

INVESTIGACIÓN

2009

PRESENCIA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN MÉDULA ÓSEA. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE CRESTA ILÍACA, METÁFISIS DISTAL DE FÉMUR Y METÁFISIS PROXIMAL DE TIBIA

FUNDACIÓN **MAPFRE**

www.fundacionmapfre.com

Investigador Principal

Francisco Javier Vaquero Martín

Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología HGU
Gregorio Marañón, Madrid

Equipo Investigador

Cristina López Pascua

Diplomado en Fisioterapia
Directora. Centro de Tratamiento de la Lesión Cerebral. (LESCER), Madrid

Fernández Santos ME

Laboratorio de Terapia Celular. HGU
Gregorio Marañón, Madrid

Francisco Javier Narbona Cárceles

Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología HGU
Gregorio Marañón, Madrid

Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MATERIAL Y MÉTODOS	4
2.1. Técnica de aspirado medular	4
2.2. Procesado de las muestras en laboratorio para identificación y expansión de las MSC	5
2.3. Protocolo para identificación de MSC	5
2.4. Diferenciación de las MSCs hacia grasa, hueso y cartílago	5
3. RESULTADOS	5
4. DISCUSIÓN	6
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
6. ANEXOS	9
6.1. ANEXO I. Modelo de consentimiento informado para aceptación de inclusión en el estudio	9
6.2. ANEXO II. Tablas y figuras	11
6.3. ANEXO III TABLA DE RECOGIDA DE DATOS Tabla general, no se incluyen las tablas preparadas para importación al programa de análisis estadístico ni con datos no analizados. TABLAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13

1. INTRODUCCIÓN

La terapia mediante células madre ha cobrado un gran interés en todos los campos de la medicina. Cada vez son más los investigadores que tratan de encontrar nuevas fuentes o mejorar los procedimientos para la obtención de muestras que permitan obtener el número suficiente de células que requieren estos tratamientos.

La obtención de muestras generalmente supone un proceso invasivo en mayor o menor medida, aunque en algunos casos pueden obtenerse a partir de determinados productos de desecho (placenta, cordón umbilical, grasa procedente de liposucción). Tradicionalmente la fuente más utilizada para la obtención de células madre adultas es el aspirado de médula ósea, donde se encuentran predominantemente dos tipos de células troncales: Células madre hematopoyéticas (HSC) y células madre mesenquimales (MSC).

Éstas últimas son las más usadas en terapia por su facilidad de identificación y expansión en cultivo, multipotencialidad y efectos sobre el microambiente que las rodea (inmunomodulación, efectos paracrinos)¹. Estas características les proporcionan propiedades reparadoras y regenerativas de los tejidos dañados donde han sido implantadas.

Friedenstein y Owen² fueron los primeros en describir este tipo de células derivadas de la médula ósea. Desde entonces ha existido una gran confusión entre los investigadores en cuanto a la nomenclatura y propiedades de estas células.

Inicialmente fueron descritas como unidades de fibroblastos formadores de colonias (CFU-F), con capacidad de adherencia al plástico y actividad osteogénica *in vitro*. Posteriormente se observó que estas células tenían capacidad clonogénica y de diferenciación a otros tejidos del mesodermo (músculo, tendón, cartilago, grasa) y con capacidad *in vitro* para diferenciarse a células del endodermo y ectodermo, por lo que surgió el concepto de células madre mesenquimales (MSC)³. El grupo de células adherentes al plástico procedentes de médula ósea es heterogéneo y no todas presentan las características requeridas para ser consideradas células madre multipotentes⁴.

Recientemente la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha descrito los criterios mínimos que debe cumplir una célula para ser considerada MSC⁵ (adherencia al plástico, expresión o carencia de determinados antígenos de superficie, capacidad de expansión *in vitro* y diferenciación hacia grasa, cartilago y hueso).

Por tanto las células de médula ósea adherentes al plástico, capaces de generar colonias, deben ser denominadas "células mesenquimales estromales multipotentes", reservando el término "célula madre mesenquimal" únicamente para aquellas con capacidad de diferenciación a grasa, hueso y cartilago⁴.

La punción-aspiración de la cresta ilíaca permite obtener una gran cantidad de muestra de buena calidad. No obstante la técnica para punción requiere personal entrenado y no está exenta de posibles complicaciones. Otras localizaciones más accesibles y con menor riesgo poten-

cial es la esponjosa de las metáfisis alrededor de la rodilla, aunque no existen estudios que indiquen claramente la presencia y características de las MSCs a dicho nivel.

Basándonos en estas observaciones realizamos un estudio prospectivo, no randomizado, comparando las muestras de aspirado de médula ósea en un grupo de pacientes sometidos a una intervención de prótesis total de rodilla. En el contexto de la cirugía se extrajeron a cada paciente muestras de tres localizaciones distintas: cresta ilíaca, metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia, analizando las muestras y comparando sus características entre sí.

El objetivo de este estudio es demostrar la presencia de MSCs en la médula ósea de las metáfisis distal de fémur y proximal de la tibia; que se encuentran a una concentración similar que en la cresta ilíaca; así como que éstas células poseen las mismas características de expansión y multipotencialidad.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Tras la aprobación del comité de ética de nuestro centro, se incluyó en el estudio a aquellos pacientes que no mostraban ninguno de los criterios de exclusión y que dieron su consentimiento informado para su participación en el estudio.

En total participaron 23 pacientes. De ellos, 3 han sido eliminados del estudio por presentar criterios de exclusión. En otros 3 pacientes se extrajeron las muestras con la isquemia ya aplicada ya sobre el miembro por lo que las muestras procedentes de fémur y tibia en estos pacientes no han sido incluidas en el estudio. En un caso no se obtuvo médula ósea de tibia al realizar el aspirado por causa desconocida.

El motivo de realizar el estudio en el contexto de una cirugía de prótesis total de rodilla es minimizar la iatrogenia aprovechando el tipo de anestesia, el área anatómica y las condiciones de esterilidad requeridas para la intervención.

Los criterios de exclusión empleados son: la no obtención de consentimiento informado, edad mayor de 75 años, tratamiento con citostáticos o corticoides, alcoholismo, presencia de lesiones dérmicas en extremidades inferiores, radioterapia previa afectando a pelvis o rodilla, infección activa, anemia (Hb < 10.0 gr/dL), leucopenia (Leucocitos < 4000/mm³), o procesos tumorales activos.

2.1. Técnica de aspirado medular

Las muestras son tomadas en quirófano siempre por el mismo investigador, con el paciente en decúbito supino bajo anestesia epidural y según técnica estéril. El proceso se realiza en los instantes previos al comienzo de la cirugía y antes de aplicar isquemia sobre el miembro.

Para realizar el aspirado de médula ósea empleamos un trócar de 11' canulado con orificios laterales y conexión tipo Lúer-Lock (Synthes®) (Figura 1).

En primer lugar realizamos la punción-aspiración sobre cresta ilíaca. Ésta se realiza sobre la cresta del mismo lado a intervenir, realizando la entrada en un punto situado aproximadamente a 5 cm. posteriores a la espina ilíaca anterosuperior, dirigiendo la punta del trócar hacia el espesor del ilíaco.

A continuación se realiza la punción de la metáfisis distal del fémur. Ésta se realiza en la cara anterior de la rodilla, en el punto inmediatamente proximal al polo superior de la rótula, inclinando la aguja unos 30° en dirección caudal (Figura 2).

Por último se punciona la tibia. La entrada se realiza a nivel de la tuberosidad tibial anterior en dirección paralela al plano articular.

