería tisular, donde los ensayos clínicos en humanos todavía son relativamente escasos, se centran en la obtención de las células capaces de diferenciarse a un fenotipo histológico diferente: células madre mesenquimales o, mejor denominadas, troncales. La fuente más utilizada de estas células es la médula ósea, de donde se obtienen para tratar pseudoartrosis<sup>87-90</sup>, osteonecrosis de cadera y rodilla<sup>87-89;91</sup>, fracturas<sup>92</sup>, para facilitar las fusiones vertebrales<sup>93</sup> y para reparar otros defectos óseos<sup>93-96</sup>. Giannoudis<sup>96</sup> las obtiene con aparatos intramedulares mediante un sistema de “reaming-irrigation-aspiration”.

En los últimos años se han descrito nuevos orígenes titulares a partir de los que poder aislar células troncales con un potencial similar al de la médula ósea. Es el caso de la placenta<sup>97</sup>, el cordón umbilical<sup>98</sup>, el tejido muscular<sup>95</sup> o el adiposo<sup>78;79;99;100</sup>, siendo éste la alternativa más interesante dada su abundancia y accesibilidad<sup>78;100</sup>, en contraste con la limitada cantidad de tejido medular que se puede obtener y con la dificultad y morbilidad asociadas a su extracción. Por otra parte, parecen no existir diferencias significativas entre las derivadas de la grasa (ADMSCs) y las de la médula ósea (BMSCs) en cuanto a rendimiento de células adherentes, cinética de crecimiento, senescencia celular y capacidad de diferenciación, existiendo incluso investigaciones recientes que afirman que a partir del tejido adiposo se obtiene un mayor número de células madre mesenquimales y con mayor capacidad proliferativa que las que se aíslan de la médula<sup>17</sup>. En la misma línea, se ha demostrado que las ADMSCs son capaces de adquirir fenotipos de hueso, cartílago, grasa o miocardio<sup>78</sup>, además de piel<sup>101</sup> y neuronas<sup>102</sup>, dependiendo del microambiente que se cree mediante la adición in vitro de determinados factores de crecimiento y proteínas.

Aunque las técnicas de obtención y diferenciación osteoblástica de las ADMSCs han sido bastante estudiadas en los últimos años, la mayoría de los estudios in vitro utilizan células procedentes de lipoaspirados humanos<sup>103</sup>, en tanto que los estudios in vivo lo hacen con animales de experimentación pequeños, fundamentalmente roedores<sup>104;104</sup> y lagomorfos<sup>105</sup>.

En nuestro ámbito nacional, las publicaciones relativas a la ingeniería tisular son muy escasas y se limitan a pocos grupos de investigación, que han publicado fundamentalmente revisiones del tema, con pocos resultados. El más prolífico de los grupos investigadores ha sido el de Forriol, que viene trabajando con el mismo modelo experimental desde hace más de 10 años, si bien centrado en células madre sólo en los últimos. Otros que están trabajando o han mostrado interés por ellas son Guerado<sup>106</sup> y Mazzolini, en la Clínica Universitaria de Navarra<sup>107</sup>. Otras investigaciones relacionadas con la regeneración ósea son las de Suso, en Barcelona, que estudió el potencial osteogénico de polímeros bioabsorbibles<sup>108</sup>; las de Meseguer, en Murcia, que estudia el papel de implantes de espuma de hidroxiapatita y la cinética de crecimiento de

osteoblastos sobre cerámicas porosas de hidroxiapatitas<sup>108-110</sup>; la de Murcia, en Gijón, que utiliza un homoinjerto arterial para regenerar un defecto óseo en la tibia del conejo<sup>111</sup>; y la de Sancho, en Barcelona, que demuestra que los homoinjertos óseos criopreservados contienen células viables que pueden corresponder, atendiendo a su estirpe mesenquimal y a su escaso grado de diferenciación morfológica, a precursores de células osteoformadoras<sup>112</sup>. También en Barcelona, Orozco, en la Clínica Teknon, trabaja en ensayos clínicos sobre el tratamiento de pseudoartrosis con células troncales; además de experimentalmente en el de la artrosis y degeneración discal. En la regeneración del cartílago a partir de células troncales trabajan los grupos de Forriol, Vaquero, Ripoll y De Prado.

El mencionado grupo de Forriol estudió en 1999 la incorporación de diferentes tipos de injertos óseos mediante histomorfometría en corderos, demostrando una mejor incorporación de los autoinjertos y homoinjertos congelados que la de los homoinjertos liofilizados<sup>113</sup>. Los mismos autores han continuado realizando estudios histomorfométricos experimentales en análisis de la interfaz entre el hueso y diferentes clavos de fijación externa<sup>114</sup>; y en el estudio de los efectos de la elongación ósea sobre el cartílago articular y de crecimiento, y sobre el hueso trabecular. Otros autores que han realizado estudios histomorfométricos óseos han sido los del grupo de Frías<sup>115</sup>. En 2004, Forriol publicó una revisión sobre la biología y biomecánica del desarrollo, haciendo especial referencia al papel hormonal, a los factores mecánicos y a los factores de crecimiento; y, más recientemente, en 2008, otra centrado ya en técnicas de ingeniería tisular, repasando las aplicaciones clínicas en nuestra especialidad de Cirugía Ortopédica y Traumatología de las células madre pluripotenciales<sup>42</sup>. Por último, en el recientemente congreso SECOT, celebrado en Barcelona del 23 al 25 de septiembre de 2009, se presentaron comunicaciones y carteles científicos que versaban sobre la obtención y aplicación de células madre en Cirugía Ortopédica y Traumatología. Los proyectos presentados mostraban la tendencia a la obtención y posterior implantación de células troncales en situaciones donde la regeneración ósea podía estar alterada.

Más recientemente, en el congreso celebrado el 5 y 6 de noviembre en Madrid sobre “¿Qué hay de nuevo en COT?“, una de las mesas abordó el tema de las nuevas aplicaciones de las MSCs. John Huard, de Pittsburg, presentó los trabajos experimentales que está realizando, consistentes en la diferenciación de células troncales del músculo a células de características nerviosas que implanta en estas estructuras con resultados funcionales satisfactorios. En la misma línea, Valdalá implanta las mismas células troncales del tejido muscular en el disco intervertebral para favorecer la síntesis de proteoglicanos y conseguir una mayor hidratación del mismo, al igual que Clouet<sup>116</sup>. Mc Devitt, por su parte, consigue células troncales de menisco para implantarlas posteriormente.

# HIPÓTESIS DE TRABAJO

El sistema óseo presenta una gran capacidad regenerativa que, sin embargo, es limitada. Las estrategias terapéuticas actuales en relación con la reparación ósea, cuando es necesaria ante defectos esqueléticos de diferente naturaleza <sup>117</sup>, se refieren al empleo de injertos y sustitutos óseos, que muestran propiedades particulares y, derivadas de ellas, ventajas e inconvenientes para su uso <sup>118</sup>. La terapia celular y las técnicas de ingeniería tisular se han desarrollado en los últimos años como alternativa a algunas de las limitaciones de aquellos procedimientos <sup>119</sup>. Así, se está investigando sobre células troncales multipotenciales de naturaleza mesenquimal y diferente procedencia <sup>41;68;69;79;100;120-123</sup>. En este contexto, considerando los muchos interrogantes todavía existentes relativos a la metodología de las técnicas de ingeniería tisular y a su aplicación, nos planteamos nuestra hipótesis de trabajo: en nuestro medio podemos definir y mejorar los protocolos de aislamiento, cultivo, caracterización y diferenciación de células troncales del tejido graso (ADMSCs) con capacidad osteogénica, pudiendo usar éstas para inducir y acelerar la formación de tejido óseo en defectos cavitarios femorales experimentales.



## Objetivos

### **1. Objetivo principal**

Facilitar la reparación de defectos óseos cavitarios con células osteogénicas diferenciadas a partir de células mesenquimales del tejido graso y factores de crecimiento en un modelo experimental.

### **2. Objetivos secundarios**

- 2.1. Obtener, expandir y manipular ADMSCs para inducir su diferenciación hacia células osteogénicas.
- 2.2. Crear defectos óseos cavitarios en el fémur de ovejas de raza Asaaf.
- 2.3. Utilizar ADMSCs con fenotipo osteogénico para el relleno de los defectos cavitarios utilizando como vector un gel de PRP.
- 2.4. Demostrar la efectividad del implante de ADMSCs en la formación de tejido óseo funcional mediante estudios radiográficos, anatomopatológicos e histomorfométricos.

# MATERIAL Y MÉTODO

### **3. 1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Realizamos un estudio experimental prospectivo:

- Estudio experimental porque es el investigador quien asigna la exposición al procedimiento que se ha de evaluar. La característica fundamental de estos estudios es que se produce una manipulación de una exposición determinada en un grupo de sujetos que se compara con otro u otros grupos en el que no se intervino, o al que se expone a otra intervención. En el momento actual, estos estudios son los que presentan una mayor fiabilidad en la investigación clínica. En nuestro caso comparamos diferentes implantes para la regeneración de un defecto óseo cavitario, que realizábamos previamente.

- Estudio prospectivo porque la información sobre la variable de resultado se recoge a medida que se va produciendo, es decir, hacia futuro. Medimos crecimiento óseo después de un tiempo determinado desde la creación del defecto óseo <sup>124</sup>.

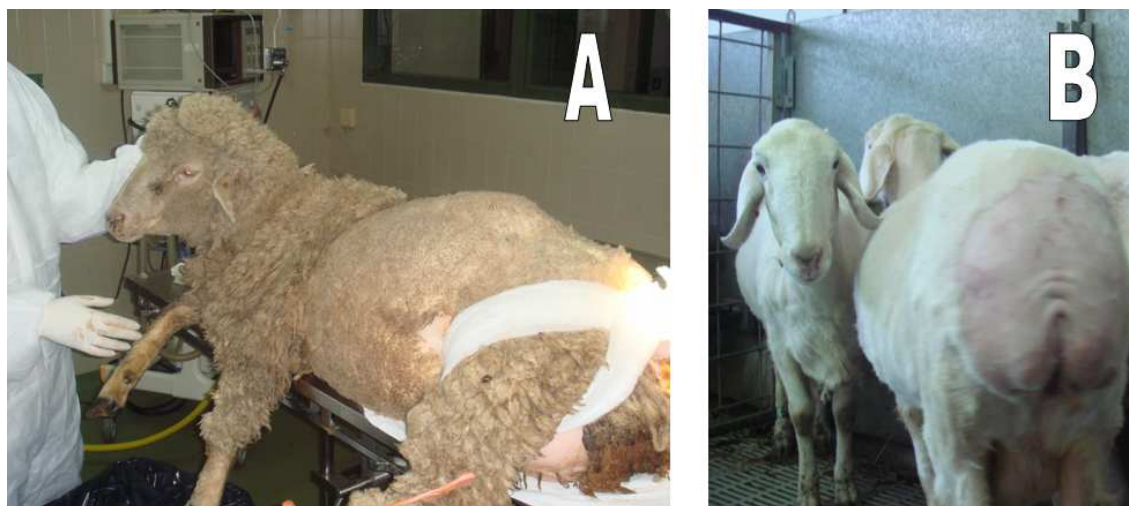
### 3. 2. ÁMBITO DEL ESTUDIO

En el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial de León, en colaboración con el Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco de León y con el Departamento de Cirugía y Medicina Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, hemos trabajado con las siguientes poblaciones:

1. **Población de referencia:** ovejas de raza Asaaf.
2. **Población accesible:** ovejas de raza Asaaf criadas en la granja de la Facultad de Veterinaria del Campus de Vegazana de León.
3. **Población en estudio (material):** 22 ovejas sanas de raza Asaaf, con un peso comprendido entre 50 y 70 kg y una edad de 3-6 años, numeradas las 12 primeras con números romanos (I-XII) y las siguientes, con una letra y un número arábigo (C1-C10). Se excluyeron 3 ovejas: una por pérdida involuntaria de la muestra (oveja C2) y dos por fallecimiento durante el periodo de seguimiento debido a sendas anorexias que ocasionaron una disbiosis intestinal, con toxemia y exitus (ovejas VII y XI). Con todo, el material final del estudio fueron 19 ovejas, de las que se obtuvieron el doble de muestras.

### 3. 3. OBTENCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS INDIVIDUOS DEL ESTUDIO

Comenzamos trabajando con ovejas merinas adultas por la disponibilidad de las mismas en la región. Sin embargo, debido a las dificultades que encontramos para extraer grasa de su organismo, por tratarse de animales de una especie delgada, las sustituimos por ovejas de cola grasa de raza Asaaf (Figura 3.1). De esta manera dispusimos de abundante tejido graso de su cola, que obteníamos de forma sencilla y con poca morbilidad.



**Figs 3.1.** Oveja merina adulta (A) y de raza Asaaf (B), con detalle de su cola.

Las ovejas del estudio se obtuvieron de forma continua compradas por el Departamento de Cirugía y Medicina Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. Antes habíamos puesto a punto el método de obtención de células de grasa trabajando con 10 ovejas obtenidas del matadero municipal de León. En todos los casos se cumplió con la normativa sobre manejo ético de los animales de experimentación según directiva EU 86 / 609 de la Unión Europea y Real Decreto 1201 / 2005 de España.

Los animales fueron identificados mediante un crotal numerado en su oreja que se correspondía con un identificador intraabdominal (Figura 3.2). En todas las ovejas realizamos un defecto óseo en el extremo metafisario distal de cada uno de sus fémures, considerando cada defecto como la unidad de estudio, que dejó de ser el individuo. A continuación, los defectos fueron distribuidos aleatoriamente en siete grupos, un grupo control y seis grupos experimentales en los que se aplicaron diferentes implantes.



**Fig. 3.2.** Detalle del crotal de identificación de las ovejas en la oreja.

Grupos de estudio (unidad = defecto óseo)

- Grupo I (defectos en los que no se implanta nada): 6 defectos óseos.
- Grupo II (defectos en los que se implanta plasma rico en plaquetas –PRP-): 6 defectos óseos.
- Grupo III (defectos en los que se implanta plasma rico en plaquetas –PRP- y células mesenquimales no diferenciadas –ADMSC): 4 defectos óseos.
- Grupo IV (defectos en los que se implanta plasma rico en plaquetas –PRP- y células mesenquimales diferenciadas –ADMSC-0-): 5 defectos óseos.
- Grupo V (defectos en los que se implanta heteroinjerto óseo liofilizado de procedencia bovina en forma de “chips”): 4 defectos óseos. El autoinjerto (procedente de la misma oveja) supone muchos problemas técnicos de obtención y tendría la limitación de poder aportar células osteogénicas adicionalmente.
- Grupo VI (defectos en los que se implanta plasma rico en plaquetas –PRP-, y heteroinjerto óseo liofilizado): 4 defectos óseos.
- Grupo VII (defectos en los que se implanta heteroinjerto óseo liofilizado y células mesenquimales diferenciadas -ADMSC-0-): 4 defectos óseos.
- Grupo VIII (defectos en los que se implanta plasma rico en plaquetas –PRP-, células mesenquimales diferenciadas -ADMSC-0- y heteroinjerto óseo): 5 defectos óseos (Tabla 3.1).

GRUPO	DESCRIPCIÓN	Nº DE DEFECTOS
I	Control	6
II	PRP	6
III	PRP + ADMSC	4
IV	PRP + ADMSC-0	5
V	Heteroinjerto óseo	4
VI	Heteroinjerto óseo + PRP	4
VII	Heteroinjerto óseo + ADMSC-0	4
VIII	Heteroinjerto óseo + PRP + ADMSC-0	5

**Tabla 3.1.** Resumen de los grupos del estudio (PRP = plasma rico en plaquetas; ADMSC = células mesenquimales no diferenciadas; ADMSC-0 = células mesenquimales diferenciadas).

Una vez obtenidos los animales, se cuidaron y mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, en el Campus de Vegazana, bajo condiciones ambientales ideales. Las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas en los quirófanos del Departamento de Cirugía Animal de la misma Facultad de Veterinaria; mientras que el procesado, cultivo y expansión del tejido graso lo fueron en el Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco, en la ciudad de León. Los estudios de imagen se realizaron en la Facultad de Veterinaria; y los anatómo-patológicos e histomorfométricos en el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial de León (Figura 3.3).



**Fig. 3.3.** De izquierda a derecha, facultad de Veterinaria de la Universidad de León, Complejo Asistencial de León y Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco, donde se llevaron a cabo los diferentes pasos del estudio.

#### 4. 4. MATERIALES, CONCEPTOS Y CLASIFICACIONES UTILIZADOS

- **Plasma rico en plaquetas.** El plasma rico en plaquetas (PRP) es un producto biológico, autólogo, no tóxico ni alergénico, que se obtiene mediante centrifugado de la sangre disponiendo así de sus componentes (hematíes, leucocitos, plaquetas y proteínas) en distintas fracciones, según el gradiente de su densidad. Contiene factores de crecimiento y una gran cantidad de otros componentes, tanto intra como extraplaquetarios, con un gran potencial biológico.
- **Células Troncales Mesenquimales.** Las células troncales mesenquimales son células estromales no hematopoyéticas que muestran las siguientes propiedades: son adherentes en cultivo; expresan los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos, como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones *standard* de cultivo. Adicionalmente, muestran la posibilidad de autorrenovarse, de desarrollarse en múltiples líneas celulares y de proliferar sin límite <sup>48</sup>.
- **Heteroinjerto óseo liofilizado.** Un heteroinjerto óseo es un fragmento de tejido óseo de otra especie sometido a un proceso de congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado para separar el agua (Fig 2-4).
- **Chips de injerto óseo.** Un chip de injerto óseo es un pequeño fragmento (minifragmento) de injerto óseo (Figura 3.4).

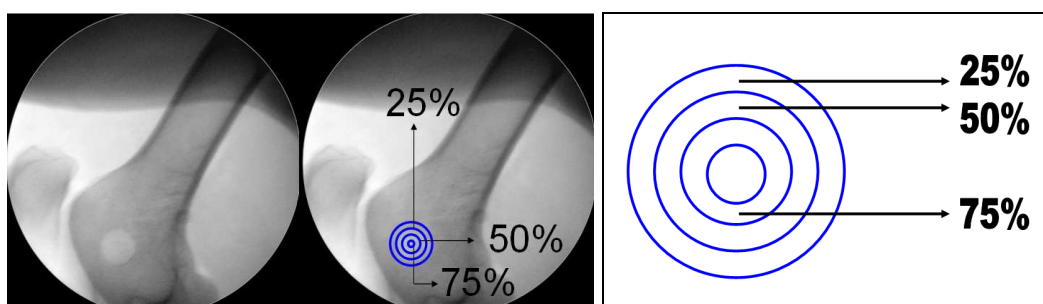


**Fig 3.4.** De izquierda a derecha. Hueso previo a proceso de liofilizado. Chip de hueso liofilizado previo al implante.



- **Variables radiográficas.** Utilizamos la escala de Lane y Shandu <sup>48;125</sup> para el estudio de la regeneración ósea, valorando el porcentaje de formación ósea y el remodelado óseo (Tabla 3.2 y 3.3 y Figuras 3.5 y 3.6).

% DE FORMACIÓN ÓSEA	VALOR
Ninguno	0
25%	1
50%	2
75%	3
100%	4



**Tabla 3.2 y figuras 3.5 y 3.6.** Arriba, tabla de porcentajes de formación ósea en el defecto femoral y el valor concedido a cada porcentaje, considerando como formación ósea la pérdida de radiolucencia del defecto en círculos concéntricos desde la periferia hacia el centro. Abajo, esquema de los círculos concéntricos estimados para el cálculo del porcentaje de formación ósea.

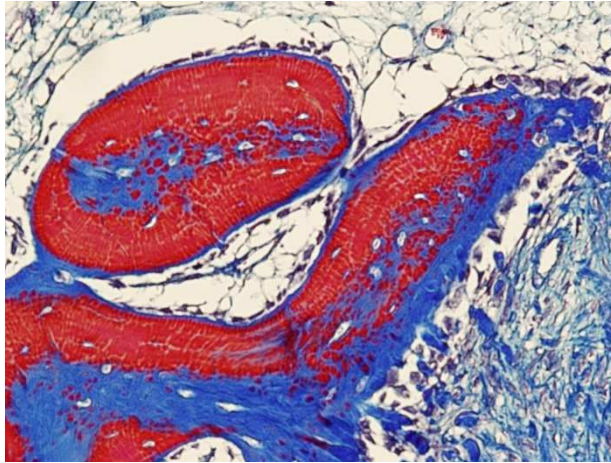
REMODELACIÓN ÓSEA	VALOR
Ninguna	0
Apreciable	2
Completo	4

**Tabla 3.3.** Valores de la remodelación ósea, considerando como tal la modificación sufrida en el contorno del defecto óseo original. Por remodelación ósea apreciable entendimos la pérdida de definición o regularidad de los bordes del defecto. Por remodelación ósea completa, la desaparición de la radiolucencia del defecto.

- **Variables anatomo-patológicas.** Para la evaluación histológica de los cortes se cuantificó el crecimiento óseo en la esponjosa en función de la actividad celular dentro del defecto y en la periferia del mismo <sup>125</sup>. Se utilizó una escala cuantitativa ordinal en la cual una mayor puntuación significaba un mayor crecimiento (Tabla 3.4 y figura 3.7).

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	VALOR
No actividad celular	0
Aposición temprana de hueso nuevo	1
Aposición activa de hueso nuevo	2
Reorganización del tejido esponjoso (aparición de osteoclastos)	3
Esponjoso completamente reorganizada	4

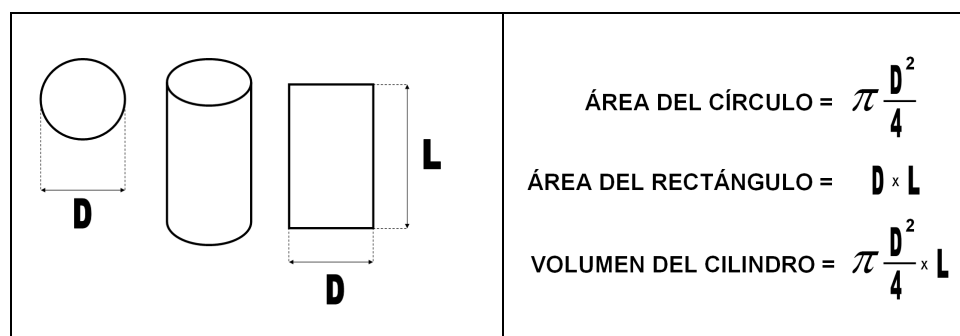
**Tabla 3.4.** Valores de la evaluación histológica de los cortes.



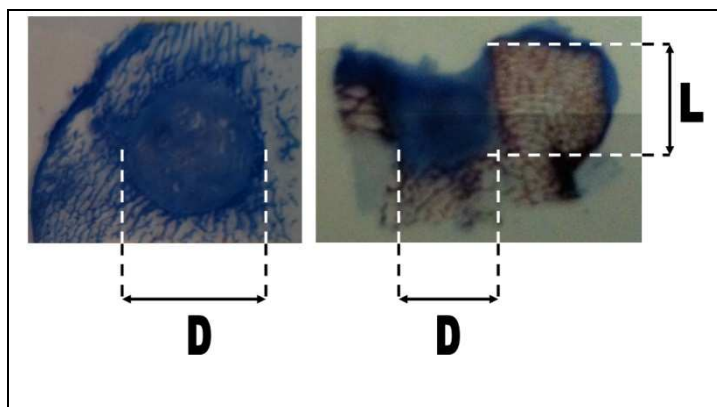
**Fig. 3.7.** Aposición temprana de hueso nuevo. Se observa ribete osteoblástico alrededor de las trabéculas óseas. Tricrómico de Masson. 100X.

- **Variables histomorfométricas.** La histomorfometría ósea es el análisis histológico cuantitativo de los diferentes elementos que integran el tejido óseo (células y sustancia intercelular), resultando de relacionar entre sí una serie de recuentos y mediciones <sup>126</sup>. Los parámetros histomorfométricos nos permiten definir cuantitativamente las características estructurales y funcionales del hueso en condiciones normales, patológicas o experimentales. En este trabajo hemos utilizado parámetros estáticos primarios y secundarios, realizando las mediciones de áreas mediante un método semiautomático, las distancias de manera automática y los contajes celulares de forma manual.

1. Medidas geométricas del defecto óseo (de 13 mm de diámetro y 11 mm de profundidad) (Figuras 3.8 y 3.9):
  - 1.1. Medida del área del círculo de la sección transversal del defecto.
  - 1.2. Medida del área del rectángulo de la sección coronal del defecto.
  - 1.3. Medida del volumen del defecto.



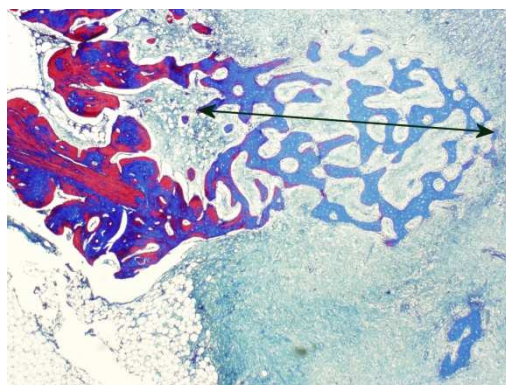
**Fig. 3.8.** Representación esquemática de los cálculos del volumen de un cilindro y del área del círculo y del rectángulo de su sección transversal y coronal.



**Fig. 3.9.** Representación esquemática de las medidas de los diámetros y longitudes de las secciones transversal y coronal de los defectos del estudio.

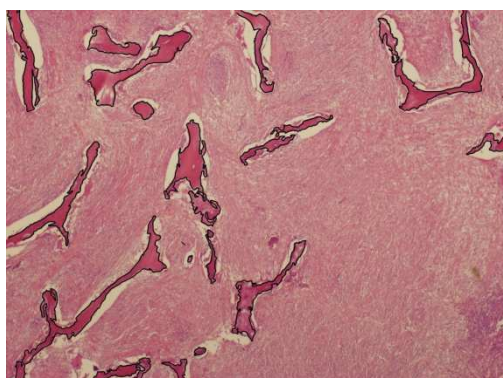
1.4. Área trabecular total. Es el área que ocupan las trabéculas óseas en el defecto cavitario creado e indica la cantidad de tejido óseo presente en su interior.

1.5. Profundidad de crecimiento. Es la neoformación ósea progresando de forma centrípeta desde los bordes en los defectos óseos implantados. Medida en mm, corresponde al valor promedio del máximo diámetro de todos los osículos encontrados en el interior del defecto óseo (Figura 3.10).



**Fig. 3.10.** Representación esquemática de la medida de la profundidad de crecimiento: distancia comprendida entre las dos puntas de flecha. Corresponde al diámetro máximo del osículo.

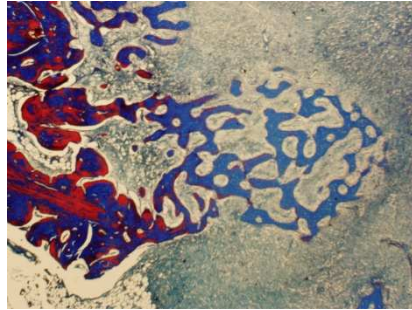
1.6. Área de microfragmentos del hueso liofilizado. Es el sumatorio del área de cada uno de los microfragmentos de hueso liofilizado que se implantan dentro del defecto (Figura 3.11).



**Fig. 3.11.** Representación esquemática del área del hueso liofilizado, resultante del sumatorio de las diferentes áreas de hueso liofilizado, marcado en negro en la figura.

2. Medidas de los osículos (neoformación ósea que a modo de pseudópodo se introduce en el tejido del huésped):

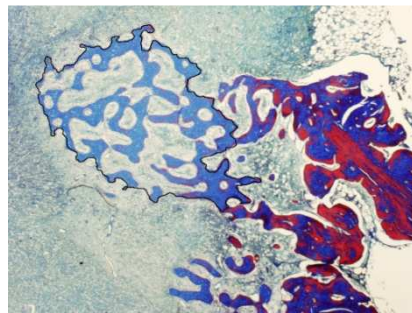
2.1. Número de osículos según la escala de Ranly <sup>127</sup> (Figura 3.12 y tabla 3.5).



1	=	Ningún osículo
2	=	Un osículo
3	=	2 ó más osículos
4	=	> 70% de osículos (40X)

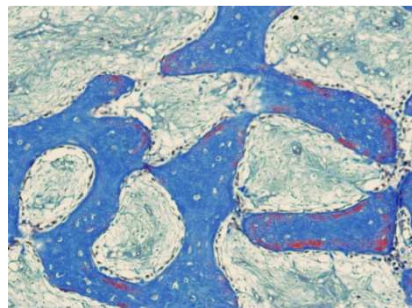
**Fig. 3.12 y tabla 3.5.** A la izquierda, imagen de un osículo. A la derecha, escala de Ranly<sup>127</sup>

2.2. Área de cada osículo. Mediante medición directa del área a través del programa analysis (Olimpus<sup>R</sup>), conectado al microscopio (Fig 3.13).



**Fig. 3.13.** Representación esquemática de la medida del área del osículo, marcado por una línea negra en toda su periferia.

2.3. Número de osteocitos en cada osículo. Mediante contaje directo del número de osteocitos existentes en cada osículo, a 100X (Figura 3.14).

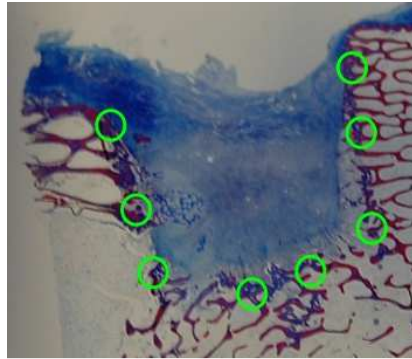


**Fig. 3.14.** Detalle de osículo, donde se observan los osteocitos dentro de las lagunas (en blanco).

3. Medidas celulares.

3.1. Ribete de osteoblastos. Es el conjunto de osteoblastos que rodean a cada una de las trabéculas óseas en la periferia del defecto.

Realizamos el conteo de los mismos eligiendo 8 zonas aleatorias de la zona más cercana al defecto. En todos los casos elegimos la preparación de la sección central de los cortes del defecto (Figura 3.15).

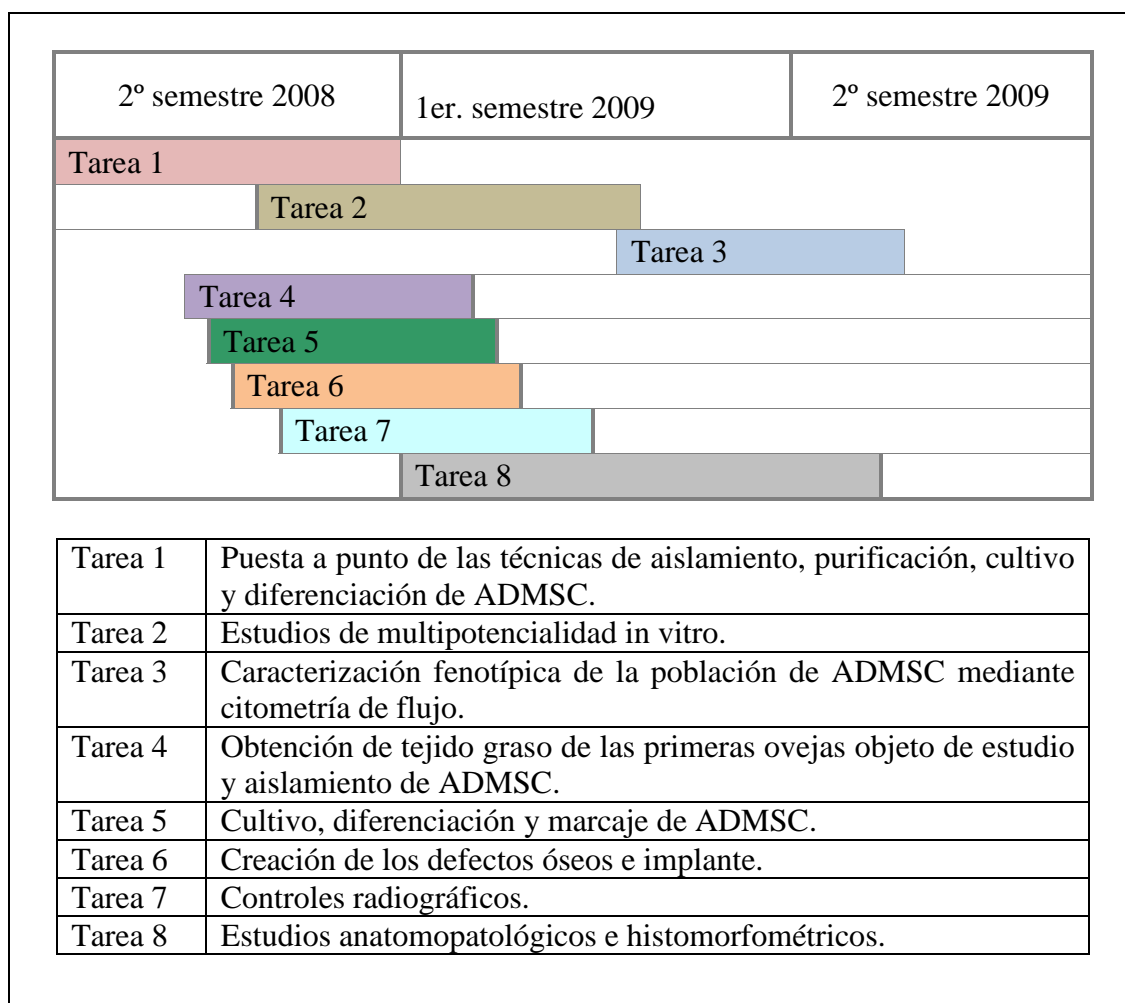


**Fig. 3.15.** Marcaje de las 8 zonas que se eligen de manera aleatoria para realizar el conteo del ribete osteoblástico.