Los puntos de inserción en fémur y tibia se realizan en línea con la incisión de piel programada para la artroplastia.

Se realizó aspirado de médula ósea de cada localización, variando la orientación y profundidad del trócar por cada 2 mL. aspirados para prevenir dilución de la muestra y contaminación con sangre periférica⁶.

En determinados pacientes se extrajo una mayor cantidad de aspirado de M.O de cresta ilíaca para otros estudios, previo consentimiento del paciente.

El proceso no modifica en absoluto la técnica quirúrgica programada.

Las muestras del aspirado son recogidas en tubos heparinizados (Heparina 1%, 1 ml. por cada 10 ml. de médula ósea) y etiquetadas. A continuación son transportadas inmediatamente al laboratorio de terapia celular de nuestra institución para su procesamiento y análisis por parte del personal de dicho departamento.

2.2. Procesado de las muestras en laboratorio para identificación y expansión de las MSC.

Se realiza filtrado, hemograma y citometría preliminares de las muestras para confirmar que la muestra procede de médula ósea y no se encuentra contaminada por sangre periférica.

Se realiza una selección de las células mononucleadas mediante separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque®. La muestra resultante se somete a lavados y choque osmótico para eliminar restos celulares no deseados⁷.

A continuación se hace un recuento de las células mononucleadas viables en cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripán.

La muestra de CMNs se planta en frascos de cultivo con suelo de plástico en un medio apto para la expansión de MSCs compuesto por DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado con glutamato, FBS (Suero bovino fetal) al 10%, Penicilina al 1% y Estreptomicina al 1%.

Las muestras se mantienen a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂ y humedad del 90% en la incubadora realizando cambio del medio cada 3 días. Si la expansión celular provoca una confluencia del 80-90% de la superficie del frasco de cultivo, se resuspende mediante tripsinización y se divide para no frenar el crecimiento celular⁸.

Una medida de seguridad empleada para evitar la aparición de células con mutaciones no deseadas es limitar el tiempo de cultivo de las muestras a 6 semanas, o en caso de expansión rápida un máximo de 4 pases⁹.

En caso de observar mala evolución del cultivo (senescencia, células no adheridas al plástico, muerte celular) éste es desechado, lo que se considera como fracaso del cultivo en el análisis de los resultados.

2.3. Protocolo para identificación de MSC.

El protocolo para identificación de MSCs en las muestras de aspirado de médula ósea se realiza mediante citometría de flujo (FACS).

En el estudio se utilizaron marcadores con fluorocromos para la detección de los siguientes antígenos de membrana: CD106, CD117, CD105, CD3, CD90, VEGF, CD31, CD73, CD14, CD71, CD34, CD45, HLA-DR, CD184, CD271, CD133 y CD19.

La organización de la batería de marcadores de inmunofluorescencia se indica en la figura 1.

El análisis se realiza empleando un citómetro *FACScalibur* usando el programa informático *CellQuest Pro* para la visualización de los resultados.

2.4. Diferenciación de las MSCs hacia grasa, hueso y cartílago

Se induce la diferenciación de las MSCs mediante su incubación en medios específicos para ello.

En este estudio hemos empleado medios comerciales para la diferenciación hacia grasa¹⁴ (*NH Adipodiffmedium*), cartílago^{15, 16} (*NH Chondrodifffmedium*) y hueso^{17, 15, 18} (*NH Osteodifffmedium*) de la casa *MiltenyiBiotec*, a los que se ha añadido Penicilina al 1% y Estreptomicina al 1% para evitar colonización bacteriana de las muestras.

El tiempo de incubación para la diferenciación osteogénica es de 10 días, para la diferenciación hacia grasa 21 días y hacia cartílago de 24 días. El proceso de diferenciación termina con la tinción de las muestras y su visualización al microscopio para la detección de osteoblastos, condrocitos y adipocitos.

La detección de adipocitos se realizó mediante tinción con *Oil Red O*, la detección de condrocitos mediante Azul de Toluidina y la de osteoblastos mediante Rojo de Alizarina, según las técnicas habituales.

3. RESULTADOS

En total participaron 23 pacientes. De ellos, 3 han sido eliminados del estudio por presentar criterios de exclusión. En otros 3 pacientes se extrajeron las muestras con la isquemia ya aplicada ya sobre el miembro por lo que las muestras procedentes de fémur y tibia en estos pacientes no han sido incluidas en el estudio. En un caso no se obtuvo médula ósea de tibia al realizar el aspirado por causa desconocida. Tras las pérdidas quedan en el estudio 20

pacientes (20 aspirados de cresta ilíaca, 17 de fémur y 16 de tibia), 4 varones y 16 mujeres con edades comprendidas entre 64 y 75 años (media 70,9 años).

Macroscópicamente las muestras obtenidas a partir de fémur y tibia presentan una menor densidad y color más claro que las procedentes de cresta ilíaca. En las dos primeras se observa un sobrenadante de grasa más importante en las muestras de fémur que fue necesario eliminar previo a la filtración de las muestras (Figura 3).

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.0 (IBM statistics) utilizando el test de Wilcoxon para la comparación de datos.

La concentración de células mononucleadas por mililitro obtenida en las diferentes muestras fue una media de $10,05 \times 10^6$ CMNs/mL en Cresta ilíaca, $6,7 \times 10^5$ CMNs/mL en Fémur y $1,7 \times 10^6$ CMNs/mL en tibia, con una viabilidad celular del 90, 95%, 81,18% y 83,63% respectivamente.

El número final de células madre mesenquimales obtenidas tras cultivo fue una mediana de $5,95 \times 10^5$ células para cresta, $2,90 \times 10^5$ para fémur y $3,25 \times 10^5$ para tibia, con un tiempo de cultivo medio de 40 días para cresta, 34,2 días para fémur y 31,88 días para tibia.

El éxito o fracaso del cultivo celular se midió considerando como fracaso de un cultivo aquellas muestras que se desecharon por no presentar expansión ni crecimiento celular o muestras en que fue imposible obtener aspirado medular, y considerando éxito aquellas muestras cuyo proceso se completó satisfactoriamente hasta el final. La media de éxito de los cultivos para cresta fue del 90%, 71% para fémur y 47% para tibia.

Considerando la médula ósea de cresta ilíaca como el "Gold Standard" realizamos análisis no paramétricos mediante el test de Wilcoxon comparando las muestras de fémur y tibia con la cresta y respectivamente entre sí.

Los parámetros de relevancia analizados fueron: Concentración y viabilidad de las CMNs y número total y viabilidad de MSCs al final del cultivo.

Las diferencias fueron estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de CMNs, siendo claramente superior la cresta ilíaca ($P < 0,01$), sin existir diferencias entre el fémur y la tibia. La viabilidad de éstas células mononucleadas fue también significativamente superior en cresta ilíaca.

No hubo diferencias en cuanto al número de MSCs obtenidas al final del proceso de cultivo y expansión entre las tres localizaciones. La viabilidad de estas células fue superior en cresta ilíaca aunque sin alcanzar significación estadística, y sin diferencias al comparar las otras dos localizaciones entre sí.

Las tinciones tras el cultivo en medios de específicos para diferenciación mostraron la presencia de adipocitos, osteoblastos y condrocitos en todas las muestras cultivadas (Figura 4).

El proceso para la extracción de las muestras de fémur y tibia fue sencillo, localizando las referencias anatómicas para la punción fácilmente en todos los casos incluso en pacientes obesos. No hubo complicaciones en

ninguno de los casos y la cirugía programada se llevó a cabo sin modificaciones en todos los pacientes. El dolor residual tras la punción de fémur y tibia no pudo ser valorado dado el contexto quirúrgico del paciente.

4. DISCUSIÓN

El uso de células madre está cada vez más extendido en el campo de la cirugía ortopédica como tratamiento aislado o como apoyo para un acto quirúrgico.

El motivo de realizar este estudio es encontrar una alternativa a la punción de cresta ilíaca. Existen estudios que demuestran que el uso de injerto esponjoso de tibia presenta buenos resultados para el tratamiento de la pseudoartrosis¹⁹, y la cara anterior de la rodilla ofrece una localización accesible durante cualquier cirugía y de bajo riesgo para la punción con respecto a la cresta.

Haciendo una revisión bibliográfica hemos encontrado muy pocos estudios que demuestran la presencia de MSCs en médula ósea de distintas localizaciones. La mayor parte de estos estudios se han realizado en animales²⁰⁻²². Mazzocca A. D. realiza un estudio²³ en pacientes humanos aspirando médula ósea de cabeza humeral durante la reparación artroscópica de manguito rotador. Encuentra un resultado de $12,1 \times 10^6$ CMNs/mL de media en los aspirados de M. O. En su estudio compara sus datos con los obtenidos por diferentes autores en aspirados de cuerpo vertebral²⁴, cresta ilíaca^{25, 26}, ENREF²⁵, y húmero proximal^{23, 27}. Los autores presentan resultados muy parecidos entre sí con una concentración media de $17,3 \times 10^6$ CMNs/mL.

Nuestro estudio difiere en gran medida con estos resultados, siendo la concentración media hallada muy inferior tanto en cresta ilíaca ($10,05 \times 10^6$ CMNs/mL) como en fémur ($6,7 \times 10^5$ CMNs/mL) y tibia ($1,7 \times 10^6$ CMNs/mL). La diferencia obtenida en cresta ilíaca probablemente es debido a la elevada edad media de nuestro estudio (70,9 años) dado el diseño del mismo.

En su estudio, De Girolamo L. y colaboradores²⁸ analizan 11 pacientes comparando aspirado de médula ósea procedente de microfracturas realizadas sobre defectos osteocondrales de rodilla con cresta ilíaca. Demuestran que un 0,02% de las células del aspirado del hueso subcondral corresponden a MSCs frente a un 0,04% presente en cresta ilíaca, y que las primeras solamente pueden ser cultivadas durante unos pocos pases aunque presentan capacidad para diferenciación trilínea. Lamentablemente el diseño del estudio no permite realizar una comparación con nuestros datos, aunque las conclusiones son muy similares.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican una menor concentración de CMNs en el fémur y la tibia con respecto a la cresta ilíaca. Se considera que el número de éstas células está correlacionado directamente con la concentración de células madre mesenquimales^{8, 29}, por lo que podemos afirmar que la concentración de MSCs también será significativamente menor en fémur y tibia con respecto a la cresta ilíaca.

Partiendo de un mismo número de células plantadas el resultado final de MSCs obtenidas tras cultivo y la viabilidad de éstas no presentan diferencias estadísticamente significativas en las tres localizaciones. Asimismo todas las muestras presentaron capacidad para diferenciación hacia grasa, cartílago y hueso al ser cultivadas en medios específicos para ello. A la vista de estos datos se puede afirmar que la capacidad replicativa y multipotente de las MSCs procedentes de cresta ilíaca, fémur y tibia parece ser similar.

La tasa de éxito de los cultivos es drásticamente inferior en las muestras procedentes de tibia (47%), y ello parece estar correlacionado con la baja viabilidad de las CMNs observada en dichas muestras. No obstante, las características de las MSCs derivadas de los cultivos con éxito son similares a las procedentes de fémur y cresta.

El estudio presenta varias limitaciones, pero la principal es la avanzada edad de nuestros pacientes. Existen múltiples estudios en los que se demuestra que el número de las células madre presentes en M.O disminuye con la edad, no así sus características, lo que concuerda con nuestros resultados. A pesar de no haber tenido ninguna complicación en nuestro estudio un riesgo potencial de la punción de la metáfisis femoral es la posibilidad de artritis séptica, dado que el trayecto del trócar atraviesa una porción intrarticular.

En conclusión, la médula ósea presente en las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia tiene una concentración significativamente menor de células madre mesenquimales respecto a la procedente de cresta ilíaca, aunque no parecen existir diferencias en cuanto a la capacidad replicativa y multipotencialidad de dichas células. Las muestras procedentes de fémur tienen un mayor éxito de cultivo que las de tibia. La punción-aspiración de las metáfisis en torno a la rodilla según la técnica descrita es sencilla y con bajo riesgo, aunque son necesarios más estudios para poder investigar su potencial terapéutico.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooke G, Cook M, Blair C, et al.: Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 846-858.
- Owen M, Friedenstein AJ: Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988; 136: 42-60.
- Caplan AI: The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery* 1994; 21: 429-435.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al.: Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7: 393-395.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
- 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: 1699-1709.
- Insausti CL, Blanquer MB, Olmo LM, et al.: Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from the Fat Layer on the Density Gradient Separated Bone Marrow. *Stem Cells Dev* 2011.
- Brinckmann JE: Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *J Neurol Sci* 2008; 265: 127-130.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al.: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65: 3035-3039.
- Barry FP: Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69: 250-256.
- Buhring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W: Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1106: 262-271.
- Buhring HJ, Treml S, Cerabona F, de Zwart P, Kanz L, Sobiesiak M: Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1176: 124-134.
- Schieker M, Pautke C, Haasters F, et al.: Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat* 2007; 210: 592-599.
- Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF: Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275: 9645-9652.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238: 265-272.
- Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA: Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 2000; 185: 98-106.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64: 295-312.
- Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Van Den Bos C, Thiede M: Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology* 1999; 140: 3736-3743.
- Owoola AM, Odunubi OO, Yinusa Y, Uregbu MI: Proximal tibial metaphysis: its reliability as a donor site for grafting. *West African journal of medicine* 2010; 29: 403-407.
- Deldar A, Stevens CE, Beineke PJ: Comparative distribution of marrow CFU-e and CFU-gm progenitors in different anatomic sites in the dog. *International journal of cell cloning* 1990; 8: 196-208.
- Kushida T, Inaba M, Ikebukuro K, et al.: Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT. *Stem Cells* 2002; 20: 155-162.
- Piñero: Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *acta cirúrgica brasileira* 2009; 24: 400-404.
- Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowanick D, et al.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells obtained during arthroscopic rotator cuff repair surgery show potential for tendon cell differentiation after treatment with insulin. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2011; 27: 1459-1471.
- McLain RF, Fleming JE, Boehm CA, Muschler GF: Aspiration of osteoprogenitor cells for augmenting spinal fusion: comparison of progenitor cell concentrations from the vertebral body and iliac crest. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 2655-2661.

25. Cuomo AV, Virk M, Petrigliano F, Morgan EF, Lieberman JR: Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: potential pitfalls from bench to bedside. *J Bone Joint Surg Am* 2009; 91: 1073-1083.
26. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H: Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 1430-1437.
27. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Arciero RA, Drissi H: Rapid isolation of human stem cells (connective tissue progenitor cells) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery. *The American journal of sports medicine* 2010; 38: 1438-1447.
28. de Girolamo L, Bertolini G, Cervellin M, Sozzi G, Volpi P: Treatment of chondral defects of the knee with one step matrix-assisted technique enhanced by autologous concentrated bone marrow: in vitro characterisation of mesenchymal stem cells from iliac crest and subchondral bone. *Injury* 2010; 41: 1172-1177.
29. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F: Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 2009; 94: 258-263.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.