- 3.2. Número de osteoblastos. Realizamos el conteo de los osteoblastos dentro del defecto. Consideramos el osteoblasto como célula de un solo núcleo y citoplasma basófilo, con forma aplanada cúbica o cilíndrica en función de su mayor o menor grado de actividad.
- 3.3. Número de osteoclastos. Contaje de número de osteoclastos dentro del defecto. Son células grandes multinucleadas con citoplasma ligeramente acidófilo.

### 3.5. CRONOGRAMA Y FASES DEL ESTUDIO

El estudio fue llevado a cabo una vez conseguidos e identificados los animales de experimentación y puestas a punto las técnicas de aislamiento, purificación, cultivo y diferenciación de células mesenquimales (ADMSC) de la grasa según se especifica en el cronograma de la figura 3.16 y en las tablas 3.6 y 3.7.



**Fig. 3.15 y tabla 3.6.** Cronograma del estudio.

0. Puesta a punto de las técnicas de cultivo y diferenciación in vitro
1. Premedicación, anestesia y preparación del campo quirúrgico de la oveja
2. Obtención de grasa de la cola de la oveja en condiciones de esterilidad y asepsia
3. Procesado del tejido graso en campana de flujo laminar y con material estéril para obtener ADMSCs
4. Cultivo primario y expansión de las ADMSCs
5. Inducción osteogénica de las ADMSCs
6. Caracterización de las ADMSCs
7. Pruebas inmunohistoquímicas
8. Marcaje de las células a implantar
9. Elaboración de la matriz de fibrina del animal de experimentación (plasma rico en plaquetas –PRP-) y adición de células
10. Creación del defecto óseo cavitario en el animal de experimentación y aplicación del constructor
11. Control mediante imágenes de la reparación ósea
12. Sacrificio de los animales en los tiempos convenidos y obtención de las muestras
13. Estudio anatomopatológico e histomorfométrico de las muestras

**Tabla 3.7.** *Resumen de la relación de fases del estudio.*

### 3.6. MÉTODOS INSTRUMENTALES

- 0. Puesta a punto de las técnicas de cultivo y diferenciación in vitro.** Para el cultivo de las ADMSC aisladas se procedió a la siembra a alta densidad (con objeto de asegurar el cultivo primario) sobre superficies plásticas en medio de expansión de cultivo primario (DMEM, 10% Suero bovino fetal, 1% Penicilina/Estreptomicina, 1% L-Glutamina y 2,5ng/ml FGFb) (Figura 3.17). El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. En estas condiciones las células en cultivo alcanzaron el estado de confluencia en 7-12 días.



**Fig. 3.17.** Establecimiento de cultivo primario sobre superficie plástica.

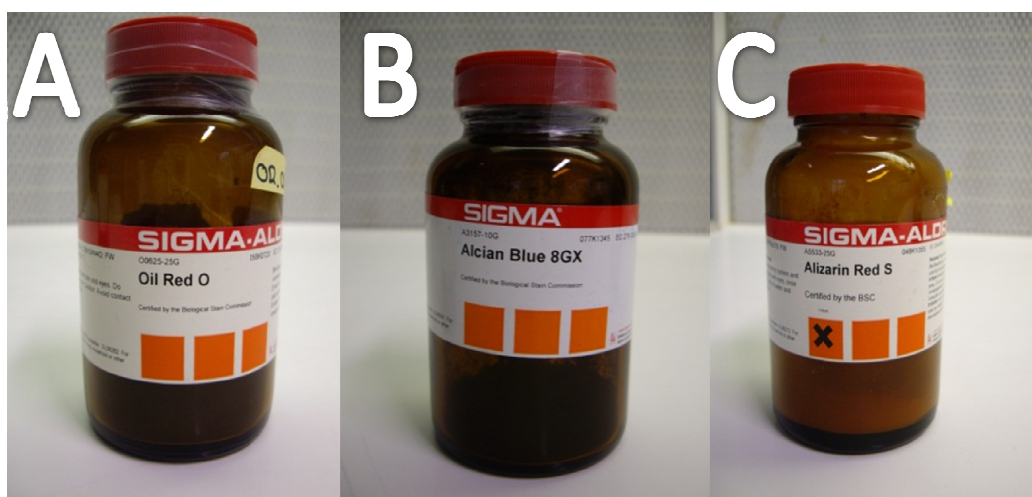
En cuanto a la multipotencialidad de las células en cultivo, se pusieron a punto las técnicas de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica.

*Inducción adipogénica.* Para la diferenciación de las ADMSCs hacia células de fenotipo adipocítico, éstas se cultivaron en medio adipogénico (DMEM, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina -PAA Lab.-, 1µM dexametasona -Sigma-, 0,5mM IBMX -Sigma-, 10µM insulina -Sigma- y 200µM indometacina -Sigma-) y, posteriormente, se realizó la tinción Oil Red O (Sigma) para evidenciar la formación intracelular de vacuolas con contenido lipídico (marcador característico de adipocitos) (Figura 3.18).

*Inducción condrogénica.* Para inducir la diferenciación condrogénica de ADMSCs, las células fueron cultivadas en medio condrogénico (DMEM, 1% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina, 50 µg/ml ácido ascórbico, 6,25 µg/ml insulina y 10 ng/ml TGF β1 -Sigma-) durante 21 días. Se probaron diversas estrategias de cultivo: en monocapa, en pellet y en matriz de fibrina. Para el cultivo en monocapa las células fueron sembradas sobre superficies plásticas y cultivadas con medio condrogénico. Para el cultivo en pellet,  $1 \times 10^6$  células fueron centrifugadas y cultivadas adicionando el medio condrogénico sin provocar la resuspensión del pellet. Para el cultivo en matriz de fibrina,  $1 \times 10^6$  células fueron sembradas en 100 µl de fibrina elaborada a partir de plasma ovino, como se describió en el apartado correspondiente. La caracterización de la diferenciación condrogénica se realizó mediante la observación al microscopio de la morfología celular y mediante tinción con Azul Alcían, que tiñe de azul los proteoglicanos típicos de la matriz cartilaginosa (Figura 3.18).



**Inducción osteogénica.** Para inducir células osteogénicas, las ADMSCs fueron cultivadas en medio osteogénico (DMEM, 5% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina, 10 $\mu$ M dexametasona, 150mM ácido L-ascórbico –Biomedica- y 10mM  $\beta$ -glicerolfosfato –Sigma-), completando la inducción con la adición al medio durante las primeras 48 horas de 10 ng/ml de proteína morfogenética 2 (BMP2) –Sigma-. Tras 7, 14 y 21 días de inducción se realizó una tinción con Alizarin Red (Sigma), que tiñe de rojo la matriz mineralizada (marcador característico de diferenciación osteogénica) (Figura 3.18).

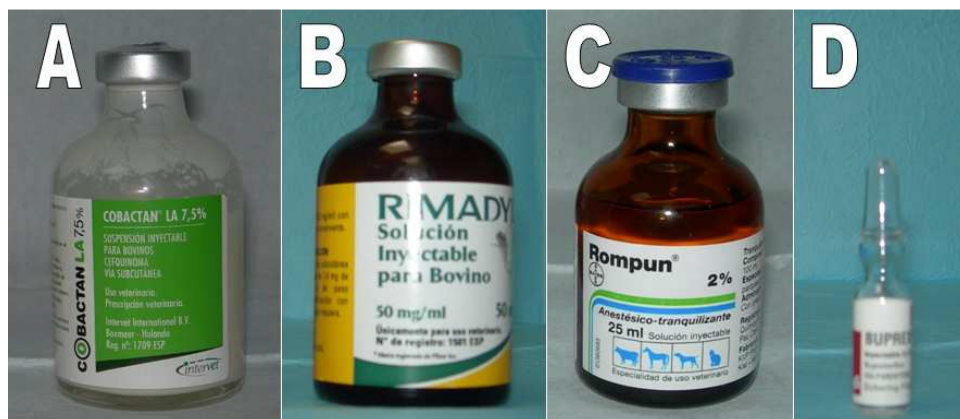


**Fig. 3.18.** Tinciones utilizadas para demostrar la multipotencialidad celular: Oil red, adipogénica (A); Alcian Blue, condrogénica (B); Alizarin red, osteogénica (C).

Tras probar sin éxito la diferenciación condrogénica de ADMSC mediante cultivo en monocapa, se llegó a la conclusión de que era necesario cultivar un gran número de células en un ambiente tridimensional para lograrlo, por lo que probamos nuevas estrategias (basadas en cultivos en *pellet* y en matriz de fibrina).

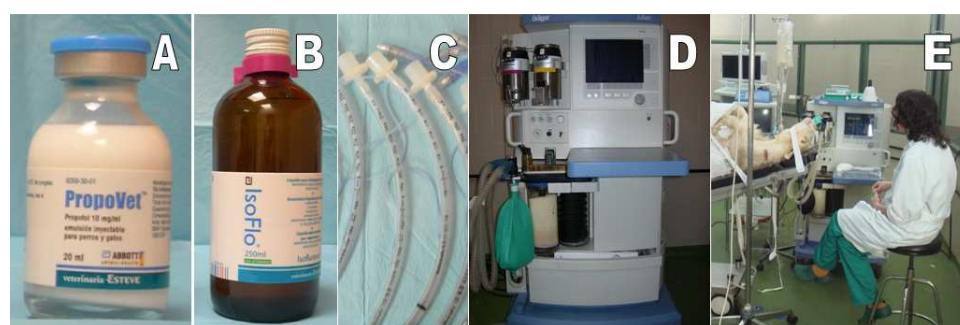
1. **Premedicación, anestesia y preparación del campo quirúrgico de la oveja.** Después de un ayuno de sólidos y líquidos de 24 y 4 horas, respectivamente, a todas las ovejas se realizó profilaxis antibiótica y tratamiento analgésico y antiinflamatorio antes de la anestesia (Figura 3.19).
  - 1.1. Profilaxis antibiótica: 2 mg/kg subcutánea de Cefquimoma (Cobactan LA 7,5%<sup>®</sup>). Repetir a las 48h de la intervención.
  - 1.2. Tratamiento analgésico y antiinflamatorio: 1.4 mg/kg SC de carprofeno (Rimadyl<sup>®</sup>).

- 1.3. Medicación y tratamiento preanestésico: 0.05 mg/kg IM de xilacina (Rompun®), 0.01 mg/kg IM de buprenorfina (Buprex®), y 1 mg/kg IM de ketamina (Imalgene®). Tras 10-15 minutos se procedió a la cateterización de la vena yugular, previo rasurado de la zona, con un catéter endovenoso de 14G, manteniendo fluidoterapia endovenosa de suero salino fisiológico a dosis de 10 ml/kg/hora. Anestesia y monitorización.



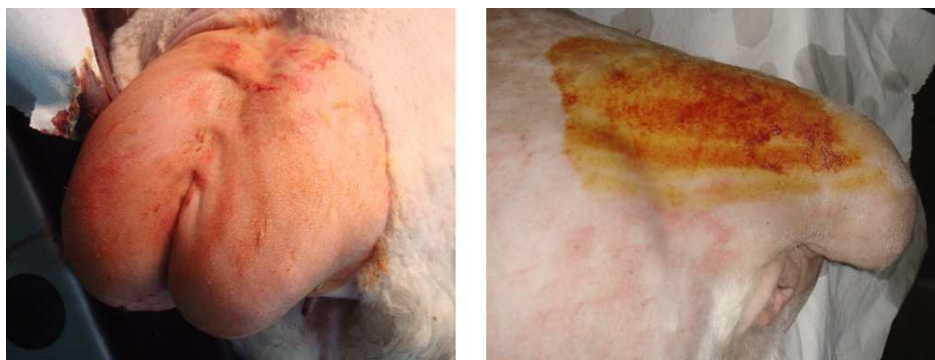
**Fig. 3.19.** Premedicación de los animales de la serie con tratamiento antibiótico (A), analgésico-antiinflamatorio (B) y preanestésico (C y D).

- 1.4. Inducción y mantenimiento anestésico. Para la inducción anestésica se administró propofol (PropoVet®) a dosis de 4-6 mg/kg por vía endovenosa, tras lo cual se procedió a la intubación del animal con una sonda endotraqueal de 9 mm y a su conexión a un equipo de anestesia inhalatoria Julian Dräger (circuito semicerrado), empleando para el mantenimiento anestésico un 2% de isoflurano (Iso Vet®) y un flujo de gas fresco de 150 ml/Kg/minuto de O<sub>2</sub> al 100%. El animal se mantuvo monitorizado permanentemente mediante pulsioximetría, capnografía y ECG, con un monitor Omnicare CM8 24 de Hewlett Packard (Figura 3.20).



**Fig. 3.20.** Medicamentos para la inducción y mantenimiento anestésico (A y B), con sondas endotraqueales (C) y monitor de anestesia (D y E).

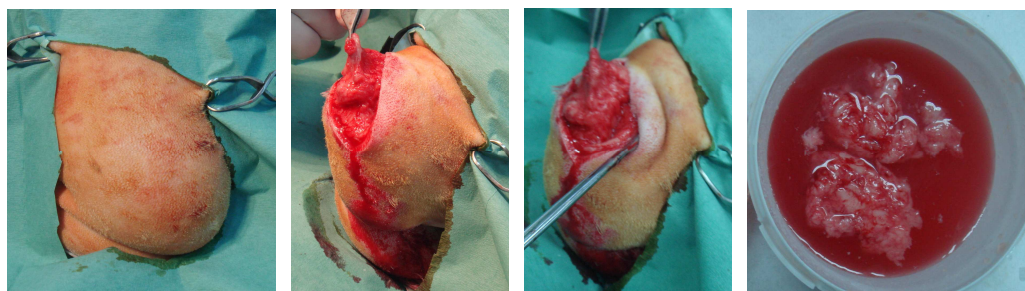
- 1.5. Preparación del campo quirúrgico. La cola de los animales fue rasurada, lavada con aguja jabonosa y, posteriormente, pintada con povidona yodada (Figura 3.21).



**Fig. 3.21.** Detalles de la cola de la oveja, rasurada y pintada con povidona yodada.

- 2. Obtención de grasa de la cola de la oveja en condiciones de esterilidad y asepsia.** Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas de la cola de la oveja en un único tiempo quirúrgico bajo estrictas condiciones de esterilidad y asepsia. Con el animal en decúbito lateral sobre la mesa quirúrgica se realizó una incisión cutánea longitudinal paramedial a nivel de la cola de aproximadamente 6 cm de longitud. Expuesto el tejido celular subcutáneo se procedió a la extracción de 10-20 gramos de grasa de la profundidad, fragmentándose para facilitar su posterior procesamiento (Figura 3.22). Tras el pertinente lavado con suero fisiológico, comprobada una hemostasia correcta, se procedió al cierre por planos de la herida quirúrgica, que se cubrió con gasas furacinadas y un apósito (Figura 3.23). Las muestras fueron recogidas en recipientes estériles (en una solución de suero fisiológico, antibióticos y antifúngicos, en la que permanecieron al menos 6 horas para asegurar la descontaminación del tejido) y transportadas inmediatamente al laboratorio de cultivos celulares del Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco, donde se almacenaron en congelador.

La extracción de grasa comenzó haciéndose mediante liposucción pero, debido a la consistencia del tejido adiposo, las muestras fueron insuficientes, por lo que se cambió a una técnica quirúrgica convencional que nos permitía un buen acceso con poca morbilidad para el animal.



**Figura 3.22.** Extracción de tejido adiposo de la cola de la oveja y depósito en un recipiente estéril en una solución de suero fisiológico con antibiótico.



**Fig. 3.23.** Ovejas estabuladas tras la extracción de la grasa de la cola (izquierda) y detalle de la herida quirúrgica suturada (derecha).

- 3. Procesado del tejido graso en campana de flujo laminar y con material estéril para obtener ADMSCs.** Las muestras de tejido graso fueron sometidas a sucesivos lavados con suero salino tamponado con fosfato (PBS-Sigma-) estéril para eliminar el componente sanguíneo en la medida de lo posible. Posteriormente, el tejido graso fue troceado en fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup> aproximadamente (Figura 3.24) y sometido a digestión enzimática con colagenasa tipo I (Sigma) en DMEM (PAA Laboratorios GMBH) a 37° C, obteniéndose una media de 121 ± 129 células por cada miligramo de tejido digerido. Cuando el tejido estuvo totalmente digerido las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm (720 g) durante 10 minutos (Figura 3.25) y, tras desechar el sobrenadante, la fracción del estroma vascular (SVF) fue resuspendida en medio de cultivo de ADMSCs, consistente en DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SbF-Linus-), 1% de Penicilina/Estreptomicina (PAA Lab.), un 1% de Glutamina (PAA Lab) y 2,5 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico (Sigma). Para evaluar la viabilidad de las suspensiones celulares obtenidas se utilizó el método Azul Tripán. Las condiciones óptimas para el aislamiento de ADMSCs se estudiaron analizando las variables convenidas.

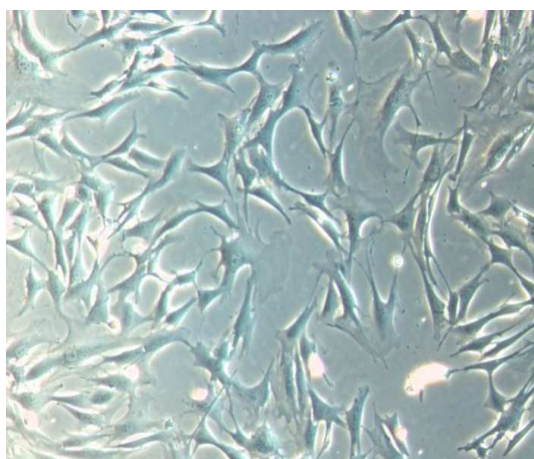


**Fig. 3.24.** Secuencia de disgregación mecánica del tejido adiposo.



**Fig. 3.25.** Tubo de centrifugado tras la digestión enzimática del tejido adiposo. De arriba abajo se distingue el componente graso, la solución de digestión y la fracción del estroma vascular donde están las ADMSCs.

- 4. Cultivo primario y expansión de las ADMSCs.** Las suspensiones celulares obtenidas fueron sembradas en pocillos de 2 cm<sup>2</sup> a una densidad de 30.000 células/cm<sup>2</sup>, suplementando el medio de expansión de ADMSCs con factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF-b), constituyendo el cultivo primario (0P), e incubadas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Transcurridas 48 horas, los cultivos fueron sometidos a un lavado con PBS para eliminar el componente eritrocitario, quedando en los pocillos únicamente las células capaces de adherirse a ellos (ADMSCs). Cada 2-3 días se cambió el medio de cultivo y, cuando los cultivos alcanzaron el estado de preconfluencia, fueron tripsinizados (Tripsina-EDTA- PAA Lab.) y estimada la viabilidad celular mediante el método Azul Tripán. Para posteriores estudios los cultivos secundarios (1P y 2P) se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup>.
- 5. Inducción osteogénica de las ADMSCs.** Las células obtenidas a partir de los cultivos primarios confluentes de ADMSCs fueron sembradas en superficies plásticas (placas multipocillo) y cultivadas en un medio de expansión para las ADMSCs hasta que alcanzaron el estado de preconfluencia (7-14 días) (Figura 3.26). Una vez alcanzado dicho estado, las células se separaron de la superficie de cultivo mediante tripsinización y se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie para su expansión *in vitro* con un medio de inducción de la diferenciación hacia osteoblastos, suplementado con β-glicerolfosfato, ácido ascórbico, proteína morfogenética de tipo 2 (BMP-2) y dexametasona. Los cultivos se mantuvieron bajo estas condiciones durante 7 días. Al final de este período las células estuvieron listas para su caracterización e implante.



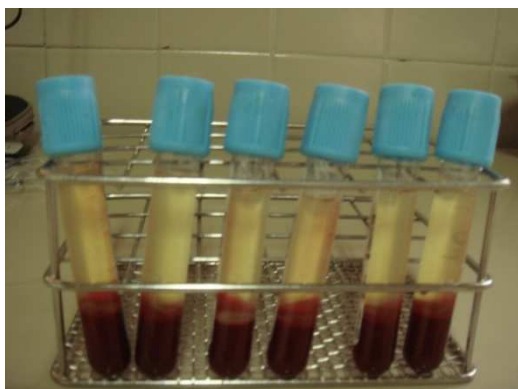
**Fig. 3.26.** ADMSC en cultivo primario.

En los casos en los que el objetivo fue implantar ADMSC sin diferenciar (grupo III), las células se mantuvieron en medio simple (DMEM, 10% Suero bovino fetal, 1% Penicilina/Estreptomicina, 1% L-Glutamina), que se cambió cada 2-3 días, hasta que el cultivo alcanzó el estado de preconfluencia, momento en el que las células fueron tripsinizadas para su posterior implante.

En los casos en los que lo que se pretendía era implantar ADMSC inducidas osteogénicamente (Grupos IV, VII y VIII), las células se mantuvieron en medio simple durante 4-6 días, momento en el que se comenzó la inducción mediante cultivo con medio osteogénico durante 7 días. Tras el periodo de inducción, las células fueron tripsinizadas para su implante.

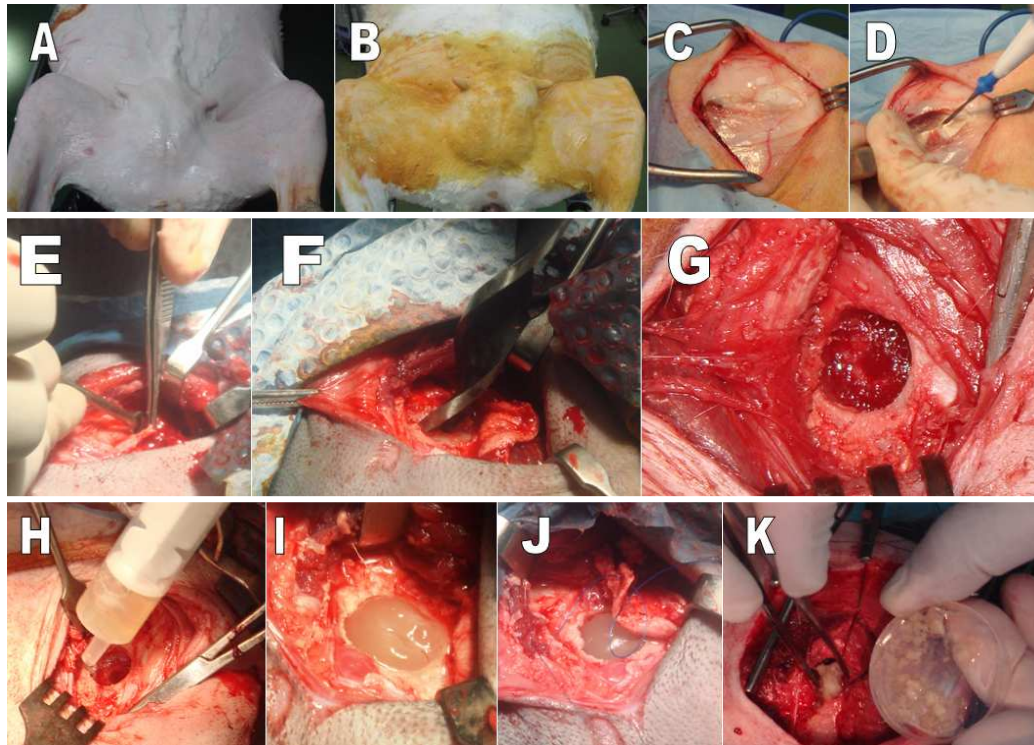
Una vez tripsinizadas, se procedió a contar el número de células obtenidas mediante el método Azul-Tripán para seleccionar el número apropiado de células a implantar, que se ha establecido en 2 millones de células. Tras centrifugar las células, éstas fueron transportadas a quirófano en forma de *pellet* con 100  $\mu$ l de medio de cultivo y a 4°C.

6. **Marcaje de las células a implantar.** Para poder realizar un seguimiento de las células implantadas en las lesiones de los animales de experimentación, los cultivos de ADMSCs que iban a ser implantados se marcaron utilizando 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), que fue añadido al medio a una concentración de 10 $\mu$ M durante las 72 horas previas al implante. Así, las células implantadas pudieron ser localizadas en las regiones de la lesión. La detección posterior de las células BrdU-positivas se realizó sobre cortes de tejido óseo mediante técnicas inmunohistoquímicas.
7. **Elaboración de la matriz de fibrina del animal de experimentación (plasma rico en plaquetas –PRP-) y adición de células.** Con la oveja anestesiada se recogió una muestra de 15-25 ml de sangre del animal en tubos de extracción de sangre con citrato, para evitar su coagulación. Tras una centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos para separar el componente eritrocitario y la serie blanca del plasma (Figura 3.27), esta fracción del componente plasmático, rica en plaquetas, fue recogida en un recipiente estéril en forma de PRP. En 2 ml de éste se resuspendieron las células, que se habían transportado en forma de *pellet*, y se añadieron 50  $\mu$ l/ml de cloruro cálcico para provocar la coagulación del plasma y que adoptara forma de gel. En los casos en los que se implantó únicamente PRP en el defecto óseo, se procedió de la misma manera, pero sin añadir el componente celular.



**Fig. 3.27.** Separación del componente celular del plasmático en el proceso de elaboración del PRP.

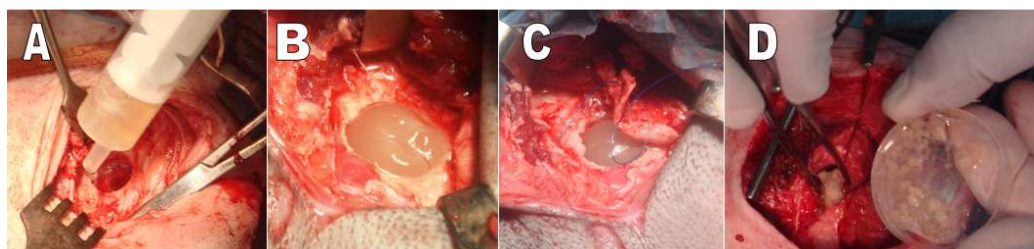
- 8. Creación del defecto óseo cavitario en el animal de experimentación y aplicación del constructor.** Con el animal en decúbito supino, bajo las mismas condiciones de esterilidad y asepsia, se realizó una incisión cutánea longitudinal a nivel de la cara interna del extremo distal de la pata de la oveja de unos 8 cm de longitud. Incidida la fascia, se separaron las fibras del músculo vasto medial y se expuso el cóndilo femoral interno, con la rótula como referencia. Desperiostizada la región metafisaria del extremo distal del fémur, teniendo en cuenta que el diámetro condilar es de unos 4 cm, se marcó con un punzón su centro geométrico y se realizó un orificio de 11 mm de ancho por 13 mm de profundidad empleando una broca montada en un motor eléctrico estéril, como hizo Walsh en su modelo experimental <sup>128</sup>. A continuación, lavado convenientemente el defecto con suero salino para eliminar los detritus, secado con gasas y comprobado su tamaño, realizamos 4 perforaciones equidistantes a lo largo de toda su circunferencia para fijar en ellas el parche de taponamiento (Figura 3.28).



**Fig. 3.28.** Secuencia de realización del defecto óseo en el fémur de la oveja. Arriba, posición del animal (A), preparación del campo quirúrgico (B) y abordaje al fémur (C y D). Abajo, desperiostización y exposición de la cortical del extremo distal del fémur (E), realización del defecto con la broca (F) y detalle del defecto (G).

Implantamos el constructor atendiendo al grupo de estudio y procedimos al cierre por planos de la herida quirúrgica, comenzando por el sellado del defecto óseo con un parche de poliglicólico que se suturó mediante puntos transósseos con SSA de 2/0. Una vez comprobado mediante un control radiográfico intraoperatorio la corrección del procedimiento y la ausencia de fracturas, procedimos al cierre por planos de la herida quirúrgica. Se suturó el vasto medial y la fascia correspondiente con sutura discontinua, así como el tejido celular subcutáneo y la piel con sutura continua. Aplicamos una gasa furacinada, un apósito sobre la herida quirúrgica y un vendaje compresivo en la pata del animal y dimos por concluido el procedimiento. En todos los casos se realizaron defectos cavitarios en ámbos fémures en un mismo acto quirúrgico.

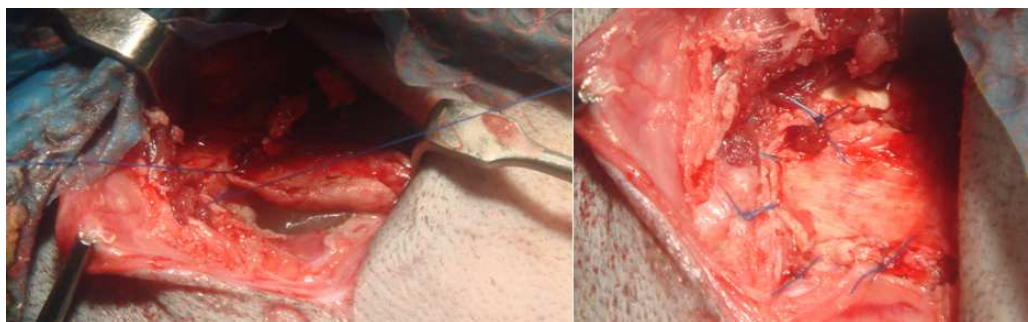
Las células y el PRP se aplicaron en el defecto “a cielo abierto”, habiendo intentado previamente sin éxito hacerlo de forma percutánea (Figura 3.29).



**Fig 3.29.** Aplicación de constructores: PRP (A-C) y heteroinjerto óseo (D).



El sellado del defecto óseo se realizó inicialmente con un colgajo de periostio que fue sustituido por otro fascio-graso obtenido de la vecindad que carecía de las células que sí tenía el primero y, finalmente, por una malla de poliglicólico (Figuras 3.30 y 3.31).