6. ANEXOS

6.1. ANEXO I. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ACEPTACIÓN DE INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA DE CRESTA ILÍACA, METÁFISIS DISTAL DE FÉMUR Y METÁFISIS PROXIMAL DE TIBI

Seguro que usted ha tenido conocimiento de los avances tecnológicos en el campo de la Terapia Celular y la Medicina Regenerativa. La experimentación con células madre ofrece nuevas oportunidades para el tratamiento y curación de enfermedades complejas. Para avanzar en el conocimiento de la biología de estos tipos celulares, así como las técnicas empleadas en su procesamiento, es muy importante el poder estudiar muestras de tejidos sanos. Uno de los tejidos más ricos en células madre y más utilizados por su fácil acceso es la Médula Ósea. Este tejido se encuentra en la epífisis de huesos planos en el adulto: cresta iliaca, esternón, etc.

Usted va a ser sometido a la siguiente intervención: Prótesis Total de Rodilla. La anestesia a la que estará sometido nos permitiría tomar una muestra de médula ósea, mediante aspirado en cresta iliaca (hueso plano de la cadera), de cantidad inferior a 5 ml. de sangre sin que ello modifique la técnica quirúrgica ni el protocolo de intervención. En el caso de que usted sintiese alguna molestia se le aplicaría anestesia local. La punción se realiza en la cresta ilíaca con un trócar fino (aguja fina de aspirado/punción medular). En este caso los riesgos incluyen: Infección del punto de entrada, hematoma o cardenal pasajero, perforación de víscera hueca, dolor en el punto de extracción. Así mismo se tomarán muestras similares de las zonas de hueso de tibia y fémur donde le va a ser implantada la prótesis, sin que se modifique la técnica quirúrgica de ésta.

Sería de gran utilidad que usted nos autorizase a realizarle una punción/aspiración de médula ósea a nivel de la cresta ilíaca. La donación del aspirado es totalmente voluntaria y en ningún caso se le realizará si no da su consentimiento. Esta donación no tiene beneficio propio para usted únicamente su apoyo a la investigación, dado que la importancia de este tipo de estudios es crucial para el avance de la Medicina.

Por tanto, le proponemos que nos permita aprovechar su intervención quirúrgica (Prótesis Total de Rodilla) y el tipo de anestesia que ésta conlleva (Generalmente epidural) para realizar el procedimiento antes descrito (Punción aspiración de médula ósea en cresta ilíaca).

Le garantizamos que el material se tratará con la mayor confidencialidad y los datos del donante se mantendrán bajo la más estricta confidencialidad y anonimato, según dispone la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

La única finalidad de esta prueba es obtener material para investigación y en todo momento nos ajustaremos a la legislación vigente sobre la materia. Dicho material se recogerá en las condiciones adecuadas y se usará únicamente para investigación. En ningún caso se dará uso comercial a éste material.

La donación de éste material es voluntaria y altruista, y usted estaría colaborando en el avance de la investigación biomédica.

Declaración del donante:

Se me ha facilitado esta hoja informativa, habiendo comprendido el significado del procedimiento y los riesgos inherentes al mismo, y declaro estar debidamente informado/a, según disponen los artículos 8,9 y 10 de la Ley 41/2002, del 14 de noviembre, Básica reguladora de la autonomía del paciente y de Derechos y Obligaciones en materia de Información y Documentación Clínica, habiendo tenido oportunidad de aclarar mis dudas y habiendo recibido respuesta a todas mis preguntas y tomado la decisión de manera libre y voluntaria.

- He sido informado por el Dr. del procedimiento de aspirado de médula ósea a nivel de cresta ilíaca, fémur y tibia realizado en el contexto de una cirugía de prótesis total de rodilla.
- He comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.
- **Autorizo a que se me realice aspirado** de médula ósea a nivel de cresta ilíaca, fémur y tibia de la zona de la rodilla durante la cirugía en la que se me va a implantar una prótesis total de rodilla.

Nombre:

Madrid a de del año

Firma del donante

.....

Firma del médico que informa

.....

Revocación/Denegación de consentimiento informado.

Yo, D/Dña. después de ser informado/a de la naturaleza y riesgos del procedimiento propuesto, manifiesto de manera libre y consciente mi denegación o revocación para su realización.

Madrid a de del año

Firma del donante

6.2. ANEXO II. TABLAS Y FIGURAS



Figura 1. Trocar para punción-aspiración de médula ósea con orificios laterales (BMA system, Synthes®).

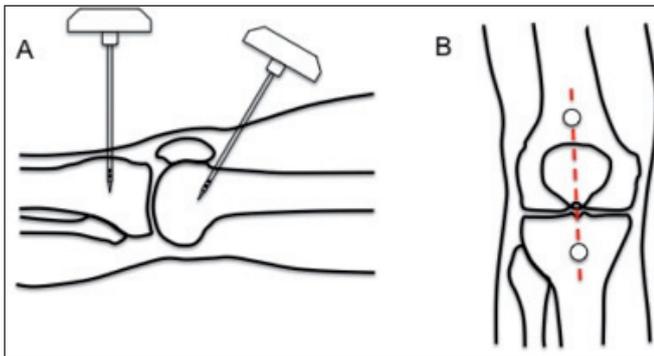


Figura 2. Localización de los puntos de punción para el aspirado. A: En el plano lateral sobre fémur, proximal al polo superior de rótula con una inclinación caudal de 30°; sobre tibia, perpendicular a tuberosidad tibial. B: En el plano anteroposterior se punciona en línea sobre la incisión programada para la artroplastia.



Figura 3. Muestra de médula ósea de fémur tras realizar separación por gradiente de Ficoll. Obsérvese la gran cantidad de grasa presente en la capa superior de la muestra.

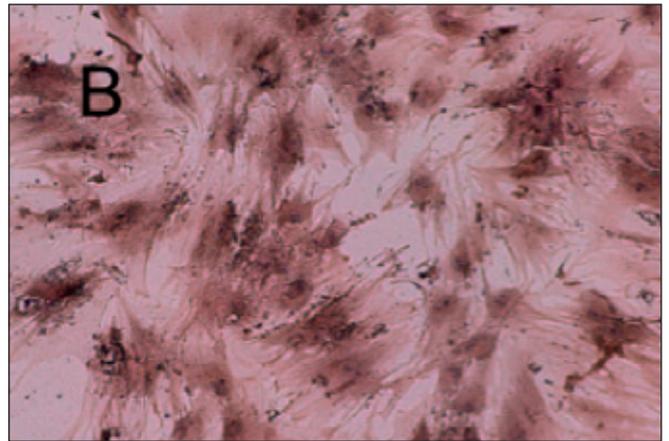
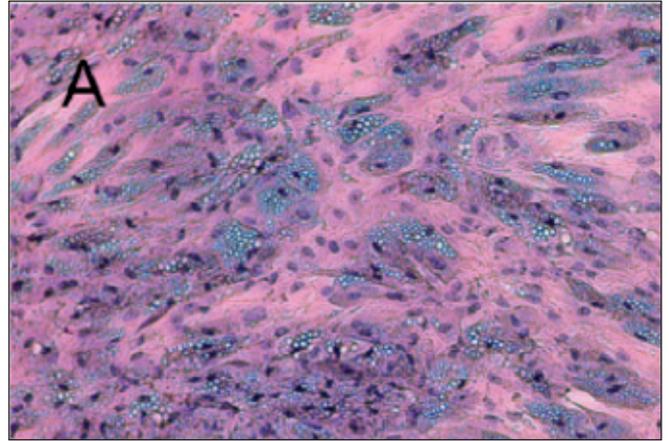


Figura 4. Muestras de diferenciación adipogénica(A) y osteogénica (B).