**Fig. 3.30.** *Secuencia de cierre de un defecto óseo con colgajo perióstico.*



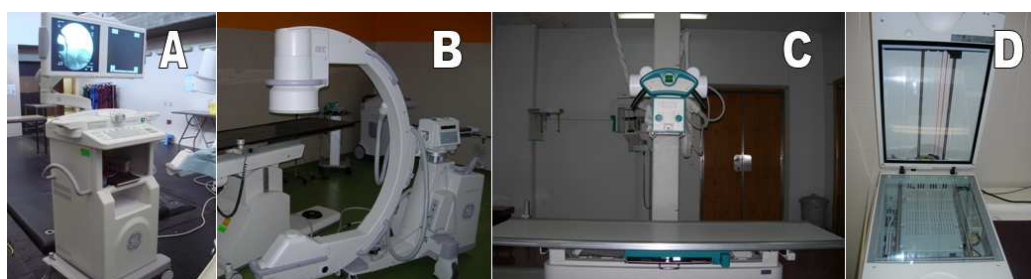
**Fig. 3.31.** *Secuencias de cierre de defectos óseos con colgajo fascio-graso (a la izquierda) y con un fragmento de malla de poliglicólico (a la derecha).*

Después de la intervención, cada oveja fue devuelta a su jaula, donde permanecieron hasta completar el periodo de estabulación predeterminado, de acuerdo con el grupo de estudio específico al que pertenecían (Figura 3.32). Durante la primera semana de postoperatorio se administró un analgésico (carprofeno -Rimadyl ®-) a dosis de 1.4 mg/Kg/día por vía subcutánea; y diariamente se evaluó el consumo normal de agua y alimentos, el estado de la herida y la movilidad espontánea de la extremidad intervenida.

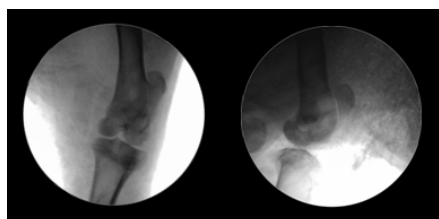


**Fig 3.32.** *Estabulación de las ovejas.*

9. **Control mediante imágenes de la reparación ósea.** En todos los casos y controles se realizó un control radiográfico inmediatamente después de cada intervención, a las 4 y 12 semanas, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. El control radiográfico inmediato se realizó mediante Fluoroscan; el resto de imágenes mediante un aparato de radiología de la Fundación Clínica San Francisco (generador Sedecal SHF 535 t máxima 150 kV intensidad máxima 500 mA con tubo emisor Comet Xstar 14 y soporte Sedecal óptima). Todas las radiografías se realizaron con una distancia focal de 100 cm, 42 KV, 36 mAs, empleando placas de mamografía de (grano fino Min-R S de 18 x 24 cm (Kodak ®) cambio a 20 x 25 cm dt mamoray (Agfa ®). Posteriormente, las radiografías fueron digitalizadas para facilitar la interpretación de las imágenes con el ScanMaker 9800 XL. Microket (Figuras 3.33 y 3.34) y, a continuación, interpretadas por el doctorando aplicando la escala de Lane y Sandhu<sup>125</sup>.

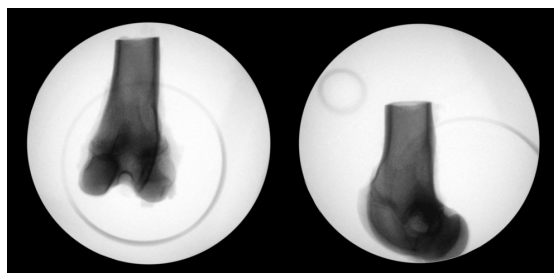


**Fig. 3.33.** Equipamiento tecnológico para el análisis radiográfico del estudio.

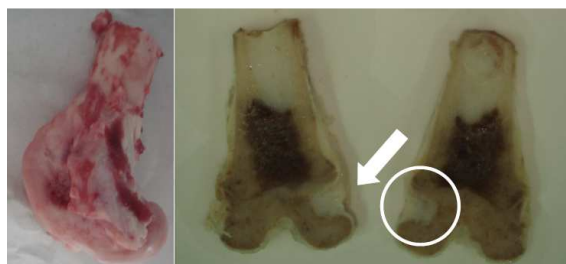


**Fig. 3.34.** Control radiográfico de la pata intervenida de un animal del estudio, en proyecciones ántero-posterior y lateral.

10. **Sacrificio de los animales en los tiempos convenidos y obtención de las muestras.** En los plazos acordados cada animal de experimentación fue sacrificado (4 y 12 semanas) mediante una sedación previa con xilacina y ketamina, y la posterior administración por vía endovenosa de mebutramida, mebezonio yoduro y tetracaína clorhidrato (T-61®) a dosis de 0.3 ml/kg. Las muestras óseas fueron extraídas realizando un abordaje medial longitudinal en el muslo de ambas patas. Alcanzados los fémures, se desarticularon ambos a nivel de la rodilla y, a continuación, se realizó una osteotomía a 8 cm proximalmente a la interlínea articular fémoro-tibial. Liberado el extremo distal de cada fémur de todas las partes blandas, fueron incluidos en una solución de formol. Posteriormente se realizó de control radiográfico (Figura 3.35), finalmente, se enviaron al Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial de León, donde se mantuvieron decalcificándose (Figura 3.36).



**Fig. 3.35.** Control radiográfico de la pata de un animal del estudio después de sacrificado, en proyecciones ántero-posterior y lateral.



**Fig. 3.36.** Extremo distal del fémur tras el sacrificio del animal y detalle de su sección, con señalización del defecto (flecha y círculo).

Los tiempos de sacrificio de los animales, inicialmente planificados para realizar a las 4, 6, 8, 10 y 12 semanas del tratamiento, se realizaron a las 4 y 12 semanas después de observar que los tiempos suprimidos eran prescindibles (Tabla 3.8).

IMPLANTE-SACRIFICIO	TIEMPO	
	4 SEMANAS	12 SEMANAS
CONTROL	3	3
PRP	4	2
CELS NO DIF -PRP	2	2
CELS DIF-PRP	3	2
CHIP	2	2
CHIP-PRP	2	2
CHIP-CELS DIF	3	1
CHIP-CELS DIF-PRP	3	2
TOTAL	22	16

**Tabla 3.8.** Resumen de los grupos, momento del sacrificio y total de defectos óseos del estudio.

- Estudio anatomopatológico e histomorfométrico de las muestras.** Las muestras, una vez sacrificado el animal, se mantuvieron en formol al 10% hasta el procesado para la fijación. En primer lugar se realizó el corte del fémur distal con sierra oscilante. Posteriormente se decalcificó hasta el tallado de la muestra. Una vez tallada ésta se inició el procesado de la misma para la extracción del agua y la inclusión en parafina, según el protocolo reseñado en la tabla 3.9. La inclusión en parafina consistió en sustituir el agua tisular por un medio líquido capaz de solidificarse en las condiciones adecuadas de temperatura, a fin de

proporcionar a la muestra la consistencia y homogeneidad adecuadas para obtener secciones de 5 micras mediante un microtomo. A continuación se procedió al secado en estufa a 60° durante 20 minutos y, finalmente, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y tricrómicro de Masson de forma automática (Figura 3.37). Aunque inicialmente se planificó realizar tinciones con Von Kossa para facilitar las lecturas histomorfométricas, se desechó por la pérdida de valor al realizar la decalcificación del hueso.

Para la realización de la tinción HE se utilizó hematoxilina-eosina Harris<sup>®</sup>, eosina 10 gr, agua destilada 200 ml, y etanol al 95% 800 ml. El tricrómicro de Masson se realizó siguiendo el protocolo de la tabla 3.10. La hematoxilina eosina permite obtener una visión de conjunto tiñendo el osteoide de color rosa pálido y el hueso mineralizado de rosa oscuro. Con la tinción de tricrómicro de Mason se pueden observar con nitidez las células óseas, tiñendo el osteoide de rojo y el hueso mineralizado de verde.

Formol a 40°	60´	Alcohol absoluto-xilol (1:1) a 40°	90´
Agua a 40°	30´	Xilol a 40°	60´
Alcohol 70% a 40°	60´	Xilol a 40°	60´
Alcohol al 96%	45´	Parafina a 60°	60´
Alcohol al 96%	45´	Parafina a 60°	60´
Alcohol absoluto a 40°	60´	Parafina a 60°	60´
Alcohol absoluto a 40°	60´	Parafina a 60°	60´

**Tabla 3.9.** *Procesado de las muestras para su estudio anatómo-patológico e histomorfométrico.*

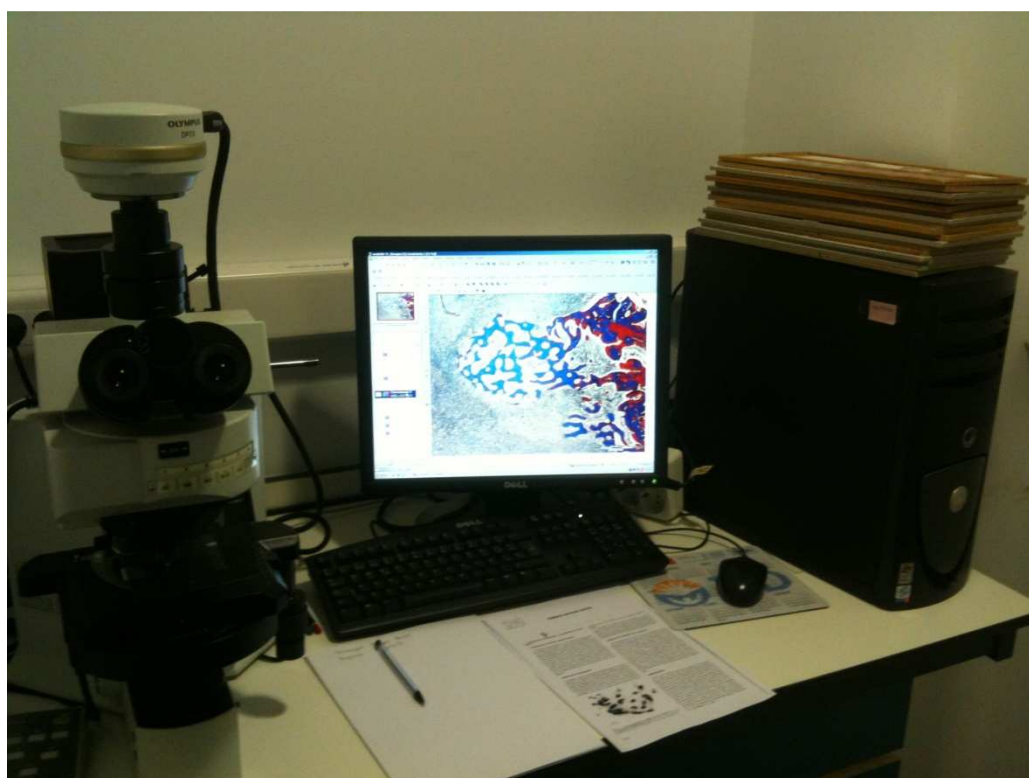


**Fig. 3.37.** *A la izquierda, equipo de tinción de hematoxilina-eosina (HE). A la derecha, del tricrómicro de Masson.*

<b>SOLUCIONES</b>	
<b>DENOMINACIÓN</b>	<b>COMPOSICIÓN/ELABORACIÓN</b>
Solución de Bouin	- Acido pícrico ..... 16 g. - Agua destilada ..... 800 ml. - Formol ..... 200 ml. - Acido acético.....40 ml.
Solución Hematoxilina de Weigert, mezclando la solución A y la B a partes iguales en el momento de usar	Solución A - Hematoxilina.....1 g. - Alcohol 95%.....100 ml.
	Solución B - Cloruro férrico 29%.....4 ml. - Agua destilada.....95 ml. - HCl.....1 ml.
Solución de escarlata de Biebrich al 1%	- Escarlata de Biebrich.....1 g. - Agua destilada .....100 ml.
Solución de fucsina ácida al 1%	- Fucsina ácida.....1 g. - Agua destilada.....100 ml.
Solución de escarlata de Biebrich-fucsina ácida	- Escarlata de Biebrich al 1% ..... 90 ml. - Fucsina ácida al 1% .....10 ml. - Acido acético glacial.....1 ml.
Solución de ácido fosfotúngstico al 10%	- Acido fosfotúngstico.....10 g. - Agua destilada.....100 ml.
Solución de ácido fosfomolibdico al 10%	- ácido fosfomolibdico.....10 g. - Agua destilada.....100 ml.
Solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico.	- Solución de ácido fosfotúngstico al 10% .....10 ml. - Solución de ácido fosfomolibdico al 10% .....10 ml. - Agua destilada .....20 ml.
Solución de azul de metilo	- Azul de metilo .....2.5 g. - Acido acético glacial .....2 ml. - Agua destilada .....98 ml.
Solución de ácido acético al 1%.	- Acido acético.....1 ml. - Agua destilada.....99 ml.
<b>PROCEDIMIENTO</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Desparafinar e hidratar las preparaciones.</li> <li>2. Introducir en la solución de Bouin a 70 ° C ± 5 durante 15 minutos.</li> <li>3. Lavar en agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo de las preparaciones.</li> <li>4. Teñir en Hematoxilina de Weigert durante 5 minutos.</li> <li>5. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.</li> <li>6. Lavar en agua destilada.</li> <li>7. Teñir en solución de escarlata de Biebrich-fucsina ácida durante 5 minutos.</li> <li>8. Lavar en agua destilada.</li> <li>9. Tratar las preparaciones en la solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 5 minutos.</li> <li>10. Teñir en azul de metilo durante 5 minutos.</li> <li>11. Diferenciar en ácido acético al 1% durante 1 minuto.</li> <li>12. Deshidratar, xilol y montar.</li> </ol>	

**Tabla 3.10.** Resumen de la técnica de tinción con tricrómico de Masson.

El estudio histomorfométrico de las muestras se realizó en el departamento de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial de León, utilizando un microscopio óptico Olympus BX61 asociado a una cámara Olympus DP 70 con una resolución espacial de todo el sistema de 1,935 micras con las siguientes condiciones de captura: imágenes obtenidas con objetivo de 10 aumentos y tamaño de pixel de cámara de 6,45 micras cuadradas con un tamaño total de imagen de 1,6 megapíxeles. Con la utilización de este equipo podemos visualizar y procesar directamente las imágenes obtenidas de los diferentes cortes en la pantalla de un ordenador Pentium IV con el programa Windows XP, así como realizar las diferentes mediciones histomorfométricas con el programa informático AnalySIS® de Olympus (Tabla 3.11 y figura 3.38).



**Fig. 3.38.** Microscopio asociado a equipo informático.

1. Medidas geométricas del defecto óseo	2. Medidas de los osículos	3. Medidas celulares
1.1. Medida del área del círculo de la sección transversal del defecto. 1.2. Medida del área del rectángulo de la sección coronal del defecto. 1.3. Medida del volumen del defecto. 1.4. Área trabecular total. 1.5. Profundidad de crecimiento. 1.6. Área de microfragmentos del hueso liofilizado.	1.1. Número de osículos. 1.2. Área de cada osículo. 1.3. Número de osteocitos en cada osículo.	3.1. Ribete de osteoblastos. 3.2. Número de osteoblastos. 3.3. Número de osteoclastos

**Tabla 3.11.** Resumen de las medidas histomorfométricas realizadas, que se expresaron mediante el valor descriptivo de la media.

### 3.7. MANEJO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

El manejo y análisis de toda la información se realizó de forma automatizada mediante el uso de ordenadores PC compatibles equipados con el sistema operativo Windows 2000. La información se recogió en una base de datos creada con el programa Access 2000 de Microsoft, desde la que se realizó el volcado de la información a la hoja de cálculo Excel 2000 para su depuración, con el fin de corregir errores de recogida de la información (Figura 3.39).

<b>1. OVEJA: I-II-III-IV-V-VI-VII-VIII-IX-X-XI-XII-C1-C2-C3-C4-C5-C6-C7-C8-C9-C10</b>	
<b>2. DATOS INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA</b> DIA: LADO: O Derecho O Izquierdo IMPLANTE: O I. O II. O III. O IV. O V. O VI. O VII. O VIII INCIDENCIAS: O No O Sí (.....)	
<b>3. RADIOLOGÍA</b> FORMACIÓN: 0. 1. 2. 3. 4. REMODELADO: 0. 2. 4.	
<b>4. ANATOMÍA PATOLÓGICA</b> 0 = No actividad celular ósea 1 = Aposición temprana hueso nuevo 2 = Aposición activa de hueso nuevo 3 = Reorganización de esponjosa (aparición osteoclastos) 4 = Esponjosa reorganizada completamente	
<b>5. HISTOMORFOMETRÍA</b> AREA IMPLANTE: ..... VOLUMEN IMPLANTE: ..... ÁREA TRABECULAR TOTAL: ..... PROFUNDIDAD DE CRECIMIENTO: ..... OSÍCULOS: NÚMERO: ..... ESCALA RANLY: 1. 2. 3. 4. AREA OSÍCULO: ..... Nº OSTEOCITOS OSÍCULOS: ...	RIBETE OSTEOCITOS: ..... AREA HUESO LIOFILIZADO: ..... Nº OSTEOLASTOS: ..... Nº OSTEOLASTOS: .....

**Fig. 3.39.** Protocolo inicial de recogida de datos.

El tratamiento estadístico de los datos se estructuró en dos fases: una descriptiva y otra analítica. En la fase descriptiva se utilizaron medidas de frecuencia absoluta y relativa para las variables cualitativas y como medida de tendencia central la media para las variables cuantitativas. En la fase de análisis, se comprobó el comportamiento normal de determinadas variables para las que se les aplicó la prueba de T-Student y prueba de Chi-cuadrado y en aquellas donde no se demostró la normalidad, se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas: correlación de Spearman para el estudio comparativo de las variables y prueba de Wilcoxon para la comparación de los resultados radiográficos.

### **3.8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

A pesar de que los estudios experimentales son los que presentan una mayor precisión y validez, el estudio tiene su limitación fundamental en el número de individuos y en el reparto aleatorio de los mismos en los grupos de estudio y de control. En nuestro estudio se realizó la distribución aleatoria de los animales en los grupos para evitar la aparición de diferencias y sesgos entre ellos. Al tratarse de experimentación con animales se acepta una mayor uniformidad entre ellos, con lo que las diferencias entre la muestra estudiada y el universo son menores que en los estudios con humanos, por lo que se acepta un tamaño más pequeño de muestras.

Otra limitación fue que, en el momento del implante y a pesar de realizar el mismo con la máxima reproductibilidad posible entre los diferentes grupos, no pudimos garantizar que el número de células implantadas, así como la cantidad de factores de crecimiento, fuera exactamente igual en los individuos de los mismos grupos.

Finalmente, a la hora de interpretar los datos histomorfométricos hay tener en cuenta las limitaciones que presenta este tipo de estudio, como son las diferencias entre los huesos de diferentes animales de experimentación, diferencias de las mediciones entre diferentes observadores y las diferencias entre las mediciones efectuadas en distintos laboratorios.



# RESULTADOS

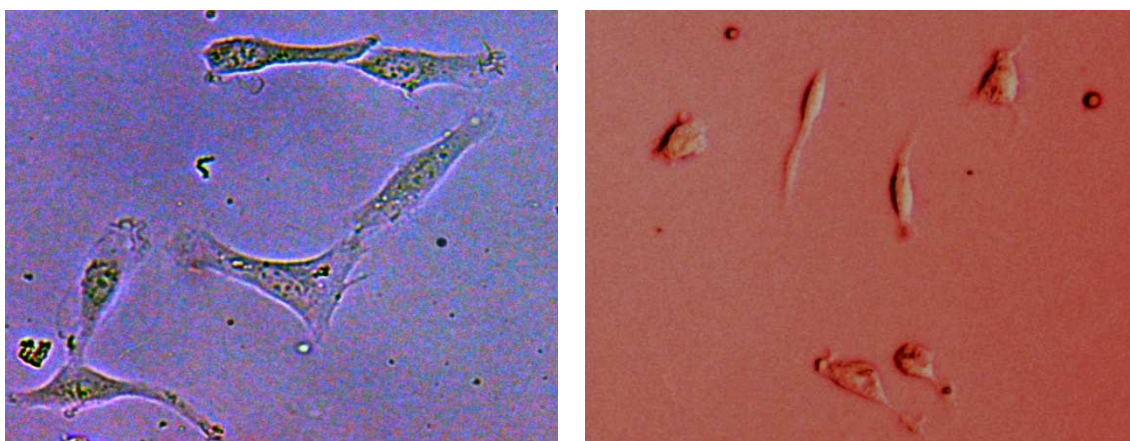
## 4. 1. RESULTADOS DE LA PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE TRABAJO

### Aislamiento y Expansión de ADMSCs

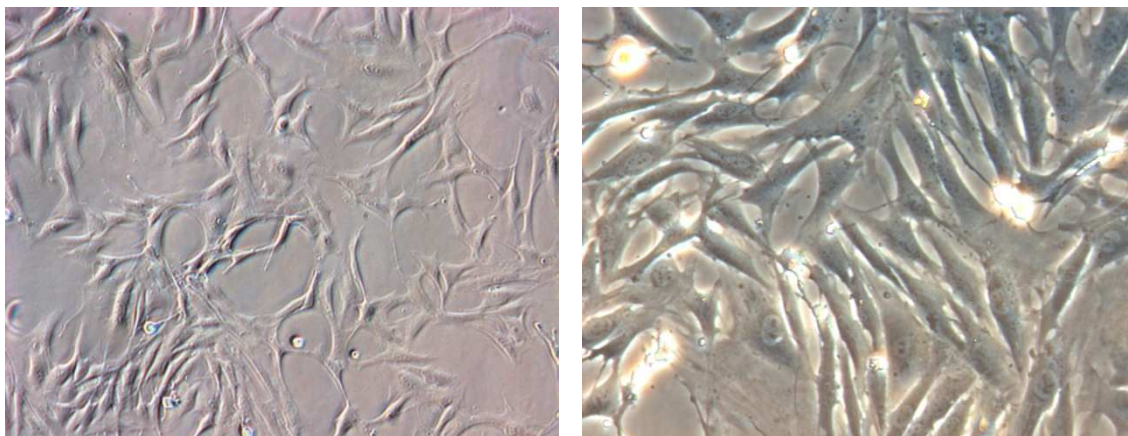
Tras el estudio del efecto de las diferentes variables analizadas (temperatura de preservación, concentración de enzima durante la digestión, agitación y filtración de la muestra digerida) sobre los rendimientos celulares alcanzados tras el procesamiento de las muestras grasas, se seleccionaron los siguientes parámetros óptimos: preservación a temperatura ambiente, digestión con colagenasa tipo I a 2mg/ml sin agitación y sin someter a la muestra digerida a filtración.

En el 100% del total de las 20 muestras de grasa sometidas al protocolo de digestión empleado se consiguieron obtener suspensiones celulares correctamente aisladas y viables para su uso en el establecimiento de líneas celulares. El rendimiento celular deparó una media de  $172 \pm 132$  células/mg de tejido digerido.

Para el establecimiento del cultivo primario (P0) procedente de las células obtenidas del proceso de digestión celular, en todos los casos estudiados, se utilizó una alta densidad de siembra ( $30.000 \text{ cel/cm}^2$ ). Con ella, se lograron obtener un 100% de éxitos en el establecimiento de este cultivo. A las 24-48 horas de la siembra celular sobre el plástico de las placas de cultivo, las células adoptaron una morfología fusiforme (Figura 4.1) y con el paso de los días iba conformando una extensa red de células interconectadas entre sí que alcanzaban el estado de preconfluencia al término de los 9 primeros días (Figura 4.2). Para la realización de subcultivos (P1 y P2), se partieron de densidades celulares de  $5.000 \text{ células/cm}^2$ , obteniéndose patrones de crecimiento similares a los ya descritos.



**Fig. 4.1.** Morfología celular a las 24-48 horas de la siembra (20X).



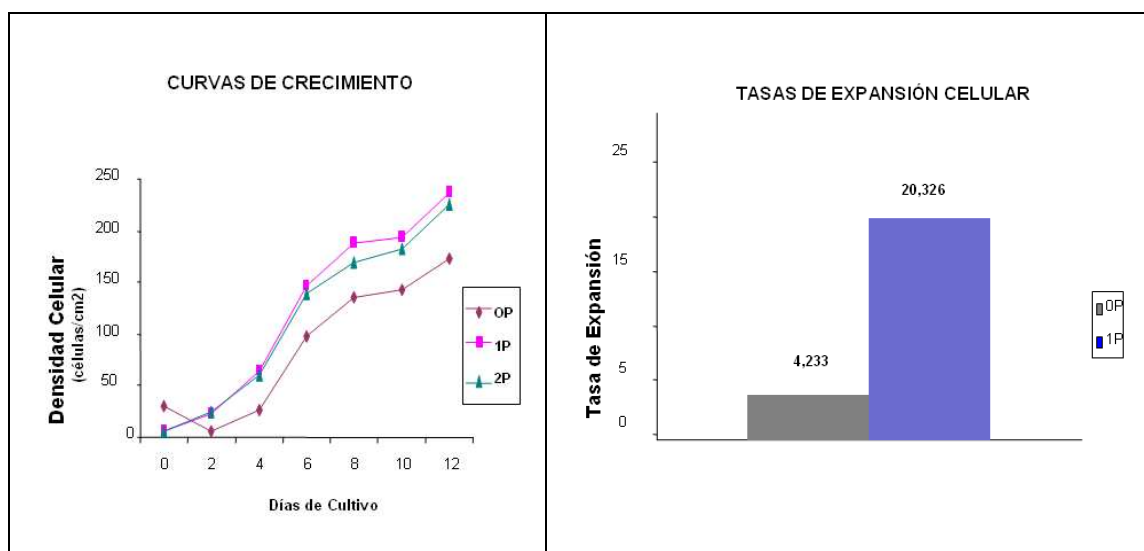
**Fig. 4.2.** Estado de preconfluencia de los cultivos celulares (izquierda: 10X; derecha: 20X)

En lo referente a la proliferación celular, en todos los casos estudiados las células presentaban un comportamiento estándar. En ellos, se distinguen claramente varias fases; la primera, o fase de latencia (de acomodación al medio), en PO presentan es mas prolongada (una media de 4 días) que en los cultivos P1 y P2 (entre 1 y 2 días); una segunda o fase exponencial de crecimiento en la que en todos los cultivos las células crecen hasta llegar a estados de preconfluencia; una tercera o fase de latencia que en todos los casos se consiguen entre los 8 y 10 días y, por último, en todos los casos se observó un repunte en el crecimiento celular debido a que las células se retrajeron en grumos y nuevas células ocuparon la superficie plástica libre, aunque en pocos días la mayoría de las células se soltaron y murieron (Figura 4.3).



**Fig. 4.3.** Estado de hiperconfluencia y retracción en agregados celulares (10X).

La tasa media de expansión de las células en cultivo tras la realización del cultivo primario (P0) fue de 4 veces el número original de células a los 9 días. En subcultivos posteriores (P1 y P2) se observaron tasas de expansión de 20 veces el número de células sembradas en tan solo 8 días (Figuras 4.4 y 4.5).



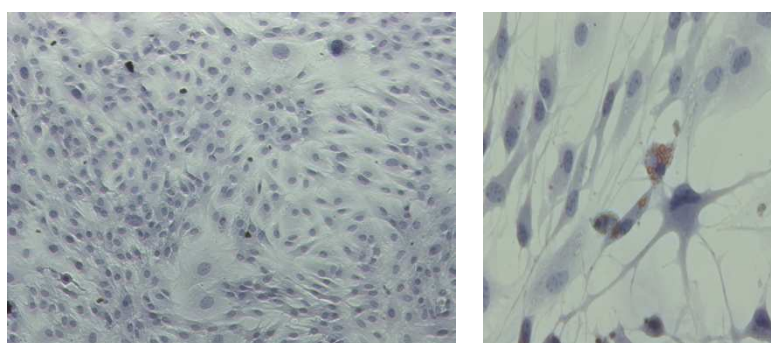
Figs 4.4 y 4.5. Curvas de crecimiento y tasas de expansión celular de ADMSCs en cultivo.

### Multipotencialidad de ADMSCs

En todos los casos estudiados, las poblaciones celulares mostraron su capacidad de diferenciación hacia diferentes estirpes celulares tras la expansión in vitro. En los cultivos control, no se apreció en ningún caso la existencia de características propias de la células diferenciadas (formación de vacuolas, presencia de proteoglicanos y signos de mineralización respectivamente).

### Adipogénesis

Al cabo de 3 días de inducción adipogénica se observó un cambio en la morfología de las células en cultivo, que pasaron de mostrar una morfología fusiforme con finas prolongaciones a una morfología más estrellada. Tras 7 días de cultivo en medio adipogénico la tinción Oil Red O puso en evidencia la formación de vacuolas lipídicas en el interior de las células (Figuras 4.6 y 4.7).

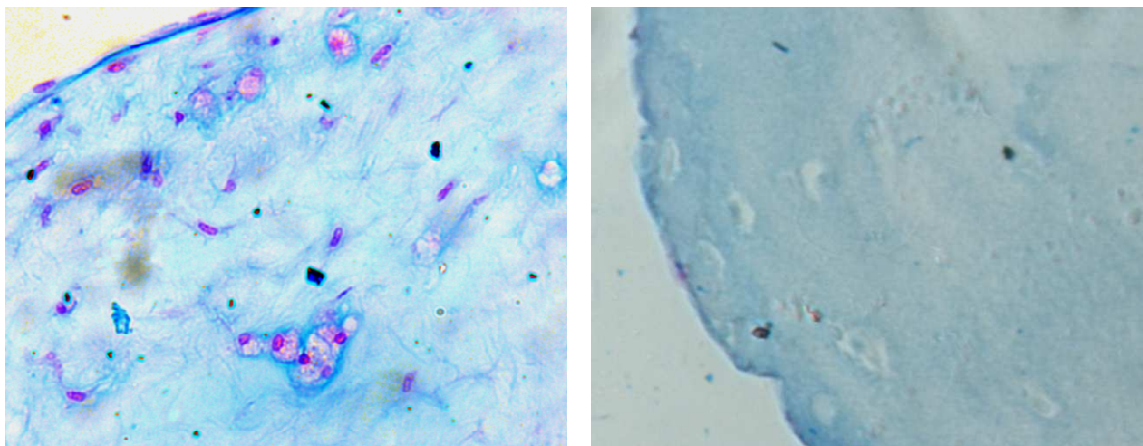


Figs 4.6 y 4.7. A la izquierda, control negativo de diferenciación adipogénica (10X). A la derecha, células de fenotipo adipocítico diferenciadas de ADMSC (40X).

### Condrogénesis

El cultivo en condiciones de alta densidad y ambiente tridimensional en matriz de fibrina favoreció la adquisición de características condrocíticas por parte de las poblaciones celulares que, tras 21 días de cultivo en medio condrogénico, comenzaron a mostrar una morfología redondeada y se dispusieron en lagunas dentro de la matriz.

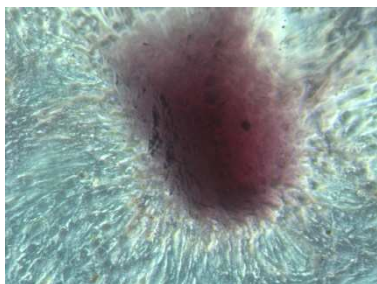
Además, la tinción Azul Alcian puso de manifiesto la presencia de proteoglicanos en las zonas de la matriz cercanas a las células diferenciadas (Figuras 4.8 y 4.9).



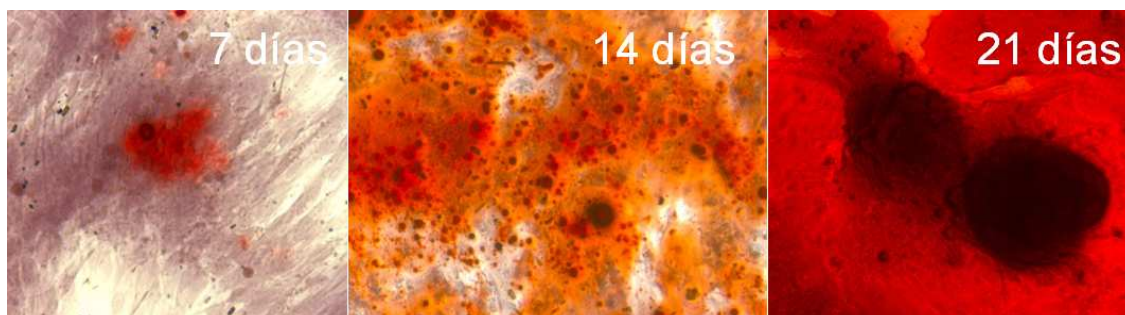
**Figs. 4.8 y 4.9.** A la izquierda, células de diferenciación condrogénica en matriz de fibrina teñidas con Azul Alcian (20X). A la derecha, control negativo de diferenciación condrogénica (20X).

#### *Osteogénesis*

El cultivo de ADMSCs en medio osteogénico provocó un cambio en el patrón de crecimiento y distribución de las células en cultivo que se tradujo en la formación de nódulos que mostraron signos de mineralización tras la tinción con Alizarin Red. La mineralización comenzó a ser evidente a los 7 días de inducción y fue más intensa a los 14 y 21 días de cultivo en medio osteogénico (Figuras 4.10 y 4.11).



**Fig. 4.10.** Control negativo de diferenciación osteogénica (10X).

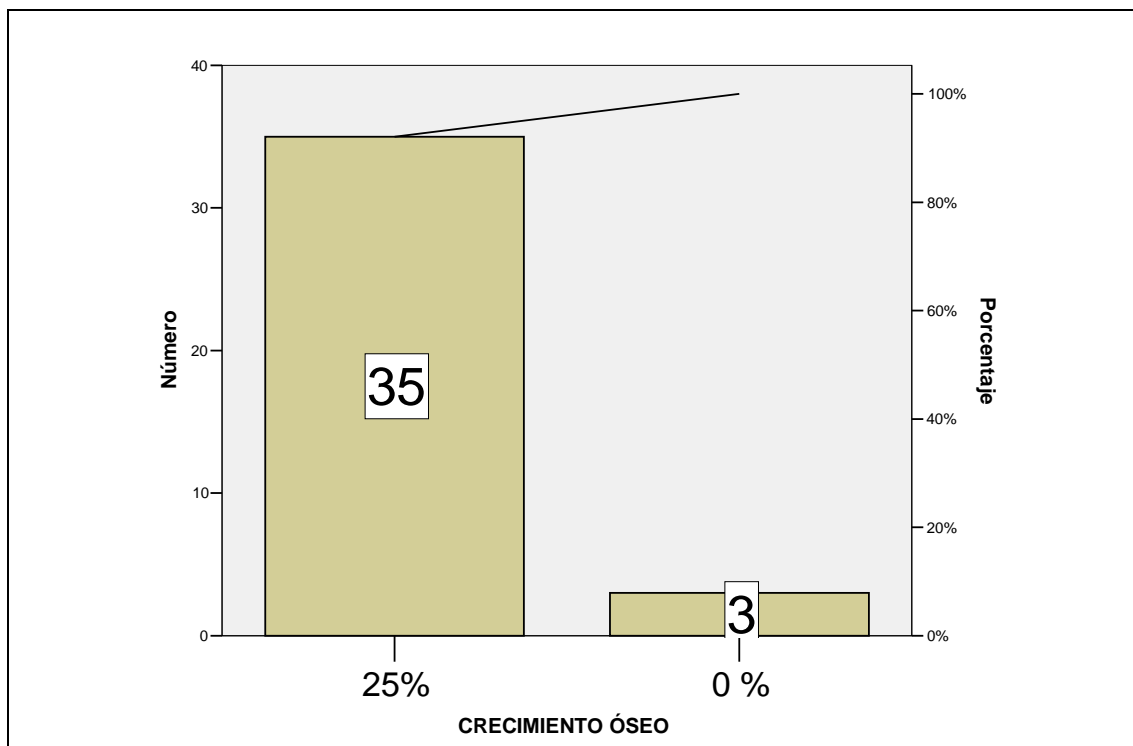


**Fig. 4.11.** Fases de mineralización progresiva de la matriz extracelular en cultivo osteogénico con tinción Alizarin Red.

## 4.2. RESULTADOS RADIOLÓGICOS

### Resultados radiológicos del crecimiento óseo (formación ósea)

En ninguno de los grupos hubo formación o crecimiento óseo mayor del 25% según la escala de Lane y Shandu<sup>125</sup>. El crecimiento del 25% se observó en todos los casos de los grupos con heteroinjerto (IV-VII). En los grupos sin él hubo 3 de 18 casos sin crecimiento. No obstante, no hubo diferencias entre los grupos. El porcentaje de crecimiento óseo global y en los casos de cada grupo se representa en las figuras 4.12 - 4.14. En la tabla 4-1 se representa el crecimiento en función del tiempo, observándose que éste se incrementa desde las 4 a las 12 semanas.



**Fig. 4.12.** Representación esquemática del crecimiento óseo general en los animales del estudio.

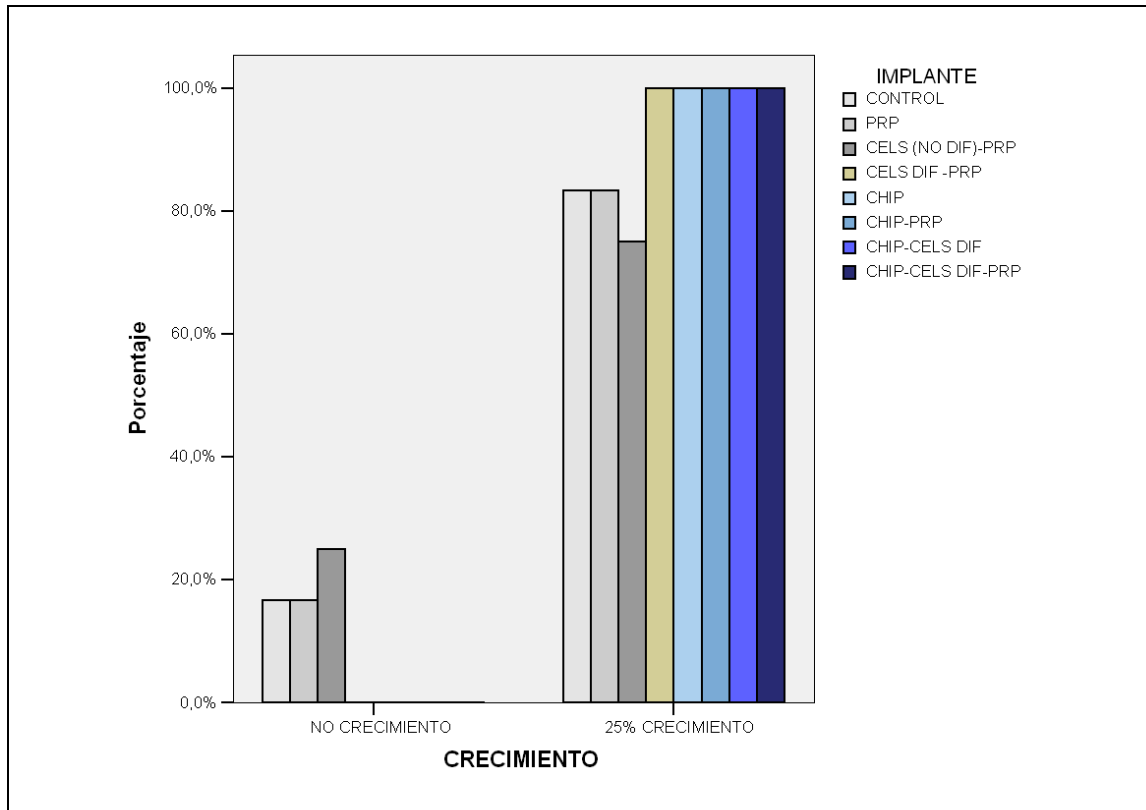


Fig. 4.13. Representación esquemática del crecimiento óseo en los grupos del estudio.

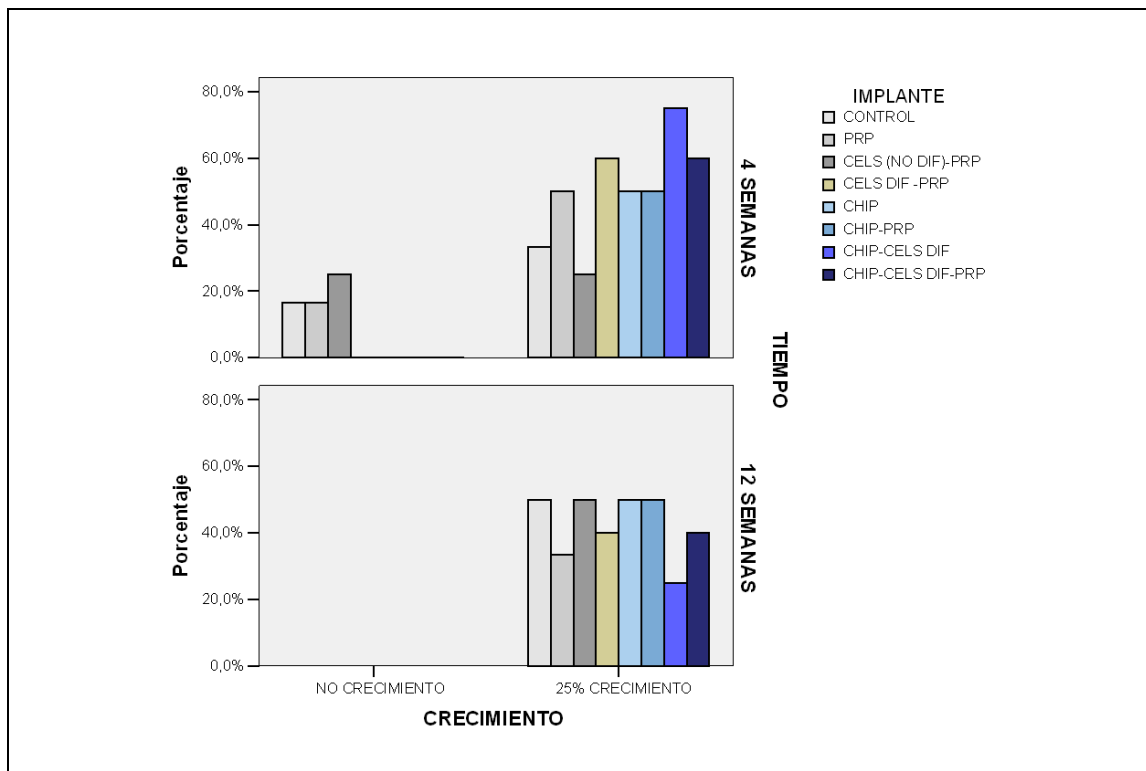
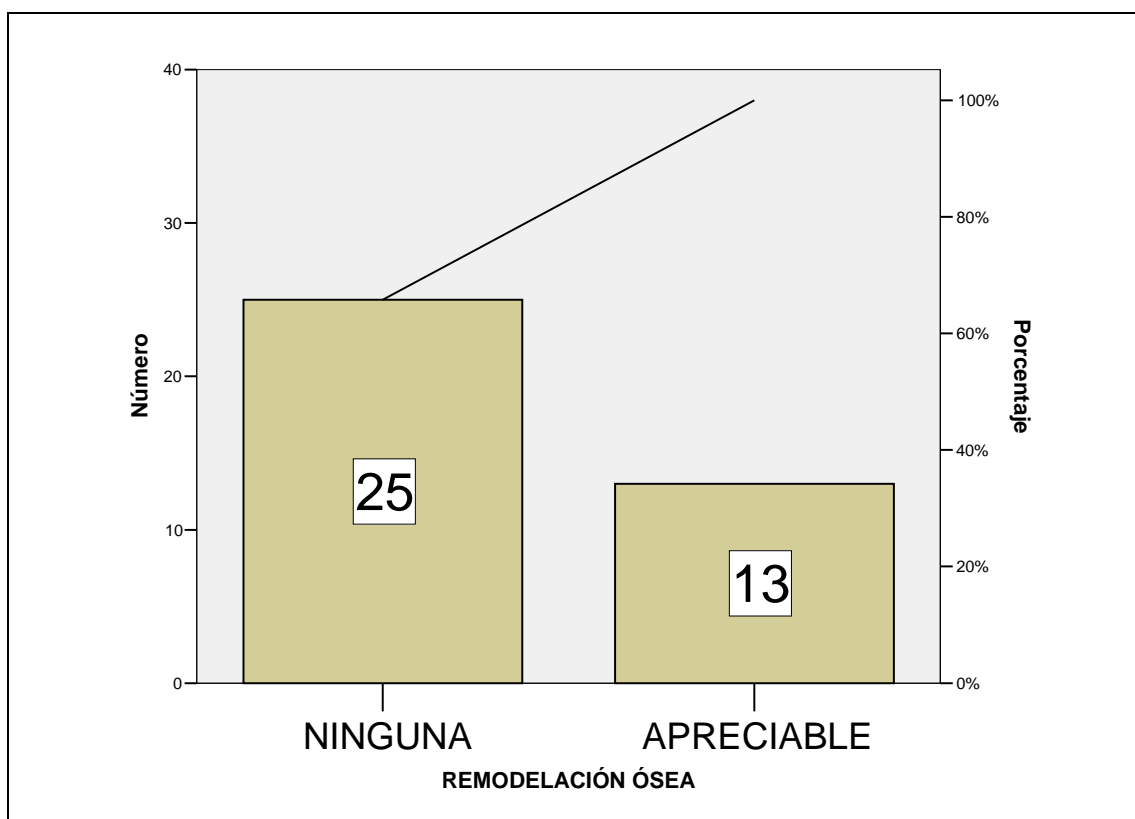


Fig. 4.14. Representación esquemática del crecimiento óseo en los diferentes grupos del estudio en función del tiempo, al cabo de 4 y 12 semanas.

### Resultados radiológicos de la remodelación ósea

En ninguno de los grupos hubo remodelación ósea completa según la escala de Lane y Shandu<sup>125</sup>. En el grupo control no hubo ningún caso de remodelación ósea. En los grupos II y III la mayor parte de los casos no mostraron ninguna remodelación. En el resto de los grupos la remodelación fue dispar, destacando más la del grupo de los heteroinjertos mezclados con células. En cualquier caso, no hubo diferencias entre los grupos. El porcentaje de remodelación ósea global y en los casos de cada grupo se representa en las figuras 4.15 - 4.17. En la tabla 4.2 se representa el remodelado en función del tiempo, observándose a las 4 semanas que la ausencia de remodelación es más marcada, faltando siempre en el grupo control.

En las tablas 4.1 – 4.8 y en las figuras 4.18- 4.25 Se representa el crecimiento y el remodelado óseo de cada uno de los grupos de manera individual.



**Fig. 4.15.** Representación esquemática de la remodelación ósea general en los animales del estudio.



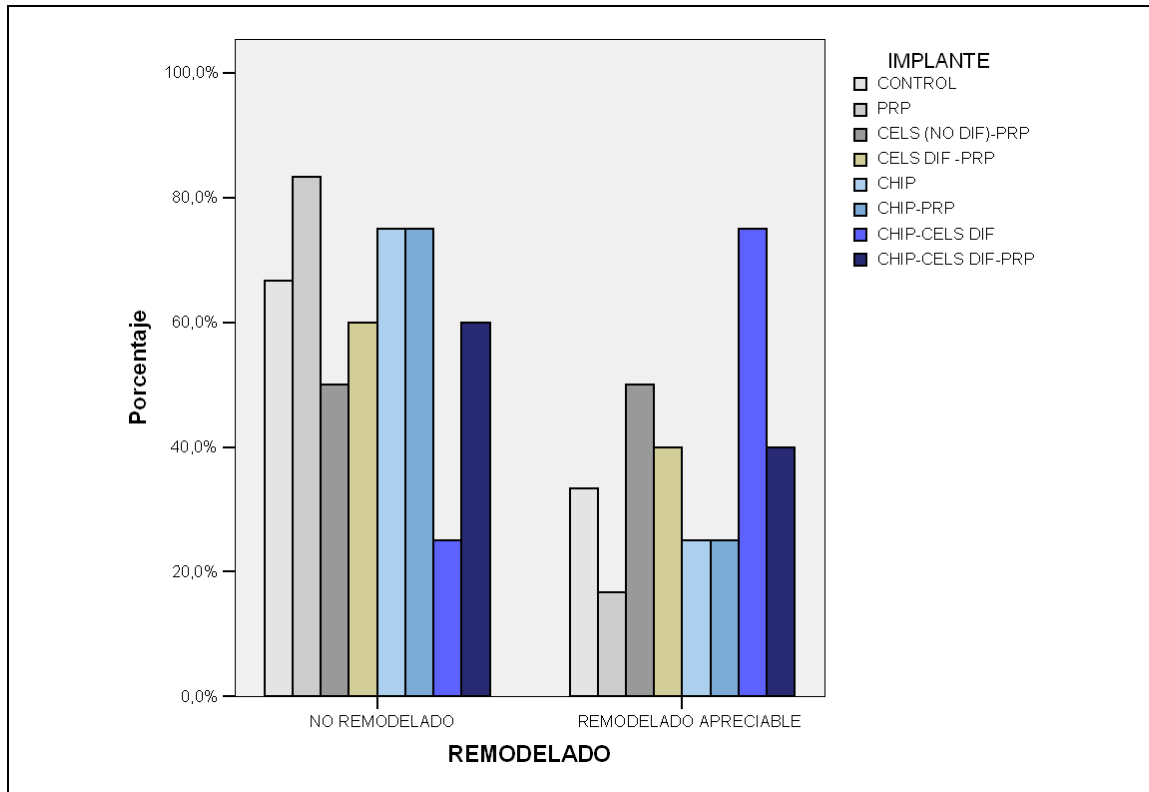


Fig. 4.16. Representación esquemática de la remodelación ósea en los grupos del estudio.

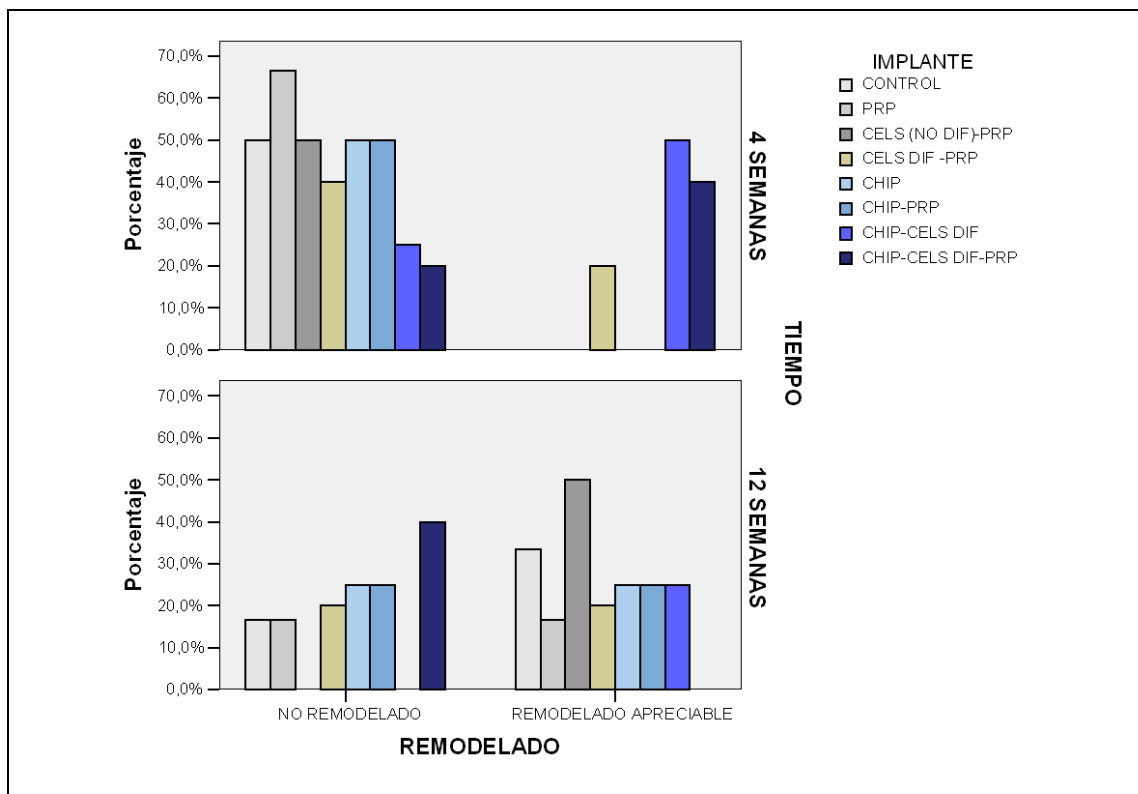
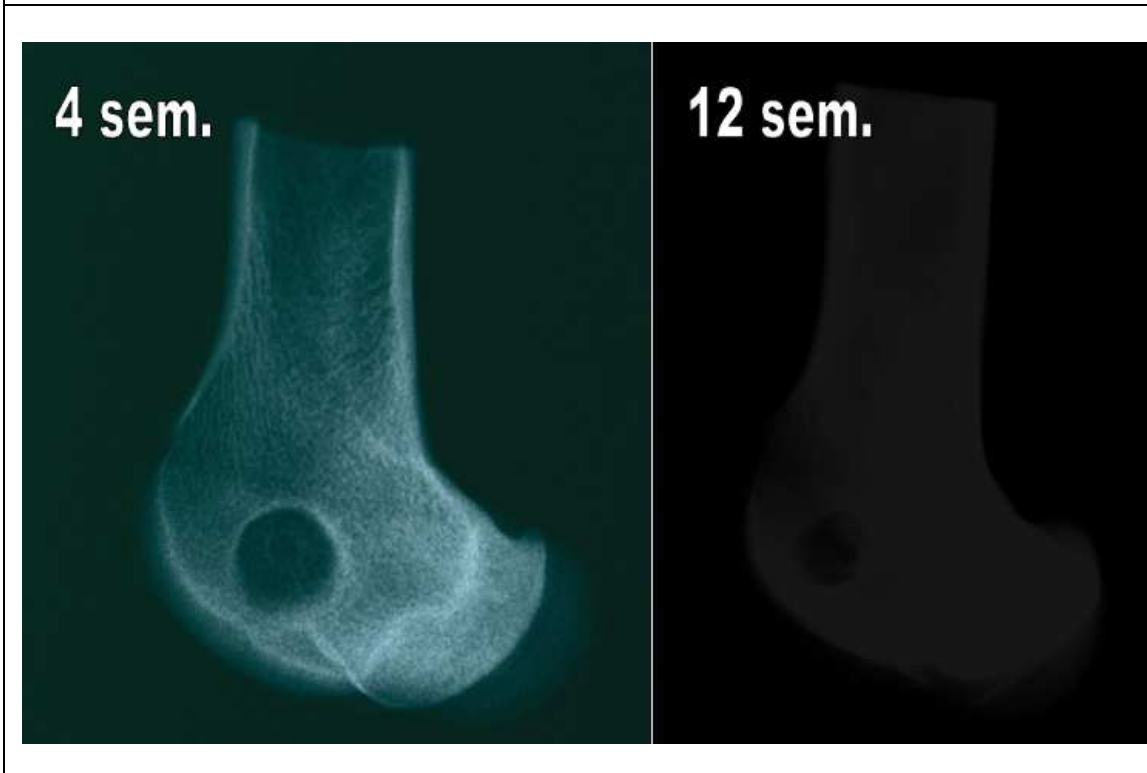


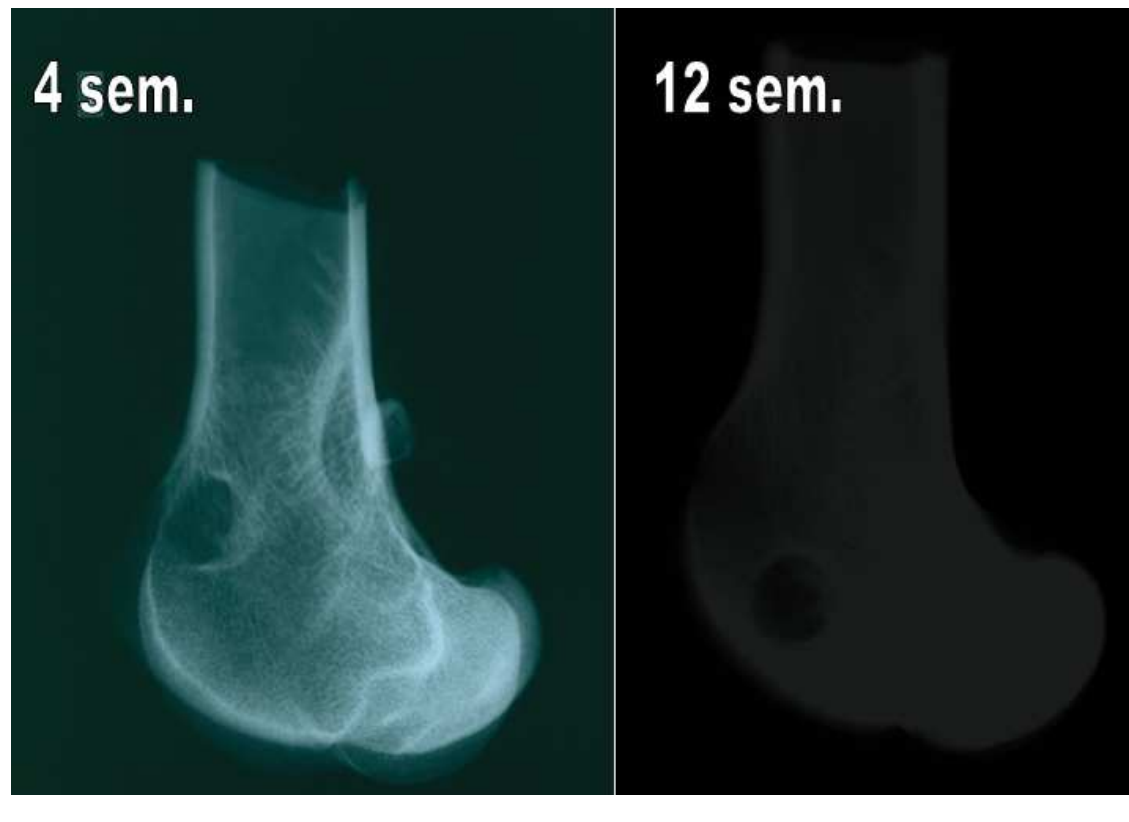
Fig. 4.17. Representación esquemática de la remodelación ósea en los diferentes grupos del estudio en función del tiempo, al cabo de 4 y 12 semanas.

GRUPO CONTROL (I)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Ninguna
Oveja 2	25%	Ninguna
Oveja 3	25%	Ninguna
Oveja 4	0%	Ninguna



**Tabla 4.1 y Fig. 4.18.** Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo control. Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo del grupo control a las 4 y 12 semanas de su creación, sin que se observe signos de crecimiento ni remodelado óseo.

GRUPO PRP (II)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Ninguna
Oveja 2	25%	Apreciable
Oveja 3	25%	Ninguna
Oveja 4	25%	Ninguna
Oveja 5	0%	Ninguna



**Tabla 4.2 y Fig. 4.19.** Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo del PRP (II). Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo II a las 4 y 12 semanas. Se observa remodelado estimado como apreciable.

GRUPO PRP + CÉLULAS (III)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Apreciable
Oveja 2	25%	Ninguna
Oveja 3	25%	Apreciable
Oveja 4	0%	Ninguna



**Tabla 4.3 y Fig. 4.20.** Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo del PRP y células (III). Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo III a las 4 y 12 semanas. Se observa remodelado estimado como apreciable a las 12 semanas.

GRUPO PRP + CÉLULAS (III)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Apreciable
Oveja 2	25%	Ninguna
Oveja 3	25%	Apreciable
Oveja 4	25%	Ninguna
Oveja 5	25%	Ninguna



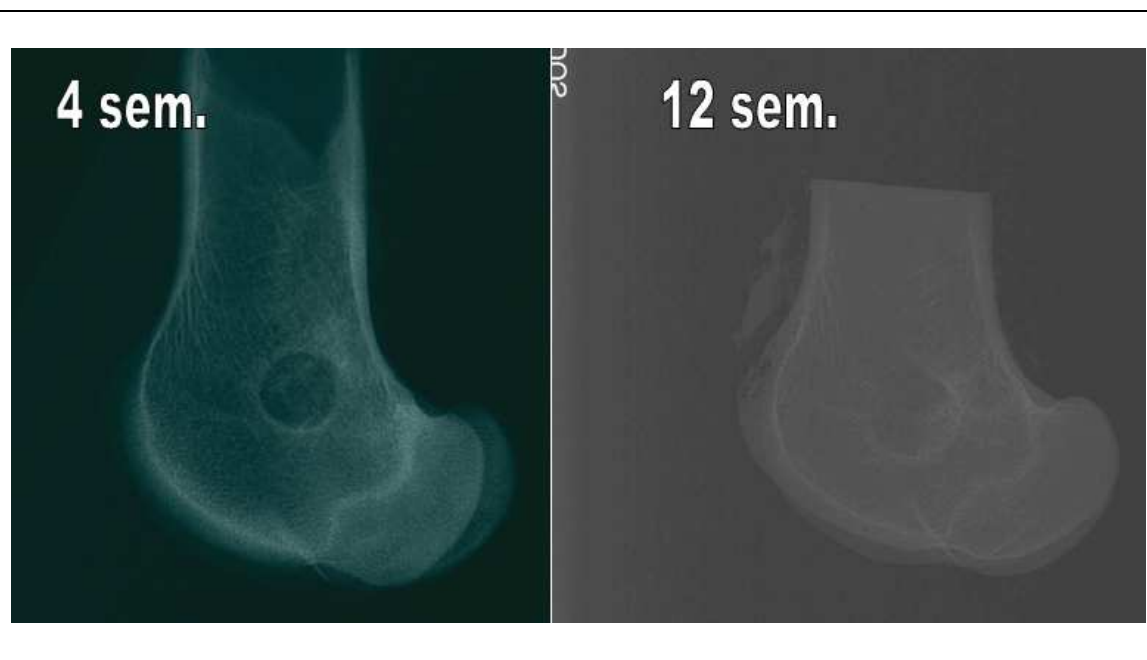
**Tabla 4.4 y Fig. 4.21.** Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo del PRP y células diferenciadas (VII). Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo III a las 4 y 12 semanas. Se observa remodelado estimado como apreciable a las 12 semanas.

GRUPO HETEROINJERTO (IV)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Ninguna
Oveja 2	25%	Ninguna
Oveja 3	25%	Ninguna
Oveja 4	25%	Apreciable
Oveja 5	25%	Ninguna



**Tabla 4.5 y Fig. 4.22.** Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo del heteroinjerto (V). Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo V a las 4 y 12 semanas. Se observa crecimiento óseo y remodelado estimado como apreciable a las 4 y 12 semanas.

GRUPO PRP + HETEROINJERTO (V)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Ninguna
Oveja 2	25%	Ninguna
Oveja 3	25%	Ninguna
Oveja 4	25%	Ninguna
Oveja 5	25%	Apreciable



**Tabla 4.6 y Fig. 4.23.** Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo del heteroinjerto mezclado con PRP (VI). Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo VI a las 4 y 12 semanas. Se observa crecimiento óseo y remodelado estimado como apreciable a las 4 y 12 semanas.

GRUPO CÉLULAS + HETEROINJERTO (VI)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Ninguna
Oveja 2	25%	Apreciable
Oveja 3	25%	Apreciable
Oveja 4	25%	Apreciable
Oveja 5	25%	Apreciable



**Tabla 4.7 y Fig. 4.24.** Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo del heteroinjerto mezclado con células (VII). Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo VII a las 4 y 12 semanas. Se observa crecimiento óseo y remodelado estimado como apreciable a las 4 y 12 semanas.



GRUPO CÉLULAS + PRP HETEROINJERTO (VI)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Apreciable
Oveja 2	25%	Apreciable
Oveja 3	25%	Ninguna
Oveja 4	25%	Ninguna
Oveja 5	25%	Ninguna



**Tabla 4.8 y Fig. 4.25.** Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo del heteroinjerto mezclado con células y PRP (VIII). Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo VIII a las 4 y 12 semanas. Se observa crecimiento óseo y remodelado estimado como apreciable a las 4 y 12 semanas. En la radiografía de las 4 semanas se observan los puntos transóseos de la fijación del parche (flecha).

### 3. 3. RESULTADOS ANATOMO-PATOLÓGICOS

La correlación entre las variables del estudio para demostrar la corrección de lo estudiado y la prueba de normalidad para demostrar que la muestra se comporta de una manera normal, con una distribución normal y capaz de aplicarle pruebas estadísticas específicas, se presentan en las tablas 4.9 y 4.10.

VARIABLES	CORRELACIÓN
Osteocitos-ATT	0,855
Osteocitos-profundidad	0,778
Profundidad-ATT	0,729
Profundidad-osteoblastos	0,661
Osteocitos-osteoblastos	0,448
Ribete osteoblastos-osteoblastos	0,499

**Tabla 4.9.** Correlaciones entre las variables del estudio. Se deduce que los osteocitos, el ATT (área trabecular total), la profundidad y, posiblemente, los osteoblastos y el ribete osteoblástico, son similares como indicadores de resultado.