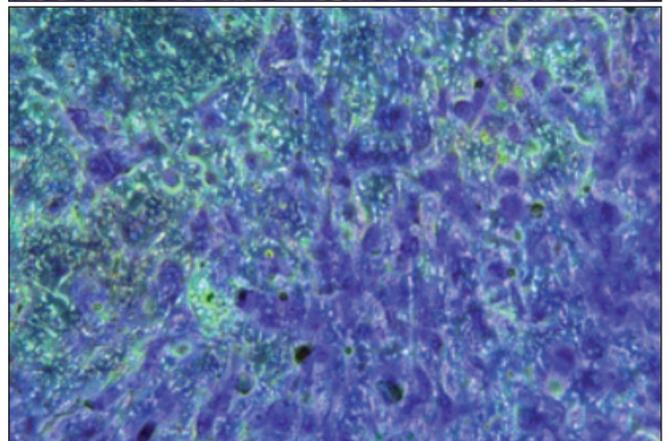
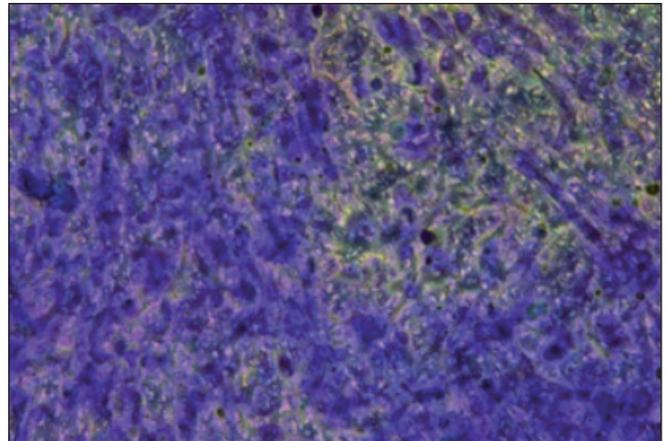


Figura 5. Muestras de diferenciación condrogénica.

Tabla 1. Organización de baterías de fluorocromos para análisis de citometría.

Tubos	FITC	PE	PERCP	APC
1	CONTROL			
2	106 (10 µl)	VEGF (7 µl)	34 (5 µl)	184 (7 µl)
3	117 (7 µl)	31 (10 µl)	HLADR (7 µl)	271 (6 µl)
4	105 (10 µl)	73 (6 µl)	CD 45	133 (7 µl)
5	3 (10 µl)	14 (10 µl)	*	19 (6 µl)
6	90 (2 µl)	71 (10 µl)	*	*

Tabla 2. Marcadores empleados para la citometría. Se incluye la descripción o la población celular en las que se encuentra presente.

Marcador	Descripción o localización
CD3	Células 3
CD14	Monocitos
CD19	Células B
CD31, PECAM1, GPIIa	Plaquetas, monocitos, granulocitos, cls B.
CD34	Células progenitoras hematopoyéticas.
CD45, PTPRC	Células hematopoyéticas (excepto eritrocitos) y HSCs.
CC71	Receptor de transferina: células en proliferación.
CD73, ECTO 5' nucleotidasa	Subpoblaciones de células B y T.
CD90, THY 1	Subpoblación de células madre, células estromales del timo.
CD105, endoglin	Células endoteliales.
106, VCAM-1	Células endoteliales activadas.
CD117, receptor-SCF, c-kit	Células progenitoras.
CD133, AC-133	Subpoblación células madre.
CD184, CXCR4	Subpoblación de células T, células B, monocitos, dendríticas y endoteliales
CD271, NGFR	Neuronas, células estromacales, células foliculares dendríticas.
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial.
HLA-DR	Antígeno humano de histocompatibilidad.

6.3. ANEXO III TABLA DE RECOGIDA DE DATOS. Tabla general, no se incluyen las tablas preparadas para importación al programa de análisis estadístico ni con datos no analizados. TABLAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 3. Recogida de datos.

PACIENTE	MUESTRA	Volumen M.O	Nº total CMN	Concentración CMNs/mi.	Viabilidad CMN (%)	Plantadas	Pase 0	Nº final	Días de cultivo	Viabilidad MSC (%)
1	Cresta	14	27.000.000	1.928.571	90	4.000.000	600.000	1.600.000	36	85
	Fémur				Muestra obtenida bajo isquemia del miembro (Excluida del estudio)					
	Tibia				Muestra obtenida bajo isquemia del miembro (Excluida del estudio)					
2	Cresta	8	19.200.000	2.400.000	92	13.800.000	342.000	640.000	42	92
	Fémur				Muestra obtenida bajo isquemia del miembro (Excluida del estudio)					
	Tibia				Muestra obtenida bajo isquemia del miembro (Excluida del estudio)					
3	Cresta	67	38.000.000	567.164	95	4.000.000	300.000	8.800.000	40	92
	Fémur				Muestra obtenida bajo isquemia del miembro (Excluida del estudio)					
	Tibia				Muestra obtenida bajo isquemia del miembro (Excluida del estudio)					
4	Cresta	6	5.240.000	873.333	89	3.000.000	280.000	550.000	42	96
	Fémur	5	2.460.000	492.000	78	940.000	39.000	180.000	38	83
	Tibia				Imposible obtener muestra					
5	Cresta	4,8	21.400.000	4.458.333	98	4.200.000	352.000	1.255.000	42	96
	Fémur	3,6	3.200.000	888.889	85	2.700.000	290.000	550.000	42	86
	Tibia	3,5	2.400.000	685.714	70	2.000.000	182.000	325.000	42	78
6	Cresta	36	48.000.000	1.333.333	90	180.000	35.000	53.000	39	98
	Fémur	2	180.000	90.000	85	180.000	10.500	0	17	0
	Tibia	6,5	1.470.000	226.154	95	180.000	30.000	0	17	0
7	Cresta	7,5	30.000.000	4.000.000	98	4.200.000	164.400	1.150.000	42	94
	Fémur	7,5	6.000.000	800.000	98	2.700.000	185.000	400.000	42	83
	Tibia	7,5	2.000.000	266.666	80	1.800.000	280.000	325.000	42	80
8	Cresta	10,5	500.000.000	47.619.047	98	3.500.000	275.000	600.000	41	98
	Fémur	6,2	3.500.000	564.516	98	3.500.000	280.000	500.000	41	92
	Tibia	6,5	9.500.000	1.461.538	93	3.500.000	410.000	500.000	41	98
9	Cresta	16,5	485.000.000	27.575.757	98	400.000	37.500	0	42	0
	Fémur	1	520.000	520.000	87	400.000	15.000	0	38	0
	Tibia	5	1.800.000	360.000	92	400.000	13.500	0	38	0
10	Cresta	6,9	114.240.000	16.556.521	92	400.000	17.000	0	21	0
	Fémur	5,9	840.000	142.372	40	400.000	5.000	0	21	0
	Tibia	4,8	780.000	162.500	70	400.000	20.000	0	21	0
11	Cresta	7,5	210.000.000	28.000.000	40	35.000.000	40.000	138.000	42	98
	Fémur	7,5	38.000.000	5.066.666	50	35.000.000	2.043.000	2.043.000	35	85
	Tibia	7,5	150.000.000	20.000.000	65	35.000.000	1.356.250	787.500	35	80
12	Cresta	11,5	4.300.000	373.913	98	960.000	145.000	920.000	42	98
	Fémur	6,5	2.600.000	400.000	40	960.000	37.500	150.000	38	72
	Tibia	6,5	1.380.000	212.307	95	960.000	28.000	36.000	42	87
13	Cresta	20	137.500.000	6.875.000	96	2.000.000	22.000	25.000	35	95
	Fémur	10	2.500.000	250.000	90	2.000.000	65.000	80.000	35	98
	Tibia	10	17.000.000	1.700.000	83	2.000.000	4.000	0	9	0
14	Cresta	14	50.000.000	3.571.428	92	750.000	40.000	20.000	42	30
	Fémur	8,5	2.000.000	235.294	92	750.000	2.500	20.000	42	40
	Tibia	8,5	750.000	88.235	74	750.000	25.000	0	20	0
15	Cresta	17,5	3.260.000	186.285	92	1.000.000	160.000	190.000	42	90
	Fémur	7	3.120.000	445.714	87	1.000.000	115.000	360.000	42	83
	Tibia	7	1.300.000	185.714	98	1.000.000	180.000	220.000	42	91
16	Cresta	16	660.000.000	41.250.000	95	4.000.000	830.000	4.340.000	42	91
	Fémur	7,5	8.140.000	1.085.333	85	4.000.000	910.000	1.792.000	42	94
	Tibia	8,5	9.900.000	1.164.705	87	4.000.000	540.000	790.000	41	94
17	Cresta	12	19.500.000	1.625.000	93	1.600.000	230.000	988.000	42	92
	Fémur	8,5	1.600.000	188.235	86	1.600.000	86.000	0	12	0
	Tibia	8,4	2.160.000	257.142	85	1.600.000	23.000	0	12	0
18	Cresta	18,5	180.000.000	9.729.729	86	850.000	125.000	364.000	42	83
	Fémur	7	850.000	121.428	90	850.000	140.000	221.000	42	98
	Tibia	8	8.000.000	1.000.000	75	850.000	36.000	0	36	0
19	Cresta	8,5	18.000.000	2.117.647	97	470.000	84.000	300.000	42	84
	Fémur	9	1.570.000	174.444	91	470.000	75.000	120.000	42	83
	Tibia	9	470.000	52.222	85	470.000	55.000	310.000	42	61
20	Cresta	5,5	750.000	136.363	90	750.000	175.500	1.175.000	42	87
	Fémur	6	25.000	4.166	98	25.000	4.000	0	14	0
	Tibia	7	990.000	141.428	91	990.000	67.000	0	30	0