		Profundidad	Osteocitos	Área osículo	Ribete osteoblastos	Osteoblastos	ATT
N		38	38	38	38	38	38
Parámetros normales (a, b)	Media	1884,0937	77,0526	535470,9358	308,6316	180,8421	1308910
	Desviación estándar	2925,277	184,38942	1049296,430	114,71596	236,15198	3435944
Diferencias más extremas	Absoluta	,319	,504	,406	,069	,357	,490
	Positiva	,319	,504	,406	,069	,357	,490
	Negativa	-,260	-,338	-,305	-,065	-,222	-,352
Z Kolmogorov-Smirnov		1,968	3,107	2,500	,426	2,201	3,024
Asymp. Sig. (2-tailed)		,001	,000	,000	,993	,000	,000

**Tabla 4.10.** Test “One-Sample Kolmogorov-Smirnov” para demostrar la normalidad de las variables cuantitativas del estudio (a = distribución normal; b = calculado de datos; ATT = área trabecular total). Las variables profundidad de crecimiento, osteocitos, área osículo, osteoblastos y ATT se comportaron de manera normal. El ribete de osteoblastos no.

### Resultados anatomopatológicos macroscópicos

Realizados los cortes anatomopatológicos macroscópicos sobre papel milimetrado, las mediciones del área y volumen del implante no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Fig. 4.26 y Tabla 4.11). El estudio descriptivo de las variables área y volumen del implante y su representación gráfica en los diferentes grupos del estudio se refleja en la tabla 4.12 y en las figuras 4-27 y 4-28.

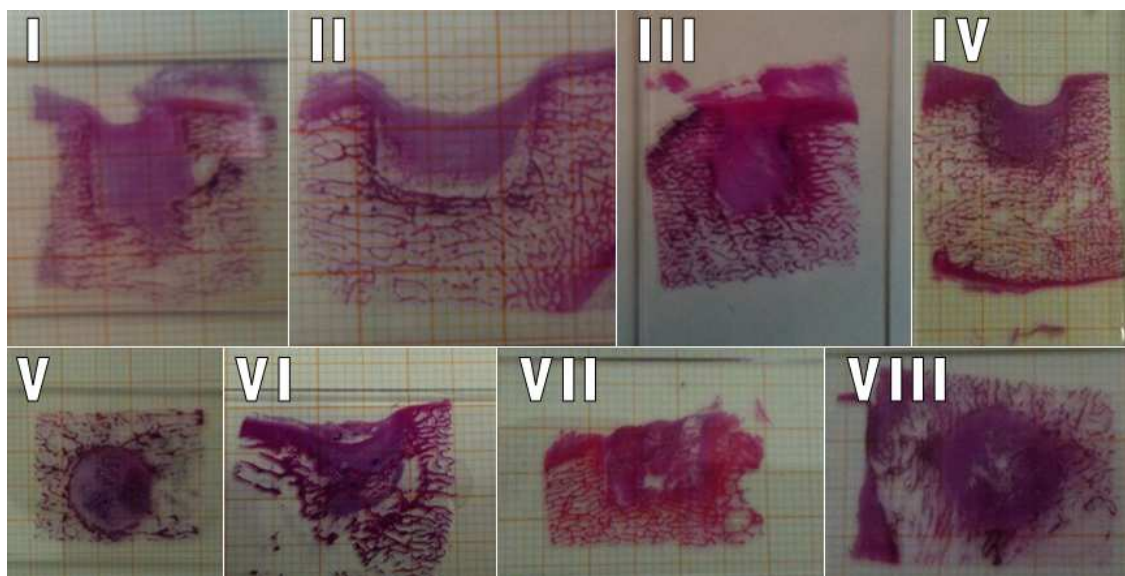


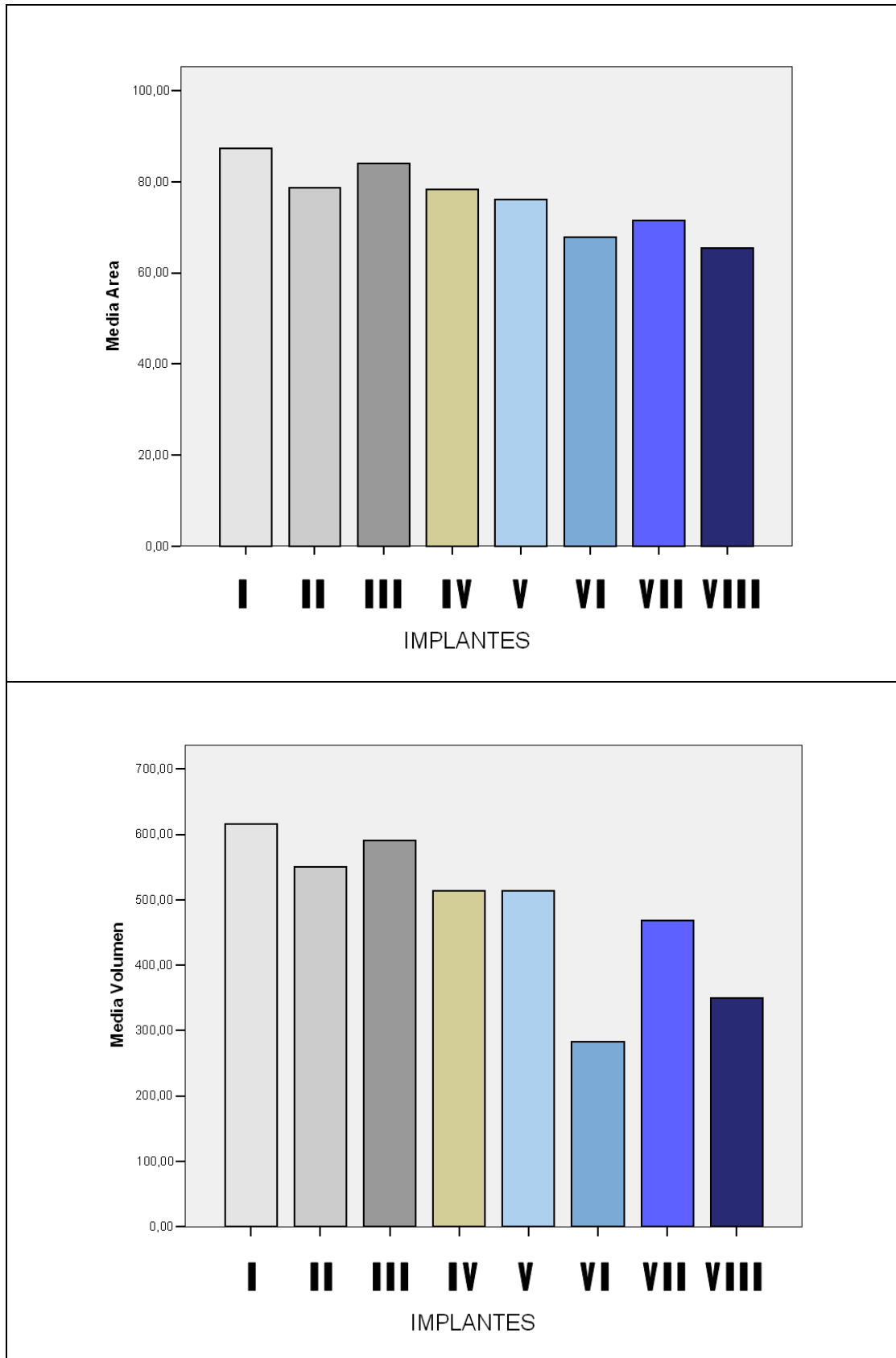
Fig. 4.26. Aspecto macroscópico de cortes histológicos de los diferentes grupos del estudio.

	Área	Volumen
Chi-Square	12,993	7,734
df	7	7
Asymp. Sig.	,072	,357

Tabla 4.11. Test de Kruskal Wallis para el estudio de las relaciones entre el área y volumen de los defectos en los diferentes grupos del estudio.

IMPLANTES	AREA				VOLUMEN			
	Media	Máximo	Mínimo	Desviación estándar	Media	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
Control	87,31	103,65	76,29	11,22	616,21	799,49	456,38	136,92
PRP	78,72	111,72	62,12	19,26	550,56	913,95	318,47	239,85
ADMSC-PRP	84,12	100,46	73,13	12,13	591,15	774,65	466,40	134,41
ADMSC-0+PRP	78,31	87,87	69,43	6,98	513,33	636,17	377,54	96,95
Chip	76,22	92,38	57,71	14,37	513,43	668,10	322,11	175,88
Chip+PRP	67,78	73,16	61,74	4,83	282,55	478,73	,00	250,78
Chip+ADMSC-0	71,61	91,53	49,45	17,23	468,08	684,20	251,96	305,64
Chip+ADMSC-0+PRP	65,46	75,39	58,03	7,60	349,06	380,90	317,22	45,03

Tabla 4.12. Estudio descriptivo de las variables área y volumen del implante.



**Figs. 4.27 y 4.28.** Representación gráfica de los valores medios de las variables área (arriba) y volumen en el defecto de los diferentes grupos del estudio (abajo).

### Actividad celular

El estudio descriptivo de la actividad celular según la escala de Lane y Shandu se refleja en la tabla 4.13 y en la figura 4.29.

	FRECUENCIA		PORCENTAJE	
No actividad celular	21	55,3		
Aposición temprana	11	28,9		
Aposición tardía	6	15,8		
Total	38	100,0		

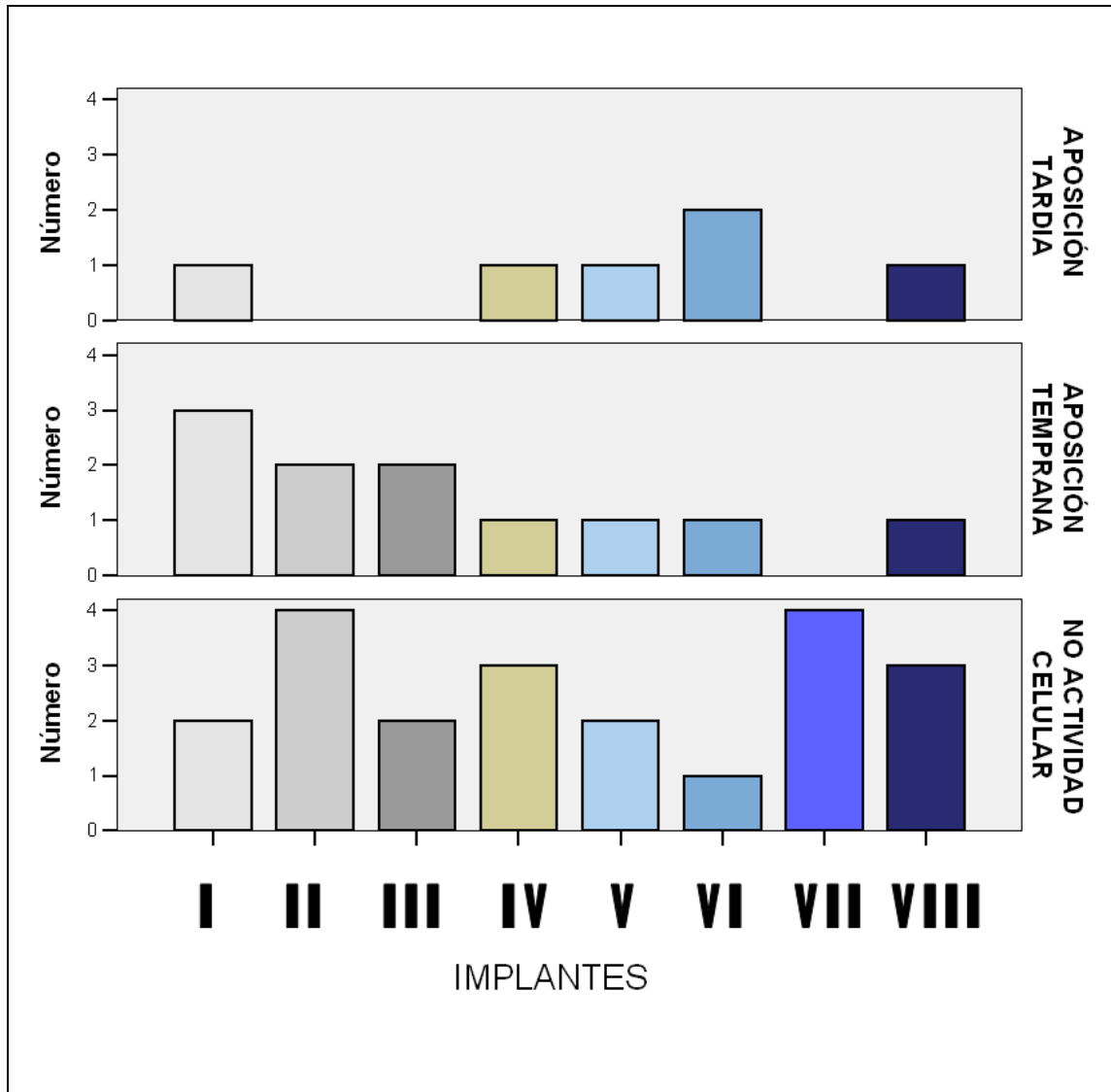
  

IMPLANTES	NO ACTIVIDAD CELULAR		APOSICIÓN TEMPRANA		APOSICIÓN TARDÍA	
	Nº	Columna N %	Nº	Columna N %	Nº	Columna N %
Control	2	9,5	3	27,3	1	16,7
PRP	4	19,0	2	18,2	0	,0
ADMSC-PRP	2	9,5	2	18,2	0	,0
ADMSC-0+PRP	3	14,3	1	9,1	1	16,7
Chip	2	9,5	1	9,1	1	16,7
Chip+PRP	1	4,8	1	9,1	2	33,3
Chip+ADMSC-0	4	19,0	0	,0	0	,0
Chip+ADMSC-0+PRP	3	14,3	1	9,1	1	16,7

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. Exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,799 (b)	1	,180		
Corrección por continuidad (a)	1,029	1	,310		
Razón de verosimilitudes	1,817	1			
Estadístico exacto de Fisher				,210	,155
Asociación lineal por lineal	1,752	1	,186		
N de casos válidos	38				

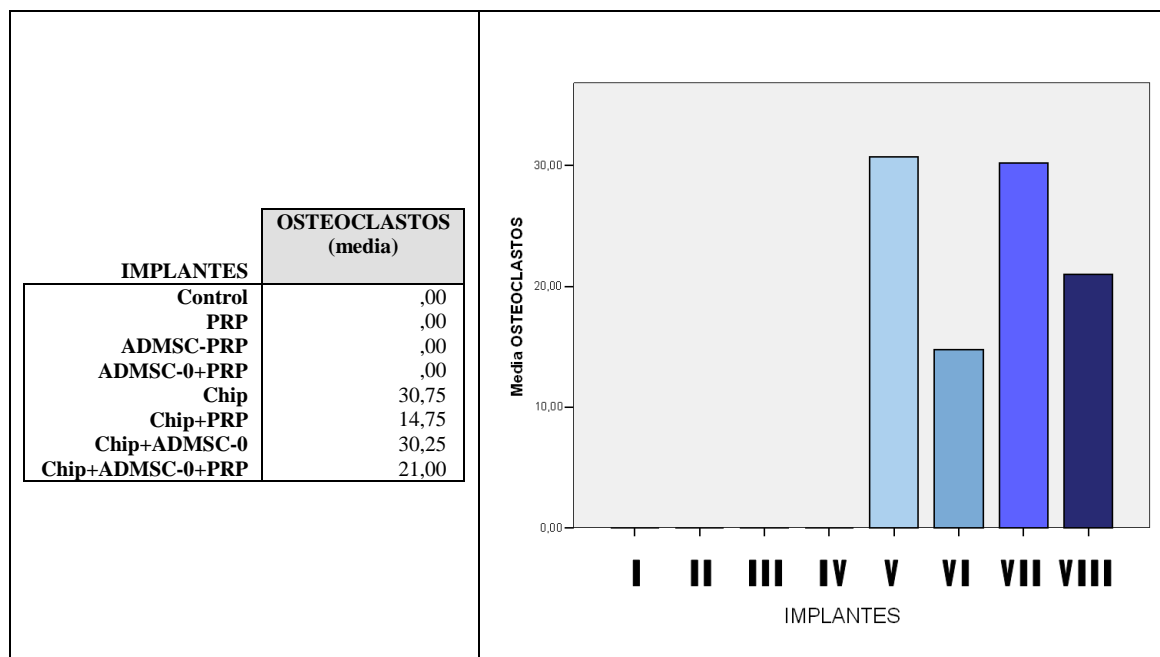
**Tabla 4.15.** Actividad celular según la clasificación de Lane y Shandu. Arriba, en el global de los casos del estudio y en el centro en los diferentes grupos. En nuestro estudio no se observa actividad celular dentro del defecto en el 55,3% de los casos, si bien hay diferencias que no son estadísticamente significativas (abajo: a = calculado sólo para una tabla de 2x2; b = 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 8,05). Observamos que en el grupo del heteroinjerto y células (grupo VII) no se demuestra crecimiento y que en los grupos I, IV,V y VIII los hallazgos son similares, lo que podría explicarse suponiendo que el heteroinjerto interfiriera en la diferenciación celular. Comparando el grupo de las células sin diferenciar (grupo III) con el de las células diferenciadas (grupos IV, VI, VIII) observamos mejores resultados en el grupo de las diferenciadas.



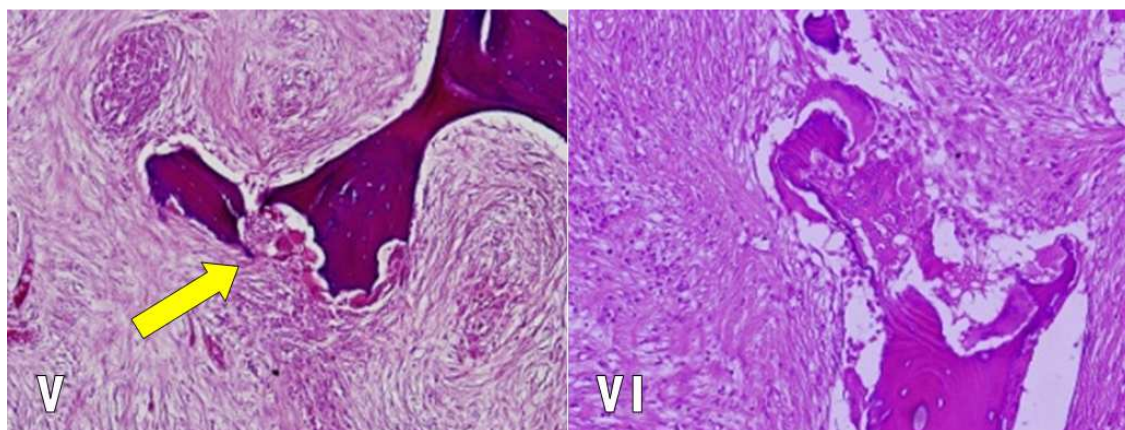
**Fig. 4.29.** Representación gráfica de la actividad celular según la clasificación de Lane y Shandu en los diferentes grupos del estudio.

### Actividad osteoclástica

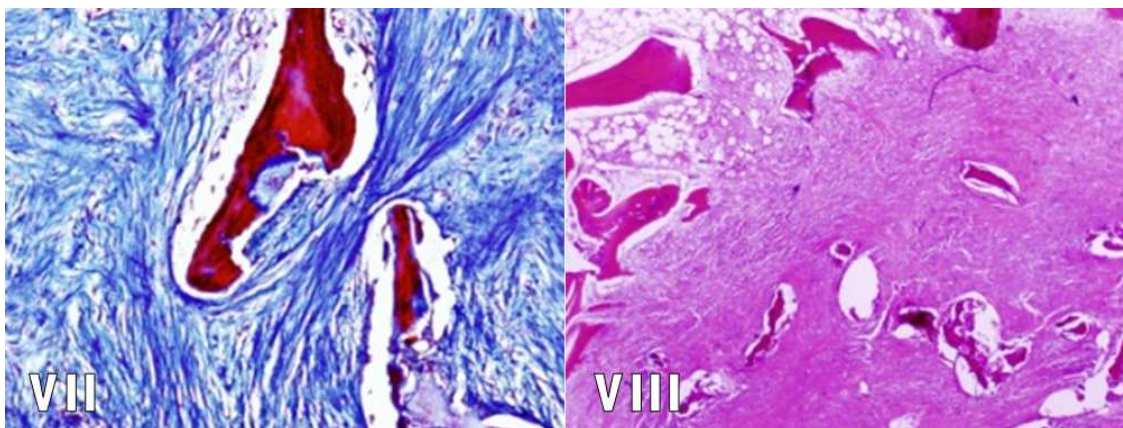
La actividad osteoclástica observada en los grupos del estudio se refleja en la tabla 4.14 y en la figura 4.30. En las figuras 4.31-35. se detallan cortes histológicos de dos grupos. Se observó actividad osteoclástica alrededor de las áreas de todos los grupos con chip desde las 4 semanas, no encontrándose en ningún otro grupo.



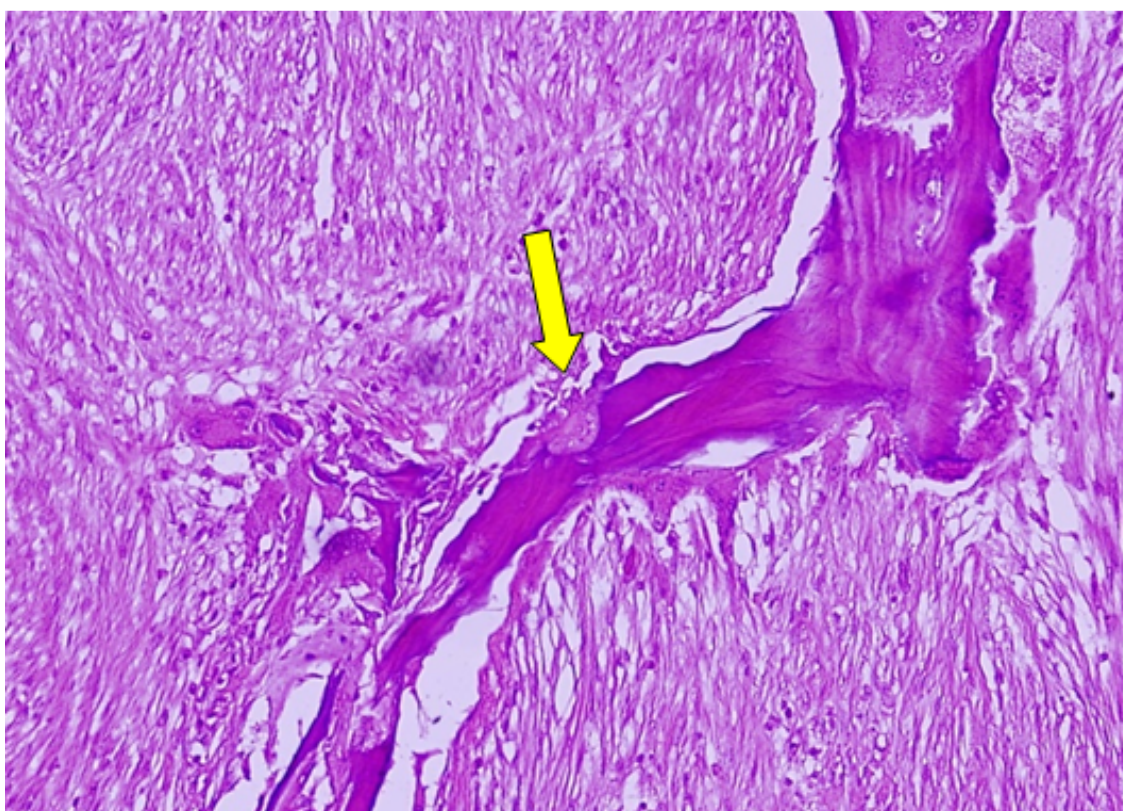
**Tabla 4.14 y Fig. 4.30.** Actividad osteoclástica en los diferentes grupos del estudio.



**Figs. 4.31 y 4.32.** Hematoxilina-eosina 40X de un caso del grupo V y otro del grupo VI (heteroinjerto-PRP) donde se observan fragmentos de hueso liofilizado con actividad osteoclástica (flecha) y una gran célula multinucleada en el corte VI de probable origen osteoclástico.



**Figs. 4.33 y 4.34.** Tricrómico de Masson 40X de un caso del grupo VII (heteroinjerto-células) observándose actividad osteoclástica para la digestión del hueso liofilizado, de color rojo. A la derecha, hematoxilina-eosina 20X de un caso del grupo VIII (heteroinjerto-células-PRP) mostrando el aspecto global del defecto óseo con zonas con heteroinjerto en su interior, tejido fibroso y trábeculas



**Fig. 4.35.** Detalle de un caso del grupo de heteroinjerto más PRP (grupo VII), observándose osteoclastos alrededor del heteroinjerto, reabsorbiéndose (flecha amarilla).



### Actividad osteoblástica

Los resultados de la actividad osteoblástica en los grupos del estudio se refleja en la tabla 4.15 y en la figura 4.36. En las figuras 4.37 y 4.38 se detallan cortes histológicos de dos grupos.

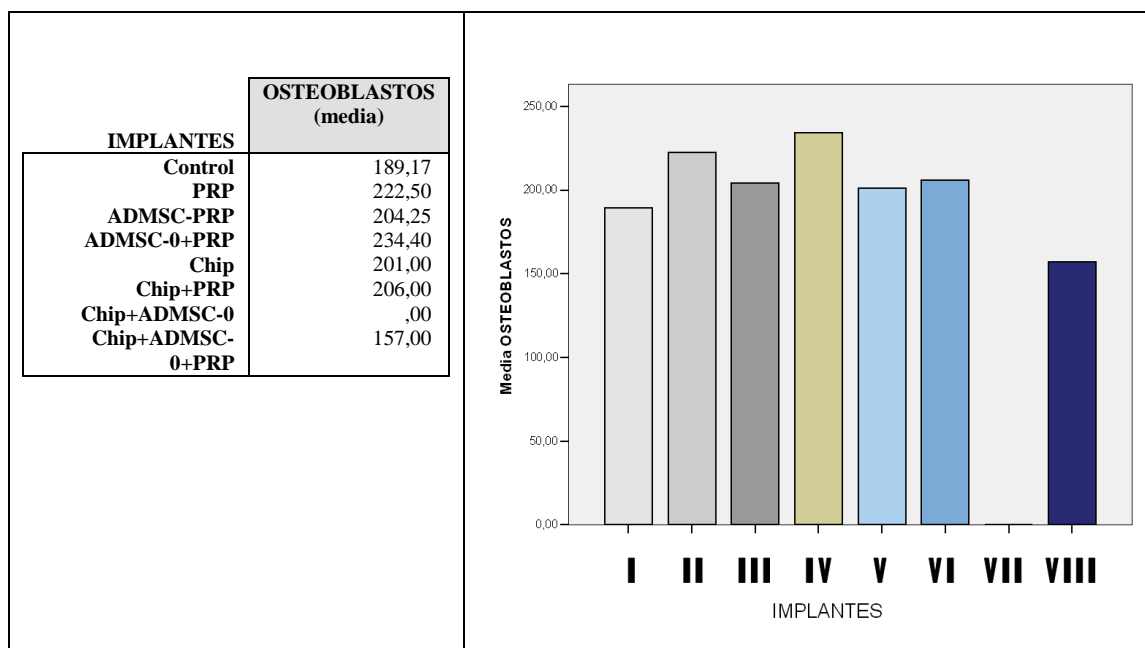
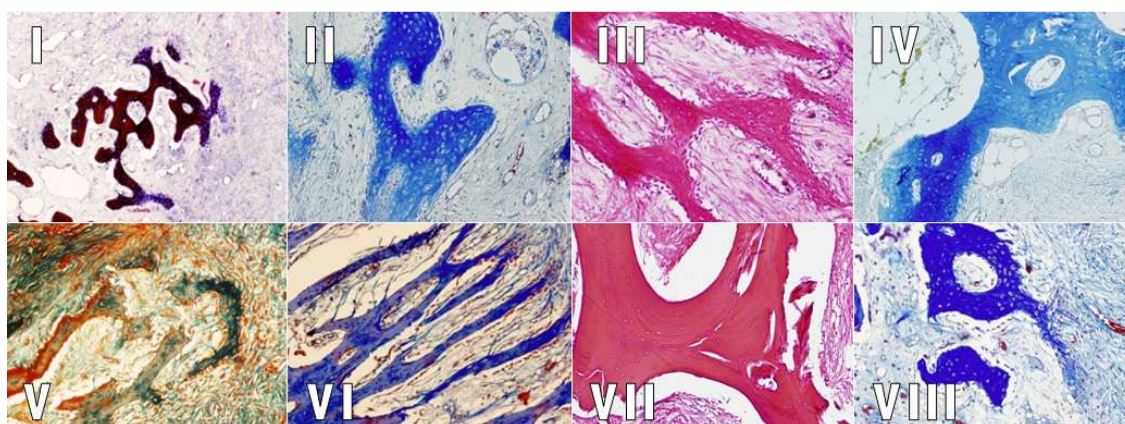


Tabla 4.15 y Fig. 4.36. Actividad osteoblástica en los diferentes grupos del estudio.

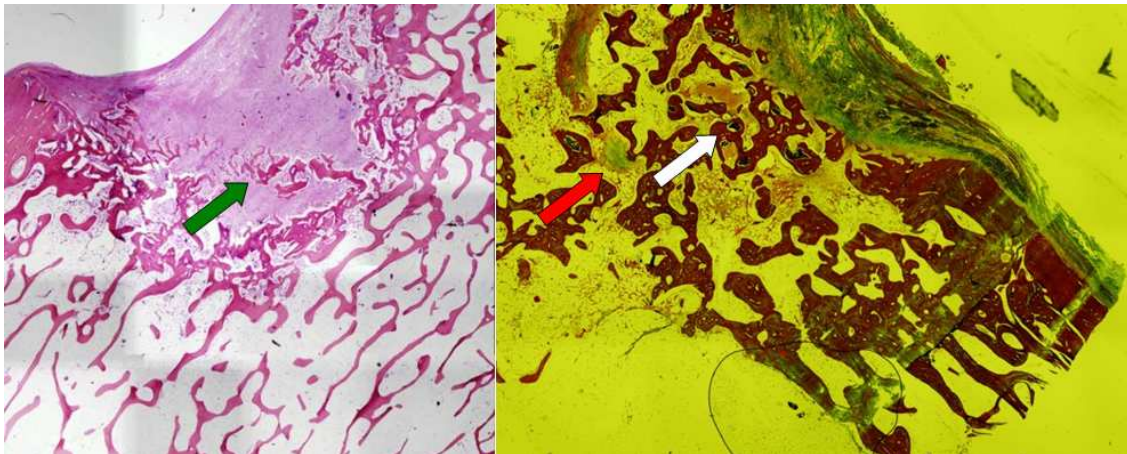


Figs. 4.37 y 4.38. Tinciones hematoxilina-eosina en los grupos III (células diferenciadas-PRP) y VII (heteroinjerto-células-PRP) y tricrómico de Masson en el resto. Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se observa que existe actividad osteoblástica alrededor del hueso neoformado con osteocitos en el interior de las lagunas, salvo en el grupo VII. En este grupo no existe actividad osteoblástica, observándose lagunas vacías de osteocitos.

### Evolución anatómo-patológica del implante

En relación con la evolución anatomopatológica del implante, a las 4 semanas se observaron células inflamatorias y mínima reabsorción del chip en la mayor parte de los casos. En algún defecto se observó formación ósea al visualizar la presencia de osículos con osteocitos en su interior. En el borde del defecto se observó la presencia de osteoblastos. Además, en todas las muestras se observó una importante cantidad de tejido fibroso. En las lagunas del chip no se visualizaron osteocitos en su interior (Fig 4.39).

A las 12 semanas no se observaron signos inflamatorios. En los defectos donde se implantó chip (grupos V-VIII), el heteroinjerto tendió a desaparecer, siendo sustituido por hueso nuevo en algunos de los casos y por tejido fibroso en otros. En el hueso nuevo se identificaron osteocitos en las lagunas (Figura 4.40)

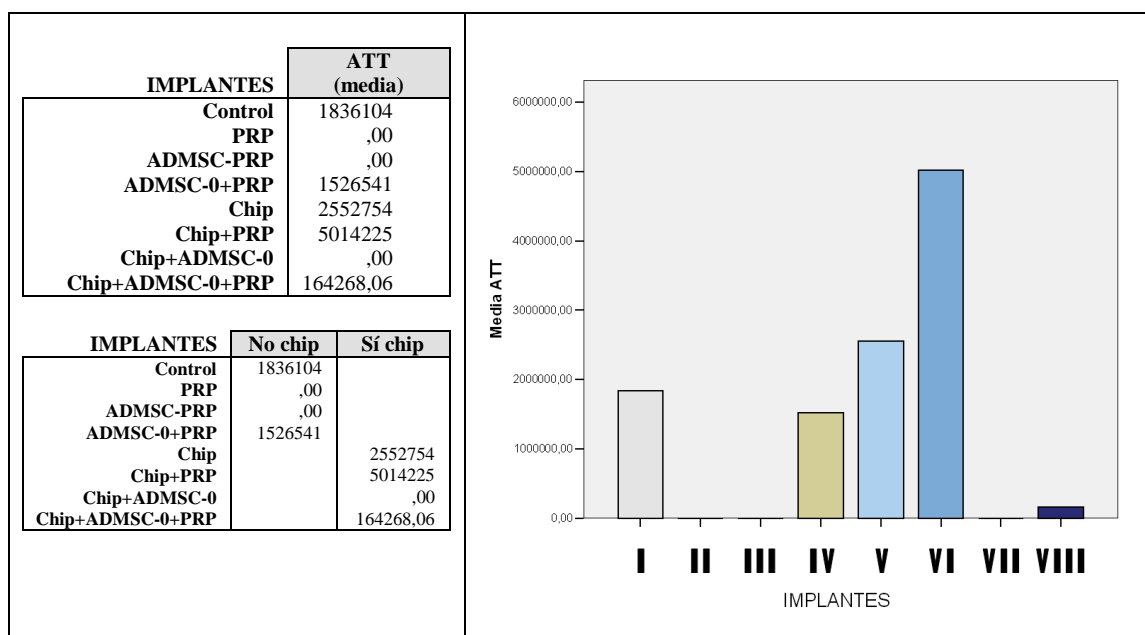


**Figs. 4.39 y 4.40.** Cortes hematoxilina-eosina 20X de un caso del grupo VI donde se observa crecimiento óseo en el interior del defecto a las 4 semanas (izquierda) y a las 12 semanas (derecha). En la imagen de las 4 semanas se observa hueso trabecular, con osteocitos en su interior (flecha verde). A las 12 semanas observamos mínimas áreas de chip (flecha blanca), así como restos de fibrosis del defecto en el espesor del hueso regenerado (flecha roja).

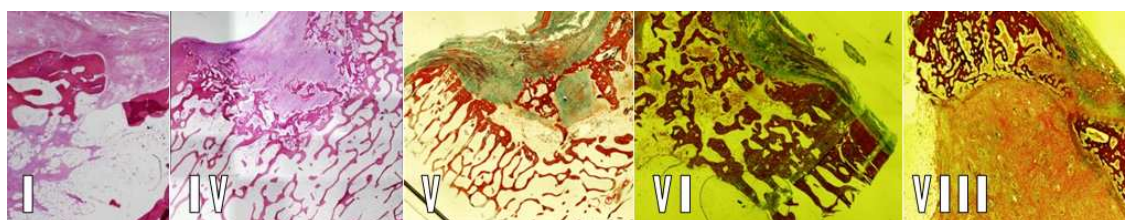
#### 4. 4. RESULTADOS HISTOMORFOMÉTRICOS

##### Área trabecular total (ATT)

El área trabecular total en los grupos del estudio se refleja en la tabla 4.16 y en la figura 4.41. En las figuras 4.42 y 4.43 se detallan cortes histológicos de diferentes grupos.



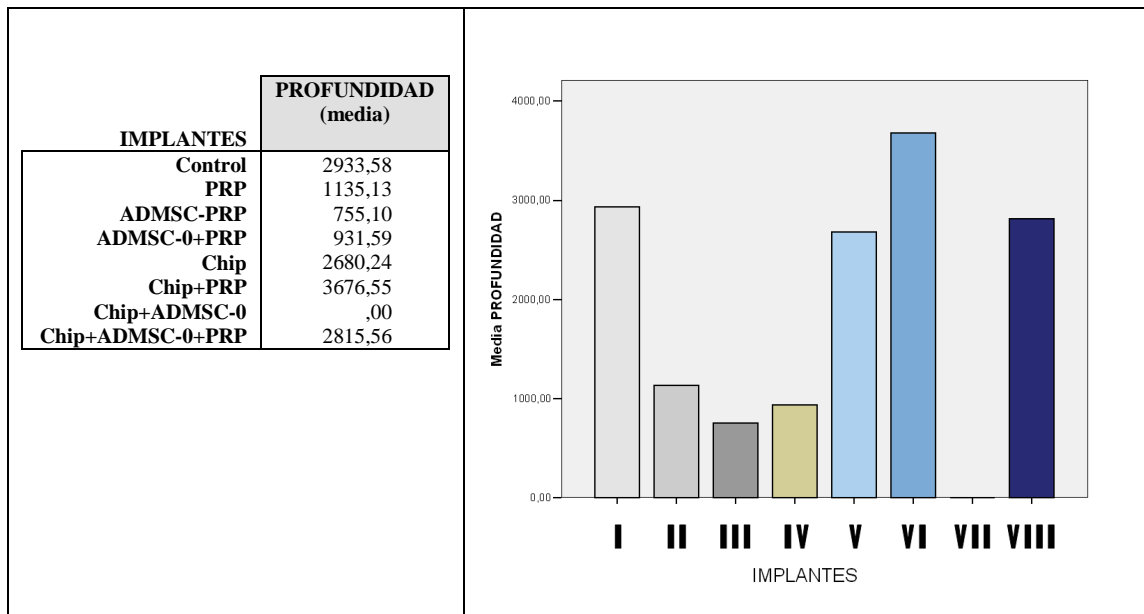
**Tabla 4.18 y fig. 4.41.** Área trabecular total (ATT) en cada grupo del estudio. Estadísticamente se encontraron diferencias a favor del grupo chip-PRP (grupo VI) frente al resto y en contra del grupo chip-células (grupo VII) frente al resto ( $p < 0,05$ ). En la tabla de abajo vemos como en los grupos donde hay chip existe ATT, excepto en el grupo de chip y células, que vuelve a confirmar que la relación chip-células no es buena. Además, observamos las diferencias entre células diferenciadas y sin diferenciar cuando no ponemos chip.



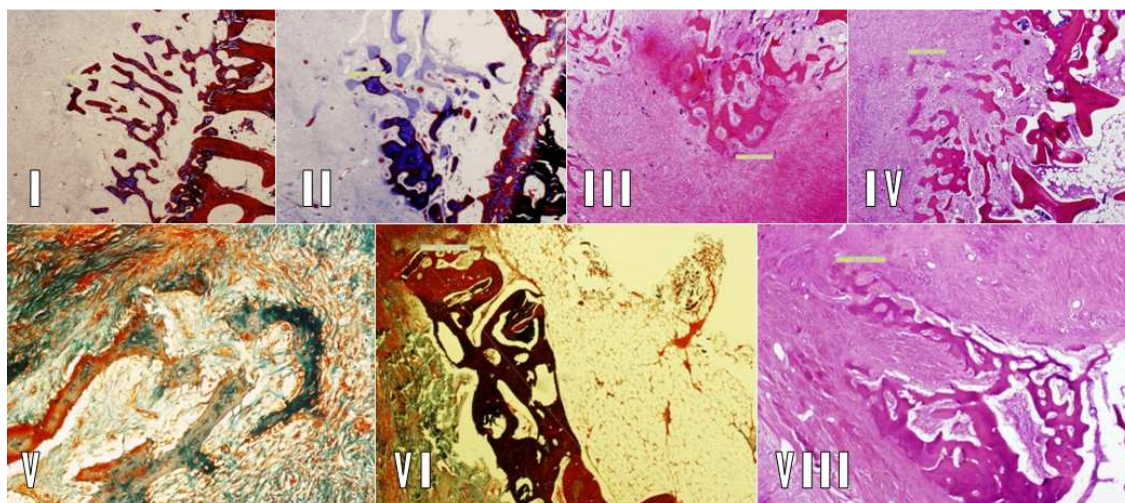
**Fig. 4.42 y 4.43.** Representación del crecimiento óseo en el interior del defecto, expresado en el área trabecular total (20X). Tinción hematoxilina-eosina en los grupos I y IV; y tricrómico de Masson en los grupos V, VI y VIII. En el grupo I se observa crecimiento óseo desde los bordes, sin llegar a unirse. En el grupo IV se observa crecimiento desde el borde interno del defecto. En el grupo V se aprecia crecimiento desde los bordes y desde la zona interna hacia el defecto. En el grupo VI se observa que el defecto se encuentra regenerado en un porcentaje importante (>50%). En el grupo VIII se observa el crecimiento óseo bilateral, estando prácticamente unidos ambos extremos.

### Profundidad de crecimiento

La profundidad de crecimiento óseo en los grupos del estudio se refleja en la tabla 4.17 y en la figura 4.44. En las figuras 4.45 y 4.46 se detallan cortes histológicos de diferentes grupos.



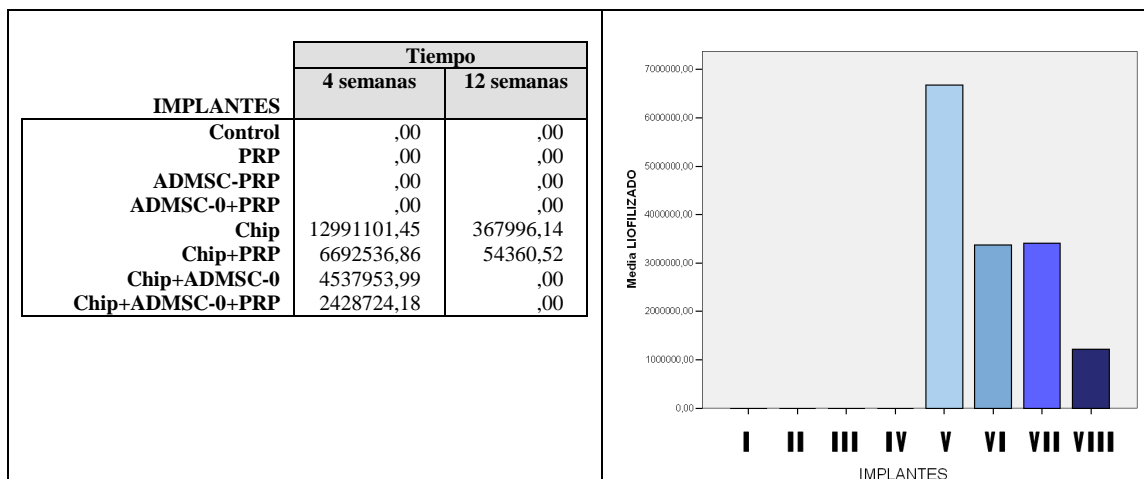
**Tabla 4.19 y fig. 4.44.** Profundidad del crecimiento en cada grupo del estudio. Tras un análisis de varianza, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. No obstante, en los que más regeneración ósea hubo fue en los grupos que tenían chip (grupos V, VI y VIII). La comparación individual de los grupos mediante pruebas no paramétricas tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos más representativos.



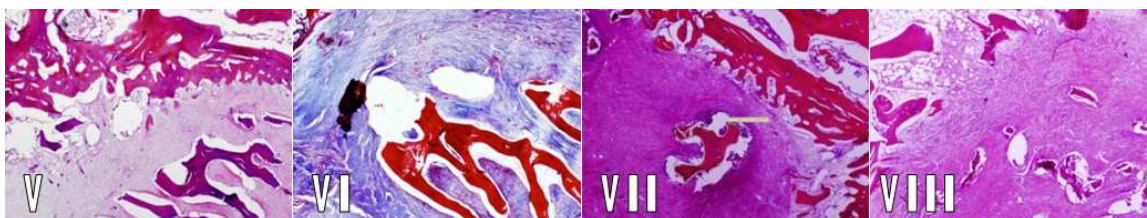
**Figs. 4.45 y 4.46.** Cortes de hematoxilina-eosina a 20X en las figuras de los grupos III, IV y VIII. Tinción tricrómico de Masson a 20X en las figuras de los grupos I, II, V y VI. Se observa que todos los grupos regeneran hueso, con excepción del de chip y células diferenciadas (grupo VII), que no se representa por este motivo.

### Área de microfragmentos de hueso liofilizado (chip)

El área de microfragmentos de hueso liofilizado en los grupos que emplearon tal implante se refleja en la tabla 4.18 y en la figura 4.47. En las figuras 4.48 y 4.49 se detallan cortes histológicos de diferentes grupos.



**Tabla 4.18 y fig. 4.47.** Área de microfragmentos de hueso liofilizado en los grupos del estudio en los que se utilizó.



**Figs. 4.48 y 4.49.** Tinción hematoxilina eosina en las muestras V, VII y VIII (20X) y tricrómicro de Masson (40X) del interior del defecto, donde se observan los fragmentos de heteroinjerto, rodeados de tejido fibroso sin presencia de neoformación ósea en el interior.

### Número de osículos

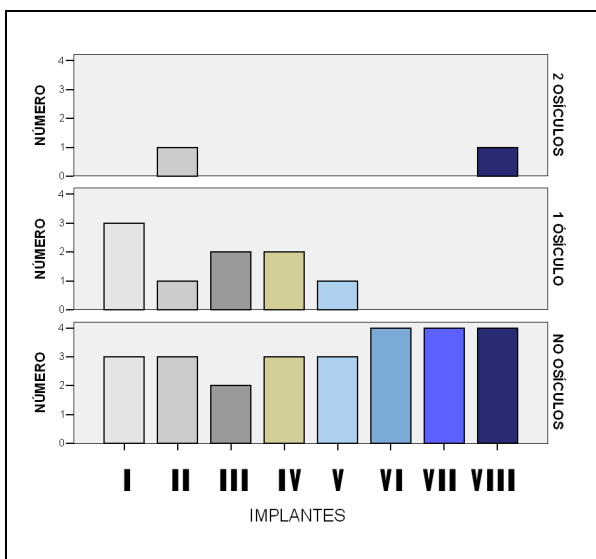
El número de osículos – según la escala de Ranly- en función del grupo de estudio, se representa en la tabla 4.19 y en la figura 4.50. En la tabla 4.20 análisis estadístico para el estudio de esta variable en función de los grupos.

IMPLANTES	Ningún osículo		1 osículo		2 osículos	
	Nº	Columna N (%)	Nº	Columna N (%)	Nº	Columna N (%)
Control	3	11,5	3	33,3	0	,0
PRP	3	11,5	1	11,1	1	50,0
ADMSC-PRP	2	7,7	2	22,2	0	,0
ADMSC-0+PRP	3	11,5	2	22,2	0	,0
Chip	3	11,5	1	11,1	0	,0
Chip+PRP	4	15,4	0	,0	0	,0
Chip+ADMSC-0	4	15,4	0	,0	0	,0
Chip+ADMSC-0+PRP	4	15,4	0	,0	1	50,0
<b>NO CHIP</b>	11	42,3	8	88,9	1	50,0
<b>SÍ CHIP</b>	15	57,7	1	11,1	1	50,0

**Tablas 4.17.** Descripción de los osículos según la escala de Ranly observados en los diferentes grupos del estudio. Arriba, en todos los grupos. Abajo, separando los grupos sin chip de los grupos con chip.

	Escala Ranly
Mann-Whitney U	117,000
Wilcoxon W	270,000
Z	-2,021
Asymp. Sig. (2-tailed)	,043
Exact Sig. (2* (1-tailed Sig.))	,110

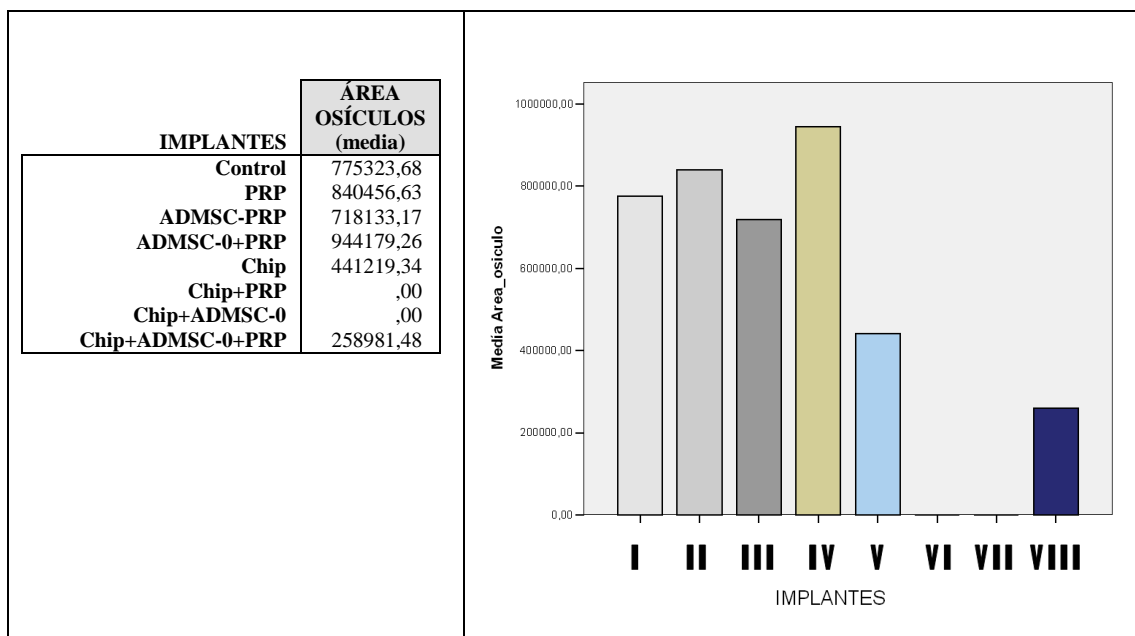
**Tabla 4.20.** Demostración de la significación estadística de la menor presencia de osículos según la escala de Ranly en los grupos con chip.



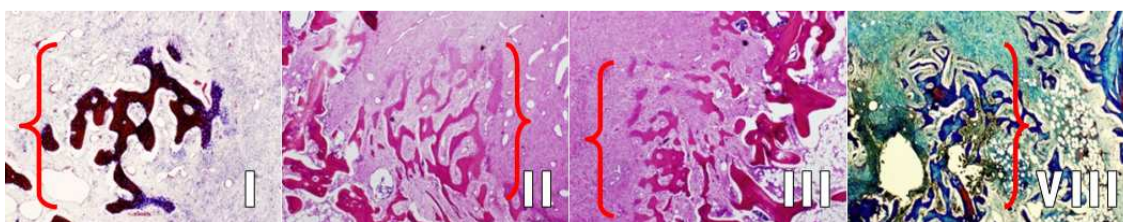
**Fig. 4.50.** Representación gráfica del número de osículos según la escala de Ranly observados en cada grupo del estudio.

### Área de osículos

El área de los osículos en los distintos grupos del estudio se refleja en la tabla 4.21 y en la figura 4.51. En las figuras 4.52 y 4.53 se detallan cortes histológicos de diferentes grupos.



**Tabla 4.21 y Fig. 4.51.** Área de los osículos en los diferentes grupos del estudio. Se observa que el área de los osículos es mayor en el grupo de células más PRP (grupo IV). En los grupos con chip el área de los osículos fue menor, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figs. 4.52 y 4.53.** Tinciones Tricrómico de Masson 40X en las muestras I y VIII y hematoxilina-eosina 40X en las muestras II y III. Se observa cómo se va regenerando nuevo hueso inmaduro a partir de la periferia del defecto (corchetes marcando la amplitud de los osículos).

### Medidas celulares

Las medidas celulares en los distintos grupos del estudio se refleja en la tabla 4.22 y en la figura 4.54. En las figuras 4.55 y 4.56 se detallan cortes histológicos de diferentes grupos.

IMPLANTES	OSTEOBLASTOS (media)	OSTEOCLASTOS (media)	RIBETE DE OSTEOBLASTOS (media)
Control	189,17	,00	256,50
PRP	222,50	,00	256,50
ADMSC-PRP	204,25	,00	329,75
ADMSC-0+PRP	234,40	,00	357,00
Chip	201,00	30,75	339,00
Chip+PRP	206,00	14,75	401,75
Chip+ADMSC-0	,00	30,25	194,50
Chip+ADMSC-0+PRP	157,00	21,00	361,00

Tabla 4.22. Medidas celulares en los diferentes grupos del estudio.

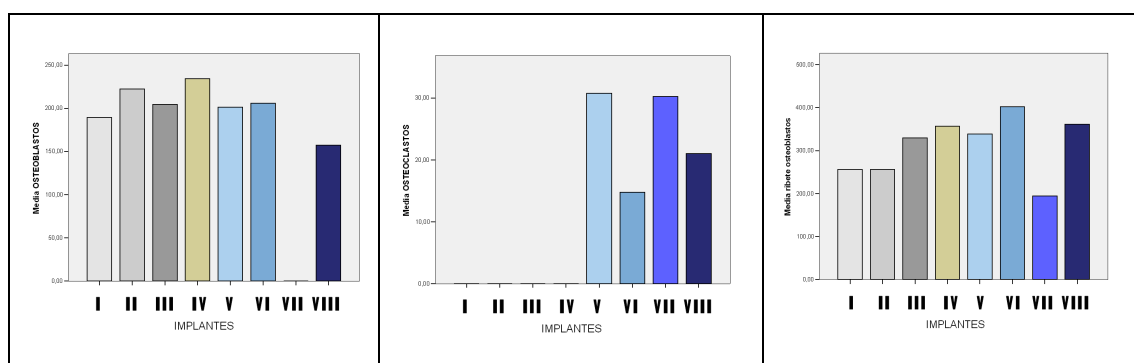
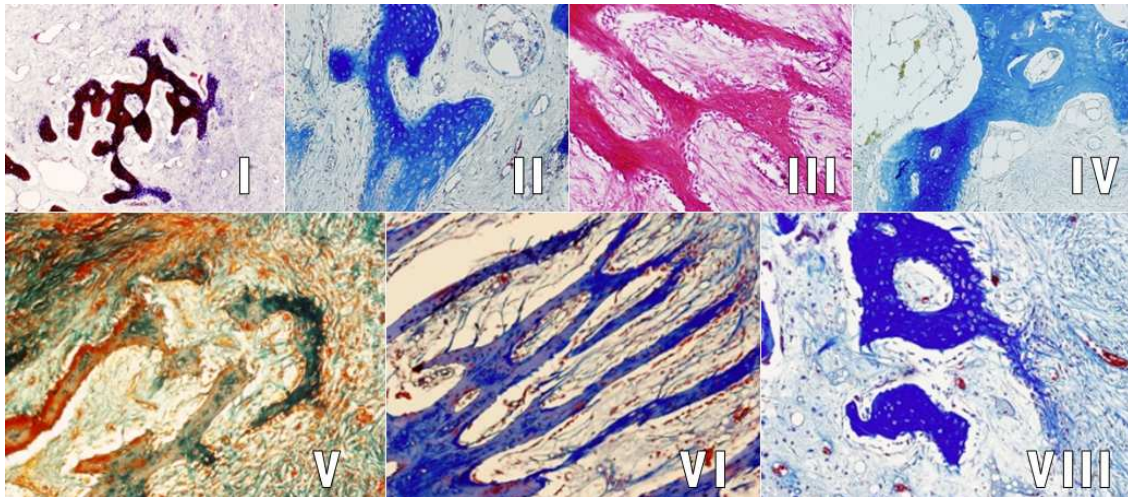
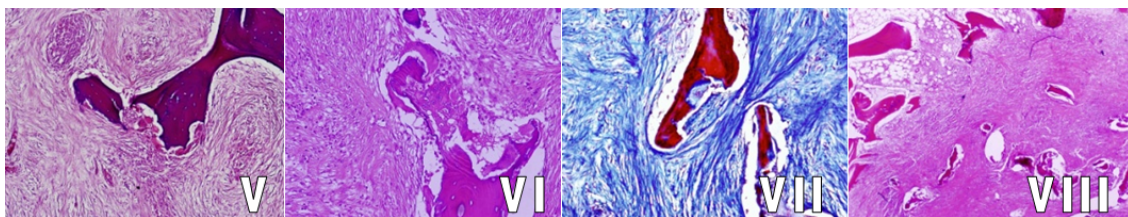


Fig. 4.54. Representaciones gráficas de las medidas celulares en los diferentes grupos del estudio (a la izquierda de los osteoblastos, en el centro de los osteoclastos y a la derecha del ribete de osteoblastos). Los osteoblastos fueron más numerosos en el grupo de células diferenciadas y PRP (grupo IV), siendo las diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó este grupo con el resto ( $p < 0,05$ ). El número de osteoclastos no mostró diferencias estadísticamente significativas en los grupos V-VIII. Al realizar la comparación de los resultados de los valores del ribete osteoblástico de manera individual entre los grupos observamos que existen diferencias significativas entre los grupos VII y VIII y entre los grupos VI y VII utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con significación menor de 0,05.

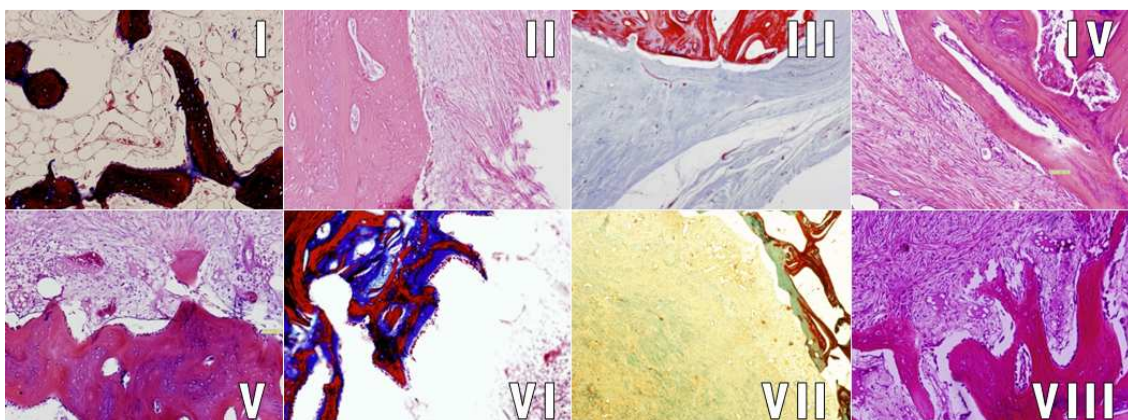




**Figs. 4.55.** Tinción tricrómico de Masson en el grupo I (40X) y II, IV, V, VI y VIII; y hematoxilina-eosina en la muestra III. Observamos la formación ósea con osteocitos en el interior de las lagunas y osteoblastos rodeando esas trabéculas. Alrededor de las trabéculas se aprecia tejido fibroso.



**Fig 4.56.** Tinción hematoxilina-eosina en los grupos V y VI (40X) y en el grupo VIII (20X); y tricrómico de Masson en las muestra VII (40X). Observamos fragmentos de heteroinjertos y, alrededor, células multinucleadas (osteoclastos) reabsorbiéndolos. En el grupo VIII sólo se visualiza el heteroinjerto debido al poco aumento. En el margen superior izquierdo de la imagen se identifican trabéculas bordeando al defecto.



**Figs. 4.57.** Tinción hematoxilina-eosina 100 X en los grupos II, IV, V, VII, VIII y tricrómico de Masson 100X en los grupos I, III, VI. Se observa la presencia de osteoblastos alrededor de la periferia del defecto óseo. En el grupo VII no vemos actividad en el interior del defecto, con poco ribete osteoblástico.

# DISCUSIÓN

## **5.1 Discusión general**

El sistema músculo-esquelético está diseñado para sostener y mantener la forma y la función que el organismo demanda en las actividades de una vida activa normal. Cualquier defecto que altere la homeostasis del tejido, independientemente de su origen, lo compromete y debilita y, consecuentemente, precisa ser reparado en un entorno biológico favorable y de estabilidad mecánica <sup>129</sup>.

El tejido óseo es un tipo especial de tejido conectivo que, al igual que otros, está compuesto de células y sustancia intercelular. La característica que lo distingue es la mineralización de la sustancia intercelular, lo que le imparte gran dureza y lo hace capaz de proporcionar sostén y protección <sup>2</sup>. Otra propiedad característica es que mantiene su capacidad de regeneración en la vida adulta mediante procesos de regeneración y reparación ósea <sup>85</sup>, que pasan por fases sucesivas de inflamación, de formación del callo blando, de formación del callo duro y de remodelación ósea. Las acciones que inician los mecanismos de reparación durante las primeras fases son las más importantes, precisando un ambiente biológico favorable y de estabilidad mecánica <sup>85</sup>.

Las propiedades mecánicas del hueso también son particulares. Mientras que las fuerzas tensionales son similares a las del hierro fundido, el hueso es tres veces más ligero y diez veces más flexible. Sin embargo el hueso no es un material homogéneo e inerte como el hierro, el plástico o los metales de los que están hechos la mayoría de los implantes utilizados en ortopedia <sup>130</sup>.

La pérdida de tejido óseo como consecuencia de traumatismos, del tratamiento de tumores o de otras enfermedades, supone un gran y frecuente problema de salud que hay que afrontar <sup>12;16;17;131;132</sup>. En aquellas situaciones donde el organismo no es capaz de reparar las lesiones tenemos que buscar otros medios que permitan restablecer la normalidad anatómica y funcional, es decir, conseguir la regeneración ósea mediante la reconstrucción tisular en una estructura tridimensional anatómica funcional <sup>46;49;133-135</sup>. Para ello se precisarían células (osteogénesis), factores de crecimiento (osteoinducción), un soporte estructural (osteoconducción) y un entorno adecuado <sup>85;106</sup>.

En la actualidad, sólo los injertos de hueso esponjoso autólogo poseen las propiedades de osteoinducción, osteoconducción, osteointegración y osteogénesis necesarias para conseguir la regeneración ósea, si bien con las limitaciones de la

disponibilidad y la morbilidad en el paciente<sup>9;14;17;86;112</sup>. La obtención de un sustituto óseo biocompatible que reprodujera las propiedades biológicas de los autoinjertos sería lo ideal y es el objetivo del presente trabajo, que ha pretendido estudiar la capacidad regenerativa de células troncales de la grasa diferenciadas a células óseas mediante técnicas de ingeniería tisular.

La esperanza de vida en los países desarrollados es cada vez mayor, condicionando un envejecimiento poblacional y un aumento en la prevalencia de las enfermedades crónicas degenerativas. De hecho, se estima que en el año 2012 el 25% de la población europea tendrá más de 65 años, que en Castilla y León ya tienen el 22,5% de su población total, seis puntos por encima de la media española (16,6%). En este contexto aumentarán enfermedades como la de Alzheimer o, en el ámbito músculo-esquelético, enfermedades como la artrosis, la osteoporosis u otras que debilitan de forma global o local el tejido óseo y que pueden manifestarse con fracturas o con síntomas derivados de la misma fragilidad. La fragilidad ósea local a menudo se debe a defectos óseos, que pueden tener orígenes muy diversos, como ya se ha apuntado, con gran exigencia terapéutica y socioeconómica. Al respecto, las enfermedades óseas se encuentran entre las principales causas de absentismo laboral, hospitalización e incapacidad, consumiendo una media del 3% del PIB total en los países desarrollados<sup>136</sup>.

Paralelamente al envejecimiento de la población, el incremento de los traumatismos de alta energía incidirá en el aumento de lesiones con defectos óseos susceptibles de reparación. En 1990 ocurrieron más de 3,2 millones de muertes y aproximadamente 312 millones de personas de todo el mundo necesitaron atención médica debido a lesiones por traumatismos no intencionales. En el año 2000 el número de muertes fue superior a 3,8 millones, y para el año 2020 se calcula que los traumatismos serán la segunda o tercera causa de muerte en todos los grupos de edad, siendo la primera entre los individuos de 1 y 44 años en los países desarrollados<sup>137</sup>.