Tabla 4. Frecuencia. Frecuencias –estadísticos–

	N		Desv. tip.	Mínimo	Máximo	Percentiles		
	Válidos	Perdidos				25	50	75
Volumen M.O Cresta	20	0	14,098	5	67	7,50	11,75	17,25
Nº total CMN Cresta	20	0	190237228,452	750000	660000000	18300000,00	34000000,00	169375000,00
Concentración Cresta	20	0	14462808,691	136363	47619047	988333,33	2985714,00	14849823,00
Viabilidad CMN (%) Cresta	20	0	12,521	40	98	90,00	92,50	97,75
Plantadas Cresta	20	0	7844247,708	180000	350000000	750000,00	1800000,00	4000000,00
Pase 0 Cresta	20	0	207133,113	17000	830000	40000,00	162200,00	295000,00
Nº final Cresta	18	2	2125067,904	20000	8800000	177000,00	595000,00	1195000,00
Días de cultivo Cresta	20	0	4,920	21	42	40,25	42,00	42,00
Viabilidad MSC (%) Cresta	20	0	31,019	0	98	84,25	92,00	96,00
Volumen M.O Fémur	17	3	2,394	1	10	5,45	7,00	8,00
Nº total CMN Fémur	17	3	8869137,127	25000	380000000	845000,00	2460000,00	3350000,00
Concentración Fémur	17	3	1171490,323	4166	50666666	158408,00	400000,00	682258,00
Viabilidad CMN (%) Fémur	17	3	18,918	40	98	81,50	87,00	91,50
Plantadas Fémur	17	3	8233839,899	25000	350000000	435000,00	960000,00	2700000,00
Pase 0 Fémur	17	3	205205,88	2500	1250000	12750,00	74000,00	222500,00
Nº final Fémur	12	8	669054,013	20000	2043000	127500,00	290500,00	587500,00
Días de cultivo Fémur	17	3	10,861	12	42	28,00	38,00	42,00
Viabilidad MSC (%) Fémur	14	6	33,361	0	98	64,00	83,00	92,50
Volumen M.O Tibia	16	4	1,6832	3,5	10,0	6,500	7,250	8,475
Nº total CMN Tibia	16	4	36799843,455	470000	150000000	1067500,00	1900000,00	9125000,00
Concentración Tibia	16	4	4895113,758	52222	200000000	168303,50	261904,00	1123528,75
Viabilidad CMN (%) Tibia	16	4	10,301	65	98	74,25	85,00	92,75
Plantadas Tibia	16	4	8471557,806	180000	350000000	540000,00	995000,00	2000000,00
Nº final Tibia	8	12	266031,542	36000	790000	242500,00	325000,00	715625,00
Días de cultivo Tibia	16	4	11,960	9	42	20,25	37,00	42,00
Viabilidad MSC (%) Tibia	8	12	11,649	61	98	78,50	83,50	93,25
Éxito del cultivo Cresta	20	0	,308	0	1	1,00	1,00	1,00
Éxito del cultivo Fémur	17	3	,470	0	1	,00	1,00	1,00
Éxito del cultivo Tibia	16	4	,516	0	1	,00	,50	1,00
Edad	20	0	70,90	64	75	67,50	72,00	75,00
Hb (Gr/dL)	20	0	12,415	10,8	14,2	11,675	12,300	13,450
Hematies (10*6/mL)	20	0	4,0440	3,56	4,71	3,6950	3,9700	4,4600
Leucocitos (10*3/mL)	20	0	9,220	5,1	16,5	6,700	8,350	11,700
ConcentracMSC.Cresta	20	0	10,8251	,11	23,40	4,5208	9,3542	15,7760
ConcentracMSC.Fémur	17	3	8,1709	,33	22,75	3,6607	5,8333	13,6223
ConcentracMSC.tibia	16	4	7,9612	,20	18,00	3,3438	5,8838	13,0536

PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS

Tabla 5. Sexo V=1 M=2.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	V	4	20,0	20,0	20,0
	M	16	80,0	80,0	100,0
	Total	20	100,0	100,0	

Tabla 6. Éxito del cultivo Cresta.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No	2	10,0	10,0	10,0
	Sí	18	90,0	90,0	100,0
	Total	20	100,0	100,0	

Tabla 7. Éxito del cultivo FÉMUR.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No	5	25,0	29,4	29,4
	Sí	12	60,0	70,6	100,0
	Total	17	85,0	100,0	
Perdidos	Sistema	3	15,0		
Total		20,0	100,0		

Tabla 8. Éxito del cultivo TIBIA.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No	8	40,0	50,0	50,0
	Sí	8	40,0	50,0	100,0
	Total	16	80,0	100,0	
Perdidos	Sistema	4	20,0		
Total		20	100,0		