Con todo, el impacto de las referidas patologías sobre los individuos, la sociedad y los sistemas de salud y sociales ha motivado que la Organización Mundial de la Salud declare la década 2000-2010, que está a punto de finalizar, como la “Década del hueso y las articulaciones”. De esta forma se ha pretendido informar del importante crecimiento

de los procesos patológicos del aparato locomotor que afectan a nuestra sociedad, así como promover la investigación para la prevención y su tratamiento <sup>138</sup>.

La reparación de los defectos esqueléticos puede ser muy compleja, dependiendo, fundamentalmente, de su magnitud. La mayoría de las alternativas terapéuticas en la actualidad se refieren al empleo de injertos óseos, de origen autólogo, homólogo o heterólogo, cada uno de ellos con ventajas e inconvenientes, algunas de ellas ya apuntadas.

Los autoinjertos óseos son los obtenidos del mismo individuo y transferidos a otra parte de su esqueleto, con propiedades óptimas de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, histocompatibles y, por su procedencia, incapaces de transmitir enfermedades <sup>13</sup>. Sin embargo, tienen una limitación física en cuanto a su disponibilidad, suponen una segunda intervención en el mismo paciente, aumentando el tiempo quirúrgico y añadiendo morbilidad, y no pueden usarse en el caso de niños, ancianos o pacientes con enfermedades malignas.

Los homoinjertos son injertos óseos trasplantados entre miembros genéticamente no idénticos de la misma especie <sup>13</sup>. Su principal ventaja se refiere a su amplia disponibilidad, que depende de la oferta de los bancos de tejidos, su reducida inmunogenicidad y su buena tolerancia por parte del receptor. Sin embargo, no tienen propiedades osteogénicas y prácticamente limitan su papel al de un buen osteoconductor. Además, están expuestos a numerosas complicaciones, sobre todo cuando se emplean en grandes reconstrucciones, entre las que destacan las infecciones, las pseudoartrosis y las fracturas. También pueden reabsorberse por mecanismos inmunológicos.

Los heteroinjertos o xenoinjertos son los implantados entre sujetos de especies diferentes. Aunque su disponibilidad es grande, su capacidad inmunógena es el principal inconveniente para su generalización <sup>13</sup>. De cualquier forma, aunque se desconozca el mecanismo exacto y la importancia real de la respuesta inmune a su incorporación, los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad serían fundamentales en el reconocimiento del injerto por parte del huésped. Las moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) serían reconocidos por los linfocitos T del huésped, que podría rechazar el injerto, como puede ocurrir con

otros órganos parenquimatosos <sup>139</sup>. En nuestro estudio los utilizamos por su disponibilidad y porque el estudio era experimental y nos lo permitía.

Con el fin de solventar los inconvenientes de los injertos óseos, en los últimos años se ha avanzado en el diseño de nuevos materiales sintéticos de gran aplicación en el campo de nuestra Especialidad. La mayoría de estos materiales presentan una excelente biocompatibilidad y buena osteoconducción, aunque sus aplicaciones clínicas se ven limitadas por problemas de osteogénesis, de reabsorción a largo plazo y por unas propiedades mecánicas pobres <sup>135</sup>. Nos referimos a las cerámicas y a los polímeros, así como a los biomateriales (entre los que cabría citar a la matriz ósea desmineralizada, al colágeno y a los sustitutos óseos sintéticos), a los denominados compuestos “licon-based” (cristales bioactivos, vidrio ionomérico y sustratos osteoconductivos no biológicos) y a los injertos combinados.

Debido a las limitaciones asociadas a todos estos tipos de injertos y sustitutivos óseos, en los últimos años la terapia celular y la ingeniería tisular han adquirido una gran importancia en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la reparación de patologías del tejido óseo.

La Ingeniería de Tejidos se considera rama de la Bioingeniería, sirviéndose de métodos de ingeniería de materiales, bioquímica y físico-química para mejorar o sustituir funciones biológicas dañadas mediante la creación de tejidos específicos mediante la manipulación y selección de células, matrices y estímulos biológicos <sup>41</sup>. En nuestro ámbito se refiere a la creación de tejido óseo o de otra naturaleza del sistema músculo-esquelético. Se trata de combinar células, indiferenciadas o no, en una matriz a la cuál se pueden añadir factores de crecimiento que aceleren su proliferación e indiferenciación para ser trasplantadas al hueso dañado y conseguir su regeneración <sup>42</sup>.

Una de las alternativas más prometedoras, en la actualidad, para el tratamiento de las alteraciones del hueso se centra en la utilización de células de naturaleza mesenquimal. Desde que Phemister, en 1947, utilizara la inyección de células de madre mesenquimales de médula ósea (BMSCs) en pacientes con pseudoartrosis <sup>140</sup> y, en las décadas posteriores, Burwell definiera la capacidad regenerativa de la médula ósea de la cresta iliaca <sup>134</sup>, el implante de células mesenquimales para el tratamiento de diferentes tipos de lesiones ortopédicas ha ido adquiriendo cada vez más importancia. La inyección percutánea de este tipo celular como terapia en necrosis <sup>91;134</sup> y diferentes fracturas <sup>92</sup> ha resultado ser bastante exitosa. Además su utilización permite el desarrollo

de técnicas mínimamente invasivas, que pueden ser aplicadas bajo anestesia local y con mínimas complicaciones, evitando, en la medida de lo posible, la necesidad de utilizar técnicas quirúrgicas bastante más agresivas.

Insistiendo en las aplicaciones clínicas de las MSCs de la médula ósea o de otro origen en la regeneración tisular, los progenitores de hMSCs han sido utilizados después de su expansión *in vivo* y su inmediata implantación en la reparación satisfactoria de defectos óseos y cartilagosos, en no uniones de fracturas, en el tratamiento de heridas crónicas en la piel y de infartos de corazón en humanos y en modelos experimentales. La implantación directa de hMSCs en lesiones cerebrales de ratas también ha demostrado ser eficaz.

La administración sistémica de hMSCs ha disminuido los niveles de glucosa en el ratón diabético. Por otra parte, la administración sistémica de MSCs de médula ósea en modelos animales ha demostrado facilitar la reparación de lesiones en los riñones y en el cerebro; así como la administración sistemática de células de médula ósea ha sido utilizada para el tratamiento de la osteogénesis imperfecta en humanos. También se están estudiando sus beneficios en pacientes con infarto de miocardio y con anemias aplásicas severas.

Con respecto al mecanismo de actuación de las MSCs en su uso clínico, se ha sugerido que en la reparación tisular no intervendrían a través de la diferenciación a un fenotipo celular particular, sino mediante la secreción de factores solubles que crearan un microambiente tisular más favorable, que algunos han definido como “actividad trófica”. En este sentido, estudios *in vitro* han demostrado que las MSCs son capaces de producir una gran variedad de factores que participan en un amplio rango de funciones biológicas, incluyendo la angiogénesis, así como péptidos neuroreguladores y citoquinas con efecto crítico en la reparación y la inflamación.

En relación con los sistemas de liberación de MSCs en el lugar a tratar, hay mucho que investigar. Cuando se trata de una administración sistémica el número de células que asientan en la lesión es escaso y limita el procedimiento. La implantación local también tiene limitaciones. Otra alternativa sería la aplicación en andamiajes desde los que se liberen.

La utilización de MSCs modificadas genéticamente es otra de sus aplicaciones potenciales; y en modelos experimentales se han utilizado para la expresión ectópica de BMP-2, con la finalidad de reparar hueso o cartílago. Otras de sus posibilidades terapéuticas radica en sus propiedades antiinflamatorias, en parte debido a la secreción del receptor antagonista de la IL-1, e inmunomoduladoras. Esto se debería a una expresión intermedia de proteínas de complejo mayor de histocompatibilidad clase I pero no clase II. Como este fenotipo se considera no inmunogénico, el trasplante alogénico de hMSCs podría no requerir de ninguna terapia inmunosupresora, amén de poder utilizarse en la enfermedad del injerto contra el huésped y en enfermedades autoinmunes <sup>141</sup>.

A pesar de que las células troncales adultas presentan una menor capacidad proliferativa y de diferenciación que las células madre embrionarias su plasticidad no se ve restringida al linaje del tejido en el que se encuentran, si no que pueden diferenciarse hacia tipos celulares con diferente origen embrionario <sup>64</sup>. Puede conseguirse la diferenciación de células musculares a partir de células troncales neurales <sup>52</sup>, u obtener células musculares, grasas o neurales a partir de células troncales de la dermis <sup>57</sup>. En el periodo postnatal, en suma, se encuentran en todos los tejidos adultos diferenciados (médula ósea, periostio, músculo, grasa, cerebro, piel, etc), encargándose de mantenerlos y repararlos replicándose y diferenciándose en respuesta a los estímulos correspondientes hacia fenotipos celulares especializados <sup>50;53</sup>.

Debido a sus propiedades y a la facilidad para su aislamiento y expansión in vitro, las MSCs se utilizan en ingeniería tisular, así como un gran número de factores que intervienen en su proliferación y diferenciación: factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, señales moleculares y factores de transcripción <sup>50</sup>. Para aplicaciones regenerativas las células troncales ideales deberían estar en número suficientemente amplio (millones o billones de células); poderse obtener por procedimientos mínimamente invasivos; poderse diferenciar a distintos linajes; y poderse trasplantar de manera eficaz y segura <sup>65</sup>. Para la regeneración ósea un número suficiente de células osteoprogenitoras se obtendría estimulando su reclutamiento o implantándolas directamente en un sitio específico <sup>23</sup>. A pesar de todo, el mecanismo biológico responsable del extenso potencial de desarrollo de las células madre no se conoce <sup>64</sup>.



La utilización de sustitutos óseos comenzó hace más de 300 años, en 1668, con el cirujano alemán Job Van Meek'ren. Desde entonces su uso se ha generalizado <sup>23</sup>. La idea de que la médula ósea contenía algún tipo de célula osteogénica precursora fue de Petrakova <sup>142</sup>, en el año 1963, que la implantó debajo de la cápsula renal y observó la formación de tejido óseo. Posteriormente, Friedenstein y cols, sugirieron la posibilidad de la presencia de células madre osteogénicas en la médula ósea mediante estudios in vivo <sup>44</sup>. Desarrollaron un método para aislar células fibroblásticas provenientes de la médula ósea con habilidad para adherirse a los tejidos <sup>143</sup>. Sembraron muestras de médula ósea en platos de cultivo y retiraron las células no adherentes a las 4 horas, eliminando la mayoría de las células hematopoyéticas. Las más adherentes presentaban prolongaciones y formaban agrupaciones de 2 ó 4 células, manteniéndose inactivadas durante 2-4 días y, después, comenzando a multiplicarse rápidamente. Después de varios pases en el medio de cultivo, las células adherentes se hacían más homogéneas y adoptaban una apariencia fibroblástica, por lo que, para describir estos fibroblastos no fagocíticos de naturaleza clónica se hablaría de unidad formadora de colonias fibroblástica (CFU-U) <sup>71</sup>.

Casi 20 años después, Caplan <sup>144</sup> dio a estas células el nombre de célula troncal mesenquimal, que es el término que se emplea en la actualidad. En 1994, el mismo autor describió que estas células, implantadas con las condiciones de cultivo adecuadas, podían diferenciarse a células de origen mesenquimal, dando lugar a hueso, cartílago, grasa, músculo, piel, tendones o a otros tejidos de origen mesenquimal. A este proceso lo denominó el proceso mesenquimal <sup>145</sup>.

Las células osteogénicas son células capaces de producir hueso o de diferenciarse a células formadoras de hueso. Se localizan en el periostio, en el tejido blando peritrabecular y en la médula ósea, suponiéndose que derivan de un pequeño grupo de células troncales pluripotenciales del tejido conectivo de asiento físico exacto y características que se desconocen. Las de la médula ósea, al cultivarlas, muestran capacidad de adhesión y proliferación, a la vez que mantienen la capacidad de expresar diferentes fenotipos <sup>23</sup>.

Estudios de progenitores de médula ósea han sugerido la presencia de dos poblaciones precursoras de células osteogénicas: el precursor determinado de células osteogénicas (DOPCs, determined osteogenic precursor cell) y el precursor inducible de células osteogénicas (IOPCS, inducible osteogenic precursor cells). Las DOPCs,

encontradas en la superficie ósea y en el estroma peritrabecular, son células troncales que pueden proliferar y que han sido direccionadas hacia el fenotipo osteoblástico. Las IOPCs representan un progenitor pluripotencial capaz de diferenciarse a una o más variedad fenotípica de tejido conectivo con el estímulo apropiado: hueso, cartílago, tejido fibroso, músculo, grasa o células gliales. Aunque derivan del mismo grupo de células madre del tejido conectivo, son una población proliferativa celular más inmadura que las DOPCs y se piensa que se encuentran en la médula ósea, el periostio, las células pericíticas vasculares específicas y, probablemente, en la circulación sanguínea<sup>23</sup>.

Las células de naturaleza mesenquimal derivadas de médula ósea tienen, como hemos dicho, la capacidad de diferenciarse hacia los constituyentes celulares de tejidos como el graso, el óseo o el cartilaginoso, entre otros<sup>68</sup>. Esta capacidad de adquisición de nuevos fenotipos también se ha demostrado en células troncales mesenquimales de otros orígenes tisulares. Es el caso de las procedentes del tejido adiposo<sup>100</sup>, de la placenta<sup>121</sup> o del cordón umbilical<sup>100</sup>. Las que parecen más interesantes en el desarrollo de una terapia celular autóloga son las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ADMSCs), debido a su gran disponibilidad y fácil obtención.

La utilización in vivo de ADMSCs para el tratamiento de lesiones óseas sigue siendo limitado frente al uso de células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSC)<sup>146-148</sup>. Peterson y cols<sup>147</sup> sugieren que la funcionalidad de aquellas era menor al igual que Yoon et al y Hui et al<sup>147;149</sup>. En este estudio, sin embargo, el animal de experimentación fue el conejo, que tiene una elevada tasa de regeneración ósea, y el defecto creado no fue crítico. Hayashi et al<sup>150</sup>, también también concluyeron atribuyendo un mayor poder regenerativo a las células troncales derivadas de la médula ósea, si bien el animal de experimentación utilizado también fue pequeño (rata), lo cual hacía más limitada la extrapolación de los resultados.

Se han realizado diferentes estudios para determinar el número de células madre que se obtienen del lipoaspirado de tejido graso que, dependiendo de la edad, del índice de masa corporal y del lugar de la obtención, se calcula en aproximadamente 5000 CFU-F por gramo de tejido adiposo. La cantidad de CFU-F que se obtiene de médula ósea es de 100 a 1000 por mililitro<sup>76</sup>. Es decir, la prevalencia de células madre en el tejido adiposo es al menos 500 veces mayor que en médula ósea<sup>77</sup>.

Existe una clara diferencia entre las dos técnicas. La morbilidad de la zona donante limita la cantidad de médula ósea que podemos obtener, haciendo necesario ampliar el tiempo de cultivo para obtener dosis terapéuticas de células troncales. El volumen de médula humana que se obtiene bajo anestesia local generalmente no es mayor de 40 ml y la cantidad de células nucleadas aproximadamente de  $1,2 \times 10^9$  que contendrá aproximadamente  $2,4 \times 10^4$  MSCs en el esqueleto adulto maduro. Para obtener un volumen mayor se necesita anestesia general, pero se incrementa la morbilidad de la zona donante y se diluye la fracción de células madre con sangre. Por el contrario, una recogida de tejido graso, bajo anestesia local, puede obtener fácilmente más de 200 ml y una cantidad aproximada de células  $2 \times 10^8$  por 100 ml de lipoaspirado, que sobrepasa  $1 \times 10^6$  la cantidad de células obtenidas. Drago y cols cuantificaron el número de ADSCs como  $3,3 \times 10^6$  células por  $100 \text{ cm}^3$  de tejido graso obtenido mediante liposucción y  $5,5 \times 10^6$  células de media en 21 ml de grasa infrapatelar<sup>151</sup>.

De cualquier forma, parecen no existir diferencias significativas entre las ADMSCs y las BMMSCs en cuanto a rendimiento de células adherentes, cinética de crecimiento, senescencia celular y capacidad de diferenciación<sup>121</sup>. Incluso se ha demostrado, en investigaciones recientes, que a partir del tejido adiposo se obtiene un mayor número de células troncales mesenquimales y con mayor capacidad proliferativa que las aisladas de médula ósea<sup>100</sup>. En este sentido, se ha demostrado que las ADMSC son capaces de adquirir fenotipos de hueso, cartílago, grasa o miocardio<sup>79</sup>, además de piel<sup>152</sup> y neuronas<sup>153</sup>. Esta capacidad de diferenciación va a depender de la constitución de determinados microambientes, mediante la adición in vitro de determinados factores de crecimiento y proteínas.

Las técnicas de obtención y diferenciación hacia osteoblastos de las ADMSCs han sido bastante estudiadas en los últimos años. Se ha investigado su eficacia en la reparación ósea de forma aislada y en combinación con otras técnicas para tratar, por ejemplo, defectos craneales en humanos<sup>153</sup>. Sin embargo, aún no se han definido claramente las condiciones necesarias para su implante (tipo de vector o transportador a utilizar, número de células a implantar, etc) y se desconoce la evolución radiográfica y el comportamiento clínico del tejido reparado.

En nuestro estudio, en una fase inicial obtuvimos células troncales mesenquimales derivadas de la grasa de una región de un modelo animal rico en ella: su

cola. Posteriormente las procesamos e, *in vitro*, las diferenciamos a células con fenotipo osteogénico que finalmente implantamos en el defecto óseo cavitario. Como osteoinductor utilizamos el plasma rico en plaquetas y como osteoconductor heteroinjerto bovino de hueso liofilizado.

Aunque *in vitro* la terapia celular ofrece un futuro prometedor, una de sus limitaciones más notables se refiere a los andamiajes o vectores con los que vehicular aquéllas. Debieran permitir una correcta expansión celular, además de ser biocompatibles y biodegradables, y permitir hacer un seguimiento de la evolución lesional. El objetivo final sería un sistema que reprodujera el microambiente en el que un determinado tipo celular encontrara las mismas condiciones que *in vivo* y que permitiera el desarrollo de protocolos de manipulación y utilización de las células. En nuestro estudio hemos utilizado como andamiaje, en los grupos V, VI, VII y VIII, heteroinjerto de hueso liofilizado.

Otra limitación de la ingeniería tisular es el tiempo que se requiere para tener disponibles las células en aquellas situaciones en las que se necesita su expansión *in vitro*, como sería el caso de nuestro modelo experimental. El proceso, además, incrementaría el coste global del procedimiento limitando en cierto sentido su aplicación<sup>154</sup>. Sin ser este el motivo de nuestro estudio, no es aventurado avanzar que estos aspectos deben mejorar en el futuro.

Con respecto al plasma rico en plaquetas (PRP), que también utilizamos en nuestro estudio, su preparación e implante está actualmente muy extendido, siendo su uso habitual en la Cirugía Ortopédica y Traumatología, en la Odontología y en la Oftalmología. Las plaquetas son una fuente potencial de múltiples factores de crecimiento y proteínas autólogas implicadas en los procesos de regeneración tisular. Por todo ello promueven la angiogenesis, reclutan células mesenquimales y son una fuente de factores de crecimiento necesarios en la curación ósea<sup>155</sup>.

Después de la activación por un agonista como la trombina, las plaquetas presentes en el PRP, liberan los siguiente factores: ADP y ATP, Angiopoyetina 2, Péptido activador del tejido conectivo (CATP III), factor crecimiento epidérmico (EGF), Factor V, Factor XI, Factor XIII, Fibrinógeno, Factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF de FGF2), fibronectina, factor de crecimiento análogo de insulina (IGF-I), Osteocalcina, P-selectina, factor de crecimiento de células endoteliales

derivado de las plaquetas (PEDCGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG), factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF-Beta), Serotonina, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor Von Willebrand, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor plaquetario-4 (PF-4) y la trombospondina, entre otros. Todas estas moléculas están implicadas en la estimulación y aceleración de la reparación del tejido óseo <sup>152;156</sup>.

España ha sido uno de los países pioneros en Terapia Celular porque los avances científicos básicos fueron llevados a la clínica con mucha rapidez. La gran sensibilidad social hacia este nuevo enfoque terapéutico hizo que los clínicos españoles se sintieran estimulados a estudiar el papel curativo de las células en una amplia gama de enfermedades, entre las que están las osteoarticulares. En este contexto y en esta fase encuadraríamos nuestro trabajo, que todavía dista de poder ser transferido a los estándares asistenciales.

## **5.2 Discusión del método**

Aunque las técnicas de obtención y diferenciación osteoblástica de las ADMSCs han sido bastante estudiadas en los últimos años, la mayoría de los estudios *in vitro* utilizan células procedentes de lipoaspirados humanos <sup>157</sup>, en tanto que los estudios *in vivo* lo hacen con animales de experimentación pequeños, fundamentalmente roedores <sup>104</sup> y lagomorfos <sup>105</sup>. Teniendo en cuenta la necesidad de trabajar con modelos animales de mayor tamaño, más próximos al humano por razones de peso, estructura y capacidad de regeneración ósea, realizamos este trabajo sobre ovejas de raza Asaaf, <sup>135;158;159</sup>, con las que los estudios realizados hasta la fecha han sido escasos <sup>160;161</sup>. El principal problema a la hora de comparar estudios con diferentes modelos es que la velocidad de regeneración y sus propiedades son diferentes, haciendo difícil su interpretación.

A pesar del elevado coste del animal del estudio, en base a estudios previos consideramos a la oveja como el modelo ideal para la posterior extrapolación de los resultados. En relación con el defecto óseo cavitario con el que trabajamos, utilizamos el método utilizado por Walsh <sup>128</sup>, demostrando que no se regeneraba espontáneamente, lo que significa que es un modelo experimental válido. Frente a la opinión de Nuss y cols <sup>162</sup> que proponen la realización de 8 defectos cavitarios en el mismo animal de experimentación, consideramos que dos eran suficientes para un correcto seguimiento de los mismos.

El defecto óseo cavitario en el cóndilo femoral medial fue primeramente descrito por Maatz <sup>163</sup> en perros. Realizó defectos de 5 mm que presentaban regeneración ósea espontánea a los 15 días. Katthagen en 1986, describió el test de la esponjosa en conejos, realizando un defecto en el cóndilo femoral de 6 mm (que suponía la destrucción aproximada de la mitad del cóndilo), demostrando que en meses no se producía regeneración ósea y proponiendo que tal regeneración se produciría por el implante y no por el receptor.

Abundando en aspectos relativos al animal de experimentación y al defecto óseo con el que se trabaja, una de las complicaciones que se describen son las fracturas alrededor del defecto. La creación del defecto cavitario metafisario distal modifica las condiciones biomecánicas del cóndilo femoral medial, exponiéndolo, lógicamente, a la fractura. En la serie de Katthagen <sup>164</sup> se describe esta complicación en el 1,2% de los casos. En nuestra serie, realizada con un animal de experimentación de mayor tamaño, tuvimos una fractura, que representó el 2,36% de los casos de la serie. Por otra parte, no

identificamos ningún caso de infección clínica ni demostrable en el análisis de las muestras anatomopatológicas, a pesar de la dificultad del manejo del animal de experimentación.

Finalmente, uno de los mayores problemas técnicos que afrontamos durante el procedimiento quirúrgico en el animal experimental fue la fijación del parche utilizado para tapar el defecto óseo que previamente habíamos creado y en el que habíamos implantado el constructo. Tras varios intentos previos, concluimos utilizando una malla de ácido poliglicólico con puntos transóseos al observar que durante el análisis de las muestras el material se mantenía inalterable en su situación original.

Con respecto al trabajo de laboratorio, en nuestro estudio conseguimos que las poblaciones celulares aisladas mediante el método descrito, bajo condiciones de cultivo específicas, fueran capaces de mostrar características específicas de las células óseas (mineralización de la matriz extracelular), cartilaginosas (morfología condrocítica y síntesis de proteoglicanos ácidos) y adiposas (acumulación intracelular de lípidos), lo que la Sociedad Internacional de Investigación con Células Madre (ISSCR) considera fundamental para que las células madre mesenquimales sean consideradas como tales<sup>165</sup>.

En relación con la temperatura de preservación de las muestras de tejido adiposo de las que obtener células diferenciadas, hasta su procesamiento, generalmente se asume que el frío ralentiza el metabolismo celular y que, en consecuencia, retrasa la muerte celular tras la toma de los tejidos. Matsumoto y cols., de hecho, así lo corroboraron comparando los rendimientos celulares obtenidos a partir de lipoaspirados humanos preservados a 4° C, - 80° C y temperatura ambiente durante periodos de tiempo que fueron desde 1 hora hasta 1 mes<sup>166</sup>. En nuestro estudio, sin embargo, se obtuvieron mayores rendimientos celulares tras la digestión de las muestras preservadas a temperatura ambiente que cuando se hizo en condiciones de hipotermia, si bien es cierto que en ningún caso el tiempo que transcurrió desde la toma del tejido del animal hasta su procesamiento superó las 8 horas y que, al contrario que en el estudio de Matsumoto y cols., las muestras fueron extraídas mediante resección quirúrgica y no por liposucción. Por otra parte, la preservación en frío de los fragmentos grasos puede llevar al endurecimiento de los mismos, dificultando la posterior digestión enzimática y afectando así al rendimiento celular alcanzado, traduciéndose esto en un menor rendimiento celular.

Con respecto a la digestión del tejido adiposo, aunque las condiciones generales para el aislamiento de ADMSCs empleadas en la mayoría de las publicaciones derivan del protocolo original desarrollado por Zuk y cols. en 2001<sup>78</sup>, diferentes investigadores introducen pequeñas variables. Así, por ejemplo, la agitación de la muestra durante la digestión y el filtrado de la solución obtenida<sup>135</sup>, según nuestros resultados son procedimientos contraproducentes a la hora de tratar de obtener mayores rendimientos celulares.

Tras el aislamiento de la población de ADMSCs presentes en el tejido graso, el establecimiento del cultivo primario difiere en la bibliografía consultada en lo referente a la densidad de siembra, que puede oscilar desde las  $3,5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup><sup>167</sup>, hasta las  $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup><sup>78</sup>, al tamaño de la superficie plástica sobre la que la siembra se lleva a cabo, que puede oscilar entre 2 y 225 cm<sup>2</sup><sup>168</sup>. En nuestro caso hemos optado por una densidad de siembra de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en pocillos de 2 cm<sup>2</sup>, lo que asegura el cultivo primario y permite obtener tasas de expansión medias de 4 veces el número original de células y 20 veces tras el subcultivo celular a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Así, conseguiríamos gran cantidad de células en pases tempranos y evitaríamos subcultivos prolongados de las poblaciones celulares, que se desaconsejan por la posibilidad de la transformación de las células. Por otra parte, densidades inferiores a  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> podrían ser demasiado bajas como para que los cultivos llegaran al estado de preconfluencia en un tiempo menor a 15 días, lo cual podría llevar a la pérdida del cultivo.



### **5.3 Discusión de los resultados**

Los resultados radiográficos de nuestro estudio, pretendiendo demostrar la regeneración ósea cuando se añadían células troncales a injertos y elementos osteoinductores, fueron decepcionantes. Hedberg <sup>169</sup>, en 2005, comparó radiografías con tomografías microcomputarizadas e histología en el seguimiento de defectos del radio del conejo, considerando el estudio radiológico como un método no invasivo, además de rápido y fácil de realizar (más, incluso, en animales de menor tamaño que en ovejas), que permitía realizar un seguimiento seriado del implante in vivo. Por los mismos motivos, aunque el scanner fuera superior en cuanto a resolución, empleamos el procedimiento en nuestro estudio.

Nuestros resultados radiológicos mostraron un crecimiento y remodelación ósea escasos, sin diferencias significativas entre los grupos y, en cierta manera, discordancia entre los parámetros medidos. Si la escasez puede atribuirse al corto tiempo de seguimiento, aunque también la han apuntado autores como Aghaloo y cols y Hatakeyama y cols <sup>170;171</sup>, que utilizaron PRP como osteoinductor en defectos craneales de la rata, los datos discordantes, en relación con diferencias en los resultados del crecimiento y de la remodelación en los mismos periodos de tiempo, probablemente se deba a las limitaciones de las lecturas radiográficas por parte del observador, como se ha apuntado en el apartado de las limitaciones del estudio. Abundando en la dificultad de la interpretación de las radiografías por la subjetividad del método, con las guías de la escala de Lane y Shandu <sup>125</sup> se ha considerado crecimiento o formación ósea del 25% cuando se veía esclerosis de los bordes y remodelado cuando se perdía la geometría de la circunferencia que dibujaba la broca con la que tallábamos el defecto. En cualquier caso, la existencia de un único observador, siempre el mismo y de forma ciega, parece favorable a la presencia de dos observadores, que podría ser motivo de más confusión.

Los pocos cambios que se adivinan en el crecimiento y el remodelado se observan con el discurrir del tiempo, siendo muy escasos a las 4 semanas del implante. En el mismo sentido, se supone que si dejáramos evolucionar más tiempo al animal la reparación ósea también sería mayor. Lo mismo observó Niemeyer y cols <sup>172</sup>, que informó de valores de regeneración ósea similares a las 4 y las 12 semanas, con diferencias a partir de la semana 18. La formación ósea también fue mayor en los trabajos de Kon y cols <sup>173</sup>, si bien con tiempos de seguimiento de 6 meses. En los de

Borden y cols <sup>174</sup>, que utilizó matriz polimérica de microesferas, sin embargo, el crecimiento óseo se observó a partir de la sexta semana.

De todas formas, de los resultados radiológicos de nuestro estudio parece deducirse que hubiera un intento de regeneración ósea mayor en los grupos con heteroinjerto. El hecho de la adición de factores osteoinductores (PRP) y osteogénicos (células) no parece ser decisivo a la hora de evaluar radiográficamente la regeneración ósea al cabo de los meses de seguimiento de nuestros casos.

Con respecto a la utilidad del plasma rico en plaquetas, el injerto de hueso autólogo combinado con PRP y células estromales de médula ósea autóloga han demostrado en modelos animales acelerar la curación ósea y el remodelado en fracturas de huesos largos <sup>175;176</sup>. Sin embargo, la utilización de hueso autólogo con PRP o en combinación con células estromales de médula ósea parece ser menos efectivo <sup>175;177</sup>. En otros estudios en animales encuentran que la utilización de PRP en combinación con injertos óseos no es superior a la utilización al injerto autólogo <sup>178;179</sup>. La conflictividad existente en los resultados puede ser debido en parte a la variación en la producción del PRP <sup>156;180</sup>. Al respecto podemos identificar 4 variables de interés: la concentración de plaquetas en el PRP; el protocolo para la activación de las plaquetas en el PRP; variaciones sobre el protocolo estándar y los sesgos debidos al estudio <sup>156;180</sup>.

La concentración de plaquetas en el PRP puede variar en función del procedimiento utilizado en la preparación. Según la literatura reciente, no son las concentraciones altas las más efectivas en la proliferación y diferenciación de osteoblastos y fibroblastos <sup>181-183</sup>. De hecho, Weibrich <sup>183</sup> sugiere que la concentración de PRP tiene unos valores máximos sobre la regeneración ósea y que por aplicar más PRP no obtendremos mejores efectos. Por lo tanto, concentraciones elevadas podrían tener un efecto contrario, en términos de regeneración ósea.

En relación con la activación de las plaquetas en el PRP, puede utilizarse trombina y cloruro cálcico (142,8 U/ml de trombina y 14,3 mg/ml de cloruro cálcico) o, como opinan Tsay y cols <sup>184</sup> únicamente cloruro cálcico. En cualquier caso, el PRP necesita ser activado correctamente por un agonista para conseguir una completa degranulación <sup>156;185</sup>. Por ello, la conclusión de que el PRP no favorece la regeneración ósea podría ser debida a que la activación realizada en los estudios no fuera la correcta <sup>186-188</sup>.

En todos nuestros casos recogimos una muestra de 15-25 ml de sangre del animal en tubos de extracción de sangre con citrato para evitar su coagulación. En 2 ml de éste se resuspendieron las células, y se añadieron 50 µl/ml de cloruro cálcico para provocar la coagulación del plasma y que adoptara forma de gel. No utilizamos viales con EDTA, que se ha informado que podrían alterar los resultados.