Tabla 9. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

		N	Rango promedio	Suma de rangos
Volumen M.O Fémur - Volumen M.O Cresta	Rangos negativos	13(a)	9,00	117,00
	Rangos positivos	2(b)	1,50	3,00
	Empates	2(c)		
	Total	17		
Nº total CMN Fémur - Nº total CMN Cresta	Rangos negativos	17(d)	9,00	153,00
	Rangos positivos	0(e)	,00	,00
	Empates	0(f)		
	Total	17		
Concentración Fémur - Concentración Cresta	Rangos negativos	15(g)	9,93	149,00
	Rangos positivos	2(h)	2,00	4,00
	Empates	0(i)		
	Total	17		
Viabilidad CMN (%) Fémur - Viabilidad CMN (%) Cresta	Rangos negativos	11(j)	8,05	88,50
	Rangos positivos	3(k)	5,50	16,50
	Empates	3(l)		
	Total	17		
Plantadas Fémur - Plantadas Cresta	Rangos negativos	4(m)	2,50	10,00
	Rangos positivos	0(n)	,00	,00
	Empates	13(o)		
	Total	17		
Pase 0 Fémur - Pase 0 Cresta	Rangos negativos	12(p)	8,88	106,50
	Rangos positivos	5(q)	9,30	46,50
	Empates	0(r)		
	Total	17		
ConcentracMSC.Fémur - ConcentracMSC.Cresta	Rangos negativos	11(s)	11,09	122,00
	Rangos positivos	6(t)	5,17	31,00
	Empates	0(u)		
	Total	17		
Nº final Fémur - Nº final Cresta	Rangos negativos	7(v)	7,00	49,00
	Rangos positivos	4(w)	4,25	17,00
	Empates	1(x)		
	Total	12		
Días de cultivo Fémur - Días de cultivo Cresta	Rangos negativos	7(y)	4,00	28,00
	Rangos positivos	0(z)	,00	,00
	Empates	10(aa)		
	Total	17		
Viabilidad MSC (%) Fémur - Viabilidad MSC (%) Cresta	Rangos negativos	10(bb)	8,25	82,50
	Rangos positivos	4(cc)	5,63	22,50
	Empates	0(dd)		
	Total	14		

a Volumen M.O Fémur < Volumen M.O Cresta

b Volumen M.O Fémur > Volumen M.O Cresta

c Volumen M.O Fémur = Volumen M.O Cresta

d Nº total CMN Fémur < Nº total CMN Cresta

e Nº total CMN Fémur > Nº total CMN Cresta

f Nº total CMN Fémur = Nº total CMN Cresta

g Concentración Fémur < Concentración Cresta

h Concentración Fémur > Concentración Cresta

i Concentración Fémur = Concentración Cresta

j Viabilidad CMN (%) Fémur < Viabilidad CMN (%) Cresta

k Viabilidad CMN (%) Fémur > Viabilidad CMN (%) Cresta

l Viabilidad CMN (%) Fémur = Viabilidad CMN (%) Cresta

m Plantadas Fémur < Plantadas Cresta

n Plantadas Fémur > Plantadas Cresta

o Plantadas Fémur = Plantadas Cresta

p Pase 0 Fémur < Pase 0 Cresta

q Pase 0 Fémur > Pase 0 Cresta

r Pase 0 Fémur = Pase 0 Cresta

s ConcentracMSC.Fémur<ConcentracMSC.Cresta

t ConcentracMSC.Fémur>ConcentracMSC.Cresta

u ConcentracMSC.Fémur = ConcentracMSC.Cresta

v Nº final Fémur < Nº final Cresta

w Nº final Fémur > Nº final Cresta

x Nº final Fémur = Nº final Cresta

y Días de cultivo Fémur < Días de cultivo Cresta

z Días de cultivo Fémur > Días de cultivo Cresta

aa Días de cultivo Fémur = Días de cultivo Cresta

bb Viabilidad MSC (%) Fémur < Viabilidad MSC (%) Cresta

cc Viabilidad MSC (%) Fémur > Viabilidad MSC (%) Cresta

dd Viabilidad MSC (%) Fémur = Viabilidad MSC (%) Cresta

Tabla 10. Estadísticos de contraste (b).

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
Volumen M.O Fémur - Volumen M.O Cresta	-3,239(a)	,001
Nº total CMN Fémur - Nº total CMN Cresta	-3,621(a)	,000
Concentración Fémur - Concentración Cresta	-3,432(a)	,001
Viabilidad CMN (%) Fémur - Viabilidad CMN (%) Cresta	-2,262(a)	,024
Plantadas Fémur - Plantadas Cresta	-1,841(a)	,066
Pase 0 Fémur - Pase 0 Cresta	-1,420(a)	,156
ConcentracMSC.Fémur - ConcentracMSC.Cresta	-2,154(a)	,031
Nº final Fémur - Nº final Cresta	-1,423(a)	,155
Días de cultivo Fémur - Días de cultivo Cresta	-2,384(a)	,017
Viabilidad MSC (%) Fémur - Viabilidad MSC (%) Cresta	-1,885(a)	,059

a Basado en los rangos positivos.
b Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 11. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. -RANGO-.

		N	Rango promedio	Suma de rangos
Volumen M.O Tibia - Volumen M.O Cresta	Rangos negativos	12(a)	8,42	101,00
	Rangos positivos	2(b)	2,00	4,00
	Empates	2(c)		
	Total	16		
Nº total CMN Tibia - Nº total CMN Cresta	Rangos negativos	15(d)	9,00	135,00
	Rangos positivos	1(e)	1,00	1,00
	Empates	0(f)		
	Total	16		
Concentración Tibia - Concentración Cresta	Rangos negativos	15(g)	8,93	134,00
	Rangos positivos	1(h)	2,00	2,00
	Empates	0(i)		
	Total	16		
Viabilidad CMN (%) Tibia - Viabilidad CMN (%) Cresta	Rangos negativos	12(j)	9,25	111,00
	Rangos positivos	4(k)	6,25	25,00
	Empates	0(l)		
	Total	16		
Plantadas Tibia - Plantadas Cresta	Rangos negativos	2(m)	2,50	5,00
	Rangos positivos	1(n)	1,00	1,00
	Empates	13(o)		
	Total	16		
Pase 0 Tibia - Pase 0 Cresta	Rangos negativos	11(p)	8,36	92,00
	Rangos positivos	5(q)	8,80	44,00
	Empates	0(r)		
	Total	16		
ConcentracMSC.tibia - ConcentracMSC.Cresta	Rangos negativos	10(s)	10,05	100,50
	Rangos positivos	6(t)	5,92	35,50
	Empates	0(u)		
	Total	16		
Nº final Tibia - Nº final Cresta	Rangos negativos	4(v)	5,50	22,00
	Rangos positivos	3(w)	2,00	6,00
	Empates	1(x)		
	Total	8		

		N	Rango promedio	Suma de rangos
Días de cultivo Tibia - Días de cultivo Cresta	Rangos negativos	9(y)	5,00	45,00
	Rangos positivos	0(z)	,00	,00
	Empates	7(aa)		
	Total	16		
Viabilidad MSC (%) Tibia - Viabilidad MSC (%) Cresta	Rangos negativos	5(bb)	5,00	25,00
	Rangos positivos	2(cc)	1,50	3,00
	Empates	1(dd)		
	Total	8		