Finalmente, el tiempo de evolución considerado para observar la regeneración ósea facilitada por el plasma rico en plaquetas podría ser otro sesgo limitante. El poder estadístico de los estudios, su número de casos y otros defectos metodológicos hacen que sea difícil evaluar la eficacia del PRP en la literatura<sup>156</sup>. Las 12 semanas de nuestro estudio parecen insuficientes para obtener la regeneración completa del defecto, como apuntábamos en el estudio radiográfico, pero adecuadas para poder determinar si existen o no diferencias entre los grupos. En este sentido, aunque no cuantificáramos la concentración de plaquetas implantadas, en los grupos en los que lo añadimos pareció adivinarse su eficacia, a diferencia de lo apuntado por autores como Plachokova y cols<sup>189</sup> o Mooren y cols<sup>190</sup>. Otros, como Suba y cols<sup>191</sup>, informaron de la existencia de diferencias en la curación a las 12 semanas, favorables a los grupos en los que se utilizó, que faltaron en los estudios a las 24 semanas. Apuntaron a que el PRP favorecería el crecimiento óseo en las primeras semanas.

Con respecto a la utilidad de los injertos en la regeneración ósea, la incorporación de un injerto óseo es un largo proceso que implica una secuencia de pasos complejos que dependen de la relación entre el injerto y el huésped<sup>139</sup>. Dicha incorporación requiere la interacción de propiedades osteoconductoras y osteoinductivas para una sustitución progresiva (“creeping substitution”). Finalmente se sustituiría el injerto óseo por hueso del receptor según un patrón predecible modulado por la carga del peso.

En la fase inflamatoria inicial se produce la migración de células inflamatorias y fibroblastos hasta el injerto. La formación del hematoma estimula la liberación de citocinas y de factores de crecimiento. La osteoinducción induce la quimiotaxis, mitosis y diferenciación de las células osteoprogenitoras del huésped. Al quinto día se suelen identificar condrocitos y, al décimo, osteoblastos. Los vasos sanguíneos del huésped se infiltran rápidamente en el injerto a través de los canales harvesianos y de Volkmann, y transportan los osteoclastos responsables de la reabsorción de las superficies del injerto. En las superficies de este se produce la formación de hueso tanto de manera intramembranosa como endocondral. En los injertos corticales o esponjosos de gran

tamaño, el fenómeno de osteoconducción continúa durante muchos años y da lugar finalmente a la reabsorción del injerto original y a su sustitución por hueso nuevo del huésped. La remodelación resultante es una respuesta a la actuación de fuerzas biomecánicas, tales como la carga de peso. La obtención de un buen resultado depende del equilibrio entre la revascularización y la osteogénesis, así como de la respuesta del injerto a las cargas aplicadas <sup>139</sup>. En nuestro estudio utilizamos un heteroinjerto, que habría estado sometido a los mecanismos referidos.

En cuanto a nuestros resultados anatomopatológicos, en general demostraron que la regeneración ósea se beneficiaba del uso de injertos, plasma rico en plaquetas y células troncales mesenquimales, aunque las diferencias estadísticas no fueron significativas y hubo aspectos particulares que aclarar. Los resultados relativos al crecimiento óseo y al desarrollo de tejido fibroso, fueron similares a los obtenidos por Plachokova y cols <sup>189</sup>. Comparados con los de Leniz y cols <sup>113</sup>, observamos una mayor actividad osteoblástica y área trabecular total, siendo especialmente significativo el hecho de que en el estudio de este autor se trabajara con autoinjertos, si bien con defectos óseos de mayor tamaño. Los valores de formación ósea del estudio de Ranly y cols <sup>127</sup> y Walsh y cols <sup>128</sup>, por el contrario, fue superiores a los nuestros a las 4 y 12 semanas.

En nuestros grupos con heteroinjerto, comparativamente con los resultados de Leniz y cols <sup>113</sup>, también observamos un menor número de osteoclastos y ausencia de infiltrado linfocitario. Los osteoclastos participarían en la reabsorción del injerto, reconocido como cuerpo extraño y fundamental como elemento osteoconductor.

Con respecto al uso de células troncales de la grasa, aunque Niemeyer y cols <sup>172</sup> no observara diferencias con respecto a grupos control sin ellas en la reparación de defectos óseos críticos en ovejas y dedujera que eran más eficaces las derivadas de la médula ósea, de nuestros resultados parece inferirse que serían igualmente eficaces una vez diferenciadas a células osteogénicas y que no lo serían tanto sin diferenciar, si bien las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas. Resultados similares apuntaron Yoon y cols <sup>148</sup>

La obtención de células troncales de la grasa tiene ventajas con respecto a la médula ósea puesto que aquel tejido es abundante, fácil de obtener, aporta gran cantidad de células y éstas tienen una rápida multiplicación *in vitro*. Cui y cols <sup>192</sup>, por ejemplo, de 1 gramo de grasa obtienen tras 5 días de cultivo  $6 \times 10^6$  millones de células,

manteniendo su potencial osteogénico con los pases de cultivo. La demostración por parte de Shi y cols <sup>193</sup> de que el potencial osteogénico de las células se veía mínimamente afectado por la edad del animal haría la terapia útil en sujetos de edad avanzada.

La necesidad de añadir células en los tratamientos de regeneración tisular es controvertida. Clokie y cols, Ueki y cols y Kubler y cols <sup>194-196</sup> piensan que lo es, como también Kon y cols y Canceda y cols <sup>135;173</sup> tras el tratamiento de defectos segmentarios en oveja utilizando hidroxiapatita con y sin células. Shang y cols y Yuan y cols <sup>197;198</sup>, sin embargo, opinan lo contrario, sugiriendo que las propias células nativas con potencial osteogénico migrarían hasta el andamiaje y formarían allí el hueso nuevo. Sin embargo, en un defecto óseo crítico no parece existir la suficiente cantidad de células como para regenerarlo y las células nativas serían incapaces de hacerlo. Como se ha demostrado que el aporte de BMSCs es una fuente de células osteogénicas y de factores de crecimiento capaces de reclutar células nativas a la zona del defecto, su uso con fines reparativos parece lógico. Este mecanismo, sin embargo, no ha sido demostrado que lo produzcan las mismas células troncales derivadas de la grasa.

Los resultados de nuestro estudio apuntan a que las células troncales mesenquimales de la grasa aumentan la regeneración ósea, si bien es sorprendente que cuando se combinan con heteroinjerto su efecto es menor. Según los estudios de Hicok y cols <sup>199</sup>, la capacidad osteogénica de las ADMSCs se ve influenciada por el andamiaje sobre el que se añaden las células y explicaría nuestros hallazgos. Comparando los diferentes grupos donde se utilizó el heteroinjerto vemos que existe un buen comportamiento cuando se asocia al PRP y que, cuando se asocia a células y, en menor medida, a células y PRP, los resultados son peores. Teniendo en cuenta, no obstante, que la regeneración fue mayor en los grupos en los que se utilizó injerto, la presencia de éste como osteoconductor es fundamental, como también parece tener interés la adición de PRP. El hecho de que las células troncales mesenquimales pudieran interferir en la incorporación del heteroinjerto justifica nuevos estudios con injertos de otra procedencia.

# CONCLUSIONES

1. La diferenciación de células troncales derivadas de la grasa (ADMSC) antes de su implante favorece la regeneración ósea de defectos cavitarios en el fémur de la oveja Asaaf. Sin embargo, cuando se implantan conjuntamente con plasma rico en plaquetas (PRP) y heteroinjerto la respuesta no es mayor, pudiendo incluso dificultar la incorporación del heteroinjerto.
2. La técnica de obtención de células troncales derivadas de la grasa y su diferenciación a fenotipos osteogénicos es factible en nuestro medio y permite disponer de éstas para uso clínico.
3. La creación de defectos cavitarios en el cóndilo femoral interno de ovejas de raza Asaaf a través del vasto medial para estudios experimentales es una técnica sencilla y reproducible.
4. El gel de plasma rico en plaquetas es un excelente vector para el transporte de células troncales derivadas de la grasa diferenciadas a osteogénicas para su aplicación clínica.
5. En el control de la regeneración ósea de defectos cavitarios a partir de células troncales derivadas de la grasa y diferenciadas a fenotipos osteogénicos, la radiografía simple no parece un método fiable de evaluación a las 12 semanas. La histomorfometría, por el contrario, permite realizar mediciones cuantitativas y cualitativas en el defecto óseo para su posterior interpretación, siendo una prueba más fiable en la evaluación de la regeneración ósea.
6. En relación con la aplicación clínica del estudio, de forma preliminar puede inferirse que la obtención de células madre a partir de la grasa para diferenciar a partir de ellas células osteogénicas podría suponer una escasa morbilidad para el donante y disponibilidad casi ilimitada, siendo necesario implantarlas con un material osteoconductor que sirva de soporte físico. Con la duda de si interfieren en la incorporación del heteroinjerto, que precisa de estudios adicionales, el plasma rico en plaquetas podría ser su mejor vehículo.

# BIBLIOGRAFÍA



1. Gartner L, Hiatt J. In: McGraw H, ed. *Histologia*. 1 ed. Mexico: Panamericana, 2008: 112-31.
2. Ross M, Reith E, Romrell L. In: Ross M, Reith E, Romrell L, eds. *Histología*. 2 ed. Buenos Aires: Panamericana, 1992: 147-82.
3. Fridez, P. Modélisation de l'adaptation osseuse externe. 1996. Laussane, Physics department. Ref Type: Thesis/Dissertation
4. Gurley A, Roth S. In: Stenberg S, ed. *Histology for pathologists*. 1 ed. New York: Raven Press, 1992: 61-80.
5. Klein J, Bonewald L. In: Bilezikian J, Raisz L, Martin j, eds. *Principles of bone biology*. 3 ed. Oxford: Elsevier, 2008: 153-74.
6. Kalervo H, Zhao H. In: Bilezikian J, Raisz L, Martin j, eds. *Principles of bone biology: Biology and Mechanisms*. 3 ed. Oxford: Elsevier, 2008: 153-74.
7. Hill PA. Bone remodelling. *Br.J.Orthod*. 1998;**25**:101-7.
8. Netter F. In: Dingle R, ed. *Sistema musculo esquelético*. 1 ed. Barcelona: Masson, 2001: 147-92.
9. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J.Bone Joint Surg.Am*. 2002;**84-A**:454-64.
10. Piza, G. Clavos de fijación externa recubiertos de hidroxapatita. Estudio clínico en alargamiento de extremidades. 2001. Universidad Autónoma de Barcelona. Ref Type: Thesis/Dissertation
11. Carson JS, Bostrom MP. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* 2007;**38 Suppl 1**:S33-S37.
12. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;**36 Suppl 3**:S20-S27.
13. Nather N. In: Philips O, ed. *Bone biology and healing*. 1 ed. Singapore: World Scientific, 2003: 47-67.
14. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG *et al*. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin.Orthop.Relat Res*. 1996;300-9.
15. Kay F. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of tissue engineering*. 3 ed. Oxford: Elsevier, 2007: 1225-36.
16. Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts : a clinicopathological study. *J.Bone Joint Surg.Am*. 2001;**83-A**:971-86.
17. De LW, Jr., Einhorn TA, Koval K *et al*. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J.Bone Joint Surg.Am*. 2007;**89**:649-58.

18. Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. *Clin.Orthop.Relat Res.* 2002;11-22.
19. Shors E. In: Shors E, ed. *Bone graft substitutes*. ASTM International, 2003: 271-88.
20. Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin.Orthop.Relat Res.* 1983;246-52.
21. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J.Bone Joint Surg.Am.* 2002;**84-A**:1032-44.
22. del Real RP, Ooms E, Wolke JG *et al.* In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J.Biomed.Mater.Res.A* 2003;**65**:30-6.
23. Fleming JE, Jr., Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop.Clin.North Am.* 2000;**31**:357-74.
24. Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop.Clin.North Am.* 2000;**31**:389-98.
25. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002;**25**:s601-s609.
26. Larsson S, Bauer TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin.Orthop.Relat Res.* 2002;23-32.
27. Zimmermann R, Gabl M, Lutz M *et al.* Injectable calcium phosphate bone cement Norian SRS for the treatment of intra-articular compression fractures of the distal radius in osteoporotic women. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 2003;**123**:22-7.
28. Cassidy C, Jupiter JB, Cohen M *et al.* Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study. *J.Bone Joint Surg.Am.* 2003;**85-A**:2127-37.
29. Kopylov P, Runnqvist K, Jonsson K *et al.* Norian SRS versus external fixation in redisplaced distal radial fractures. A randomized study in 40 patients. *Acta Orthop Scand.* 1999;**70**:1-5.
30. Lobenhoffer P, Gerich T, Witte F *et al.* Use of an injectable calcium phosphate bone cement in the treatment of tibial plateau fractures: a prospective study of twenty-six cases with twenty-month mean follow-up. *J.Orthop.Trauma* 2002;**16**:143-9.
31. Horstmann WG, Verheyen CC, Leemans R. An injectable calcium phosphate cement as a bone-graft substitute in the treatment of displaced lateral tibial plateau fractures. *Injury* 2003;**34**:141-4.

32. Goodman SB, Bauer TW, Carter D *et al.* Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment. Laboratory and initial clinical results. *Clin.Orthop.Relat Res.* 1998;42-50.
33. Mattsson P, Larsson S. Stability of internally fixed femoral neck fractures augmented with resorbable cement. A prospective randomized study using radiostereometry. *Scand.J.Surg.* 2003;92:215-9.
34. Schildhauer TA, Bauer TW, Josten C *et al.* Open reduction and augmentation of internal fixation with an injectable skeletal cement for the treatment of complex calcaneal fractures. *J.Orthop.Trauma* 2000;14:309-17.
35. Bucholz RW, Carlton A, Holmes RE. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop.Clin.North Am.* 1987;18:323-34.
36. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clin.Orthop.Relat Res.* 1992;291-8.
37. Gosain AK, Song L, Riordan P *et al.* A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast.Reconstr.Surg.* 2002;109:619-30.
38. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA *et al.* Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J.Biomed.Mater.Res.* 2002;63:115-21.
39. Bostman O, Pihlajamaki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* 2000;21:2615-21.
40. Kinnunen I, Aitasalo K, Pollonen M *et al.* Reconstruction of orbital floor fractures using bioactive glass. *J.Craniomaxillofac.Surg.* 2000;28:229-34.
41. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin.Orthop.Relat Res.* 2002;66-80.
42. Forriol F, Esperanza R. Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica. *Trauma Fund Mapfre* 2008;19:88-101.
43. Drosse I, Volkmer E, Capanna R *et al.* Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 2008;39 Suppl 2:S9-20.
44. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 1966;16:381-90.
45. Flores-Figueroa E, Montesinos J, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev investigación clínica* 2006;58:498-511.

46. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS *et al.* Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin.Orthop.Relat Res.* 1998;S247-S256.
47. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005;**36 Suppl 3**:S8-S12.
48. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N.Engl.J.Med.* 2006;**355**:1253-61.
49. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J.Bone Joint Surg.Am.* 2004;**86-A**:1541-58.
50. Chen F, Song L, Mauck R *et al.* In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of tissue engineering*. 3 ed. Oxford: Elsevier, 2007: 823-43.
51. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat.Cell Biol.* 2001;**3**:778-84.
52. Galli R, Borello U, Gritti A *et al.* Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat.Neurosci.* 2000;**3**:986-91.
53. Prosper F. Celulas madra adulta. *Cardiovascular risk factors* 2004;**13**:11-8.
54. Kakar S, Einhorn T. In: Friedlander G, Mankin H, Goldberg V, eds. *Injertos y sustitutos óseos*. 1 ed. Barcelona: Ars medica, 2008: 23-35.
55. Mundlos S, Otto F, Mundlos C *et al.* Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997;**89**:773-9.
56. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;**102**:3483-93.
57. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT *et al.* Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J.Cell Sci.* 1991;**99 ( Pt 1)**:131-9.
58. Bianco P, Costantini M, Dearden LC *et al.* Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br.J.Haematol.* 1988;**68**:401-3.
59. Chamberlain G, Fox J, Ashton B *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;**25**:2739-49.
60. Mansilla E, Marin GH, Drago H *et al.* Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant.Proc.* 2006;**38**:967-9.
61. Ramirez M, Lucia A, Gomez-Gallego F *et al.* Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *Br.J.Sports Med.* 2006;**40**:719-22.

62. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A *et al.* Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 2006;**24**:2202-8.
63. Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006;**108**:3938-44.
64. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol.Biosci.* 2004;**4**:743-65.
65. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C *et al.* Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008;**45**:115-20.
66. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J.Bone Joint Surg.Am.* 1997;**79**:1699-709.
67. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA *et al.* Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J.Orthop.Res.* 2001;**19**:117-25.
68. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**:143-7.
69. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000;**251**:3-11.
70. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found.Symp.* 1988;**136**:42-60.
71. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp.Hematol.* 1974;**2**:83-92.
72. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;**13**:69-80.
73. Pountos I, Corcadden D, Emery P *et al.* Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 2007;**38** **Suppl 4**:S23-S33.
74. Beata, N. In vivo bone formation using adipose derived stromal stem cells. The hystomorphometry of the ovine defecto model. 2003. Sidney, The University of New South Walles Sidney. Ref Type: Thesis/Dissertation
75. Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 2006;**27**:6052-63.

76. Strem BM, Hicok KC, Zhu M *et al.* Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J.Med.* 2005;**54**:132-41.
77. Hsu WK, Wang JC, Liu NQ *et al.* Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model. *J.Bone Joint Surg.Am.* 2008;**90**:1043-52.
78. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;**7**:211-28.
79. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol.Biol.Cell* 2002;**13**:4279-95.
80. Tapp H, Hanley EN, Patt JC *et al.* Adipose-Derived Stem Cells: Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2008.
81. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J.Cell Physiol* 1989;**140**:530-7.
82. Nash TJ, Howlett CR, Martin C *et al.* Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 1994;**15**:203-8.
83. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;**150**:893-9.
84. Cheng H, Jiang W, Phillips FM *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J.Bone Joint Surg.Am.* 2003;**85-A**:1544-52.
85. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007;**38 Suppl 4**:S3-S6.
86. Vacanti J, Vacanti C. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of tissue engineering*. 13 ed. Oxford: Elsevier, 2007: 3-6.
87. Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S *et al.* The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin.Orthop.Relat Res.* 2001;42-50.
88. Petruskevicius J, Nielsen S, Kaalund S *et al.* No effect of Osteoset, a bone graft substitute, on bone healing in humans: a prospective randomized double-blind study. *Acta Orthop.Scand.* 2002;**73**:575-8.
89. Meadows GR. Adjunctive use of ultraporous beta-tricalcium phosphate bone void filler in spinal arthrodesis. *Orthopedics* 2002;**25**:s579-s584.
90. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin.Orthop.Relat Res.* 1995;8-18.
91. Hernigou P, Manicom O, Poignard A *et al.* Core decompression with marrow stem cells. *Operative Tech Orthop* 2004;**14**:68.

92. Goel A, Sangwan SS, Siwach RC *et al.* Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury* 2005;**36**:203-6.
93. Gan Y, Dai K, Zhang P *et al.* The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials* 2008;**29**:3973-82.
94. Jager M, Jelinek EM, Wess KM *et al.* Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr.Stem Cell Res.Ther.* 2009;**4**:34-43.
95. Huard J. Regenerative medicine based on muscle stem cells. *J.Musculoskelet.Neurol.Interact.* 2008;**8**:337.
96. Giannoudis PV, Tzioupis C, Green J. Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) system. *Injury* 2009;**40**:1231-6.
97. Miao Z, Jin J, Chen L *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol.Int.* 2006;**30**:681-7.
98. Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA, Jr. *et al.* Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004;**22**:1263-78.
99. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z *et al.* Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006;**24**:150-4.
100. Kern S, Eichler H, Stoeve J *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;**24**:1294-301.
101. Van den Bogaerdt AJ, van Zuijlen PP, van GM *et al.* The suitability of cells from different tissues for use in tissue-engineered skin substitutes. *Arch.Dermatol.Res.* 2002;**294**:135-42.
102. Safford KM, Hicok KC, Safford SD *et al.* Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2002;**294**:371-9.
103. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR *et al.* Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J.Orthop.Res.* 2003;**21**:622-9.
104. Wu L, Wu Y, Lin Y *et al.* Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix. *Mol.Cell Biochem.* 2007;**301**:83-92.
105. Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast.Reconstr.Surg.* 2006;**117**:1462-70.

106. Guerado E, Diaz-Martina A, Arrabal M *et al.* Células madre e ingeniería tisular ósea. Bases celulares y perspectivas terapéuticas. *Rev Ortop Traumatol* 2003;**47**:362-74.
107. Mazzolini G, Ruiz J, Prieto J. Posibilidades de la terapia génica en el sistema musculoesquelético. *Rev Ortop Traumatol* 2005;**49**:202-13.
108. Castillo F, Suso S, Fernández de Retama P. Evaluación del potencial osteogénico de los polímeros bioabsorbibles derivados del ácido láctico utilizados como sustitutos óseos. *Rev Ortop Traumatol* 2003;**47**:428-33.
109. Meseguer-Olmo L, Muñoz-Ruiz J, Bernabeu-Escalpez A *et al.* Cinética de crecimiento in vivo de osteoblastos humanos sobre cerámica porosa de hidroxiapatita. *Rev Ortop Traumatol* 2006;**50**:224-32.
110. Lax A, Meseguer-Olmo L, Vicente V *et al.* Respuesta ósea al implante de espuma de hidroxiapatita (HA-02). Estudio experimental en conejos. *Rev Ortop Traumatol* 2005;**49**:293-300.
111. Suarez M, Murcia A, Vicente J *et al.* Utilización de la capacidad de calcificación y osificación de la pared arterial para conseguir regeneración ósea completa en defectos. *Rev Ortop Traumatol* 2005;**49**:450-62.
112. Sancho R, Valera M, Farre J *et al.* Viabilidad celular en un aloinjerto de hueso esponjoso humano crioconservado. *Rev Ortop Traumatol* 2008;**52**:27-31.
113. Leniz P, Forriol F. Estudio de la incorporación de tres tipos de hueso esponjoso (autoinjerto, aloinjerto congelado y liofilizado). *Rev Ortop Traumatol* 1999;**43**:300-4.
114. Mora G, Alvarez E, Ozteica C *et al.* Análisis microbiológico e histomorfométrico de la interfaz clavo-hueso en diferentes clavos de fijación externa (acero, titiano y recubiertos de plata). *Rev Ortop Traumatol* 2001;**3**:245-50.
115. Frias A, Val F, Buelta J *et al.* Parámetros histomorfométricos óseos normales en una población adulta española. *Rev Ortop Traumatol* 1999;**43**:9026-30.
116. Clouet J, Vinatier C, Merceron C *et al.* The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering. *Joint Bone Spine* 2009;**76**:614-8.
117. Waese EY, Kandel RA, Stanford WL. Application of stem cells in bone repair. *Skeletal Radiol.* 2008;**37**:601-8.
118. Minamide A, Yoshida M, Kawakami M *et al.* The use of cultured bone marrow cells in type I collagen gel and porous hydroxyapatite for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976.)* 2005;**30**:1134-8.
119. Panetta N, Gupta D, Cuatro N *et al.* Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med* 2009;**51**:25-41.



120. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C *et al.* Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J.Cell Sci.* 1992;**102** ( Pt 2):341-51.
121. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A *et al.* Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues.Organs* 2003;**174**:101-9.
122. Planat-Benard V, Menard C, Andre M *et al.* Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ.Res.* 2004;**94**:223-9.
123. Zhao LR, Duan WM, Reyes M *et al.* Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp.Neurol.* 2002;**174**:11-20.
124. Hernandez I, Lumbreras B, Rebagliato M *et al.* In: Piedrola G, ed. *Medicina preventiva y salud publica.* 11 ed. Barcelona: Elsevier, 2008: 96-108.
125. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop.Clin.North Am.* 1987;**18**:213-25.
126. Serrano S, Mariñoso M. In: Serrano S, Aubia J, Mariñoso M, eds. *Patología ósea metabólica.* 1 ed. Barcelona: Doyma, 1990: 71-89.
127. Ranly DM, McMillan J, Keller T *et al.* Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J.Bone Joint Surg.Am.* 2005;**87**:2052-64.
128. Walsh WR, Morberg P, Yu Y *et al.* Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. *Clin.Orthop.Relat Res.* 2003;228-36.
129. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ *et al.* Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials* 2006;**27**:1817-23.
130. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR *et al.* Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr.Course Lect.* 1996;**45**:371-86.
131. Behairy Y, Jasty M. Bone grafts and bone substitutes in hip and knee surgery. *Orthop.Clin.North Am.* 1999;**30**:661-71.
132. Foruria de Diedo A, Gil-Garay E, Munuera L. Tratamiento de las fracturas de huesos largos en pacientes politraumatizados. *Rev Ortop Traumatol* 2005;**49**:307-16.
133. Soucacos PN, Johnson EO, Babis G. An update on recent advances in bone regeneration. *Injury* 2008;**39 Suppl 2**:S1-S4.
134. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous none; an analysis of factors leading to

- osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J.Bone Joint Surg.Br.* 1964;**46**:110-40.
135. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 2007;**28**:4240-50.
136. Woolf AD, Pflieger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull.World Health Organ* 2003;**81**:646-56.
137. Hoyt D, Meredith J. *ATLS*. 7 ed. Chicago: American College of Surgeons, 2007.
138. Lidgren L. The bone and joint decade 2000-2010. *Bull.World Health Organ* 2003;**81**:629.
139. Goldberg, V. M. and Akhavan, M. Biología de los injertos óseos. Friedlander, G, Mankin, H, and Goldberg, V. M. 1, 1-9. 2008. Ars medica.
140. Phemister B. Treatment of ununited fractures by onlay bone grafts without screw or tie fixation and without breaking down of the fibrous union. *J.Bone Joint Surg.Am.* 1947;**29**:946-60.
141. Ohishi M, Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells. *J.Cell Biochem.* 2010;**109**:277-82.
142. Petrakova KV, Tolmacheva AA, Friedenstein AI. Bone formation occurring in bone marrow transplantation in diffusion chambers. *Biull.Eksp.Biol.Med* 1963;**56**:87-91.
143. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;**3**:393-403.
144. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J.Orthop Res.* 1991;**9**:641-50.
145. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin.Plast.Surg.* 1994;**21**:429-35.
146. Follmar KE, Prichard HL, Decroos FC *et al.* Combined bone allograft and adipose-derived stem cell autograft in a rabbit model. *Ann.Plast.Surg.* 2007;**58**:561-5.
147. Peterson B, Zhang J, Iglesias R *et al.* Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng* 2005;**11**:120-9.
148. Yoon E, Dhar S, Chun DE *et al.* In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 2007;**13**:619-27.

149. Hui JH, Li L, Teo YH *et al.* Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng* 2005;**11**:904-12.
150. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M *et al.* Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif.Tissue Int.* 2008;**82**:238-47.
151. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M *et al.* Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J.Bone Joint Surg.Br.* 2003;**85**:740-7.
152. Anitua E, Sanchez M, Orive G *et al.* The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007;**28**:4551-60.
153. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P *et al.* Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J.Craniomaxillofac.Surg.* 2004;**32**:370-3.
154. Kunisaki S, Fauza D. In: Lanza R, Langer R, Vacanti C, eds. *Tissue engineering*. 3 ed. Oxford: Elsevier, 2007: 1189-200.
155. Griffin XL, Smith CM, Costa ML. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury* 2009;**40**:158-62.
156. Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials* 2009;**30**:4956-66.
157. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR *et al.* Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J.Orthop.Res.* 2003;**21**:622-9.
158. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegel ME *et al.* The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 2009;**30**:2149-63.
159. Kruyt MC, Dhert WJ, Oner FC *et al.* Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell-based tissue-engineered constructs in goats. *Biomaterials* 2007;**28**:1798-805.
160. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh DB *et al.* Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2006;**342**:902-8.
161. Martinez-Lorenzo MJ, Royo-Canas M, egre-Aguaron E *et al.* Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *J.Orthop.Res.* 2009;**27**:1499-507.
162. Nuss KM, Auer JA, Boos A *et al.* An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC.Musculoskelet.Disord.* 2006;**7**:67.

163. Maatz R, Lentz W, Graf R. Spongiosa test of bone grafts for transplantation. *J.Bone Joint Surg.Am.* 1954;**36-A**:721-31.
164. Katthagen B. *Bone regeneration with bone substitutes. An animal study.* 1 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1986.
165. Dominici M, Le BK, Mueller I *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;**8**:315-7.
166. Matsumoto D, Shigeura T, Sato K *et al.* Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates. *Plast.Reconstr.Surg.* 2007;**120**:1510-7.
167. Song HY, Jeon ES, Kim JI *et al.* Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J.Cell Biochem.* 2007;**101**:1238-51.
168. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum.* 2006;**54**:1222-32.
169. Hedberg EL, Kroese-Deutman HC, Shih CK *et al.* Methods: a comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2005;**11**:1356-67.
170. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2002;**60**:1176-81.
171. Hatakeyama M, Beletti ME, Zanetta-Barbosa D *et al.* Radiographic and histomorphometric analysis of bone healing using autogenous graft associated with platelet-rich plasma obtained by 2 different methods. *Oral Surg.Oral Med Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2008;**105**:e13-e18.
172. Niemeyer P, Fechner K, Milz S *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2010;**31**:3572-9
173. Kon E, Muraglia A, Corsi A *et al.* Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J.Biomed.Mater.Res.* 2000;**49**:328-37.
174. Borden M, Attawia M, Khan Y *et al.* Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *J.Bone Joint Surg.Br.* 2004;**86**:1200-8.
175. Dallari D, Fini M, Stagni C *et al.* In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J.Orthop Res.* 2006;**24**:877-88.
176. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A *et al.* Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin.Orthop Relat Res.* 2005;62-8.

177. Yamada Y, Ueda M, Naiki T *et al.* Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004;**10**:955-64.
178. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S *et al.* Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. *J.Orthop Res.* 2004;**22**:653-8.
179. Roldan JC, Jepsen S, Miller J *et al.* Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone* 2004;**34**:80-90.
180. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT *et al.* New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* 2006;**24**:227-34.
181. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY *et al.* Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 2005;**34**:420-4.
182. Graziani F, Ivanovski S, Cei S *et al.* The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin.Oral Implants.Res.* 2006;**17**:212-9.
183. Weibrich G, Hansen T, Kleis W *et al.* Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004;**34**:665-71.
184. Tsay RC, Vo J, Burke A *et al.* Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2005;**63**:521-8.
185. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM *et al.* Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg.Oral Med Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 1998;**85**:638-46.
186. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S *et al.* De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2004;**25**:5387-93.
187. Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P *et al.* Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin.Oral Implants.Res.* 2004;**15**:187-93.
188. Jakse N, Tangl S, Gilli R *et al.* Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin.Oral Implants.Res.* 2003;**14**:578-83.
189. Plachokova AS, van den DJ, van den Beucken JJ *et al.* Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 2009;**38**:861-9.
190. Mooren RE, Merckx MA, Bronkhorst EM *et al.* The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 2007;**36**:626-31.

191. Suba Z, Takacs D, Gyulai-Gaal S *et al.* Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. *Int.J.Oral Maxillofac.Implants.* 2004;**19**:832-8.
192. Cui L, Liu B, Liu G *et al.* Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* 2007;**28**:5477-86.
193. Shi YY, Nacamuli RP, Salim A *et al.* The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast.Reconstr.Surg.* 2005;**116**:1686-96.
194. Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT *et al.* Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J.Craniofac.Surg.* 2002;**13**:111-21.
195. Ueki K, Takazakura D, Marukawa K *et al.* The use of polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and gelatin sponge complex containing human recombinant bone morphogenetic protein-2 following condylectomy in rabbits. *J.Craniomaxillofac.Surg.* 2003;**31**:107-14.
196. Kubler N, Michel C, Zoller J *et al.* Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. *J.Craniomaxillofac.Surg.* 1995;**23**:337-46.
197. Shang Q, Wang Z, Liu W *et al.* Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J.Craniofac.Surg.* 2001;**12**:586-93.
198. Yuan J, Cui L, Zhang WJ *et al.* Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2007;**28**:1005-13.
199. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS *et al.* Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 2004;**10**:371-80.