<p>a Volumen M.O Tibia < Volumen M.O Cresta b Volumen M.O Tibia > Volumen M.O Cresta c Volumen M.O Tibia = Volumen M.O Cresta d N° total CMN Tibia < N° total CMN Cresta e N° total CMN Tibia > N° total CMN Cresta f N° total CMN Tibia = N° total CMN Cresta g Concentración Tibia < Concentración Cresta h Concentración Tibia > Concentración Cresta i Concentración Tibia = Concentración Cresta j Viabilidad CMN (%) Tibia < Viabilidad CMN (%) Cresta k Viabilidad CMN (%) Tibia > Viabilidad CMN (%) Cresta l Viabilidad CMN (%) Tibia = Viabilidad CMN (%) Cresta m Plantadas Tibia < Plantadas Cresta n Plantadas Tibia > Plantadas Cresta o Plantadas Tibia = Plantadas Cresta</p>	<p>p Pase 0 Tibia < Pase 0 Cresta q Pase 0 Tibia > Pase 0 Cresta r Pase 0 Tibia = Pase 0 Cresta s ConcentracMSC.tibia<ConcentracMSC.Cresta t ConcentracMSC.tibia>ConcentracMSC.Cresta u ConcentracMSC.tibia = ConcentracMSC.Cresta v N° final Tibia < N° final Cresta w N° final Tibia > N° final Cresta x N° final Tibia = N° final Cresta y Días de cultivo Tibia < Días de cultivo Cresta z Días de cultivo Tibia > Días de cultivo Cresta aa Días de cultivo Tibia = Días de cultivo Cresta bb Viabilidad MSC (%) Tibia < Viabilidad MSC (%) Cresta cc Viabilidad MSC (%) Tibia > Viabilidad MSC (%) Cresta dd Viabilidad MSC (%) Tibia = Viabilidad MSC (%) Cresta</p>
---	---

Tabla 12. Estadísticos de contraste (C). Tabla coMPARATIVA TIBIA Vs CRESTA

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
Volumen M.O Tibia - Volumen M.O Cresta	-3,045(a)	,002
N° total CMN Tibia - N° total CMN Cresta	-3,464(a)	,001
Concentración Tibia - Concentración Cresta	-3,413(a)	,001
Viabilidad CMN (%) Tibia - Viabilidad CMN (%) Cresta	-2,225(a)	,026
Plantadas Tibia - Plantadas Cresta	-1,069(a)	,285
Pase 0 Tibia - Pase 0 Cresta	-1,241(a)	,215
ConcentracMSC.tibia - ConcentracMSC.Cresta	-1,681(a)	,093
N° final Tibia - N° final Cresta	-1,352(a)	,176
Días de cultivo Tibia - Días de cultivo Cresta	-2,668(a)	,008
Viabilidad MSC (%) Tibia - Viabilidad MSC (%) Cresta	-1,863(a)	,063

a Basado en los rangos positivos.
b Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 13. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

		N	Rango promedio	Suma de rangos
Volumen M.O Tibia - Volumen M.O Fémur	Rangos negativos	3(a)	3,33	10,00
	Rangos positivos	6(b)	5,83	35,00
	Empates	7(c)		
	Total	16		
Nº total CMN Tibia - Nº total CMN Fémur	Rangos negativos	7(d)	6,43	45,00
	Rangos positivos	9(e)	10,11	91,00
	Empates	0(f)		
	Total	16		
Concentración Tibia - Concentración Fémur	Rangos negativos	7(g)	8,71	61,00
	Rangos positivos	9(h)	8,33	75,00
	Empates	0(i)		
	Total	16		
Viabilidad CMN (%) Tibia - Viabilidad CMN (%) Fémur	Rangos negativos	9(j)	7,94	71,50
	Rangos positivos	7(k)	9,21	64,50
	Empates	0(l)		
	Total	16		
Plantadas Tibia - Plantadas Fémur	Rangos negativos	2(m)	1,50	3,00
	Rangos positivos	1(n)	3,00	3,00
	Empates	13(o)		
	Total	16		
Pase 0 Tibia - Pase 0 Fémur	Rangos negativos	8(p)	8,06	64,50
	Rangos positivos	8(q)	8,94	71,50
	Empates	0(r)		
	Total	16		
ConcentracMSC.tibia - ConcentracMSC.Fémur	Rangos negativos	9(s)	8,33	75,00
	Rangos positivos	7(t)	8,71	61,00
	Empates	0(u)		
	Total	16		
Nº final Tibia - Nº final Fémur	Rangos negativos	7(v)	4,43	31,00
	Rangos positivos	1(w)	5,00	5,00
	Empates	0(x)		
	Total	8		
Días de cultivo Tibia - Días de cultivo Fémur	Rangos negativos	4(y)	3,75	15,00
	Rangos positivos	2(z)	3,00	6,00
	Empates	10(aa)		
	Total	16		
Viabilidad MSC (%) Tibia - Viabilidad MSC (%) Fémur	Rangos negativos	4(bb)	3,63	14,50
	Rangos positivos	3(cc)	4,50	13,50
	Empates	1(dd)		
	Total	8		

a Volumen M.O Tibia < Volumen M.O Fémur
 b Volumen M.O Tibia > Volumen M.O Fémur
 c Volumen M.O Tibia = Volumen M.O Fémur
 d Nº total CMN Tibia < Nº total CMN Fémur
 e Nº total CMN Tibia > Nº total CMN Fémur
 f Nº total CMN Tibia = Nº total CMN Fémur
 g Concentración Tibia < Concentración Fémur
 h Concentración Tibia > Concentración Fémur
 i Concentración Tibia = Concentración Fémur
 j Viabilidad CMN (%) Tibia < Viabilidad CMN (%) Fémur
 k Viabilidad CMN (%) Tibia > Viabilidad CMN (%) Fémur
 l Viabilidad CMN (%) Tibia = Viabilidad CMN (%) Fémur
 m Plantadas Tibia < Plantadas Fémur
 n Plantadas Tibia > Plantadas Fémur
 o Plantadas Tibia = Plantadas Fémur

p Pase 0 Tibia < Pase 0 Fémur
 q Pase 0 Tibia > Pase 0 Fémur
 r Pase 0 Tibia = Pase 0 Fémur
 s ConcentracMSC.tibia<ConcentracMSC.Fémur
 t ConcentracMSC.tibia>ConcentracMSC.Fémur
 u ConcentracMSC.tibia = ConcentracMSC.Fémur
 v Nº final Tibia < Nº final Fémur
 w Nº final Tibia > Nº final Fémur
 x Nº final Tibia = Nº final Fémur
 y Días de cultivo Tibia < Días de cultivo Fémur
 z Días de cultivo Tibia > Días de cultivo Fémur
 aa Días de cultivo Tibia = Días de cultivo Fémur
 bb Viabilidad MSC (%) Tibia < Viabilidad MSC (%) Fémur
 cc Viabilidad MSC (%) Tibia > Viabilidad MSC (%) Fémur
 dd Viabilidad MSC (%) Tibia = Viabilidad MSC (%) Fémur

Tabla 14. Estadísticos de contraste (D).

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
Volumen M.O Tibia - Volumen M.O Fémur	-1,487(a)	,137
Nº total CMN Tibia - Nº total CMN Fémur	-1,189(a)	,234
Concentración Tibia - Concentración Fémur	-,362(a)	,717
Viabilidad CMN (%) Tibia - Viabilidad CMN (%) Fémur	-,181(b)	,856
Plantadas Tibia - Plantadas Fémur	,000(c)	1,000
Pase 0 Tibia - Pase 0 Fémur	-,181(a)	,856
ConcentracMSC.tibia - ConcentracMSC.Fémur	-,362(b)	,717
Nº final Tibia - Nº final Fémur	-1,820(b)	,069
Días de cultivo Tibia - Días de cultivo Fémur	-,943(b)	,345
Viabilidad MSC (%) Tibia - Viabilidad MSC (%) Fémur	-,085(b)	,933

a Basado en los rangos negativos.
b Basado en los rangos positivos.
c La suma de rangos negativos es igual a la suma de rangos positivos.
d Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 15. Correlaciones cresta.

			Pase 0 Cresta	Nº final Cresta	Días de cultivo Cresta
Rho de Spearman	Pase 0 Cresta	Coeficiente de correlación	1,000	,851(**)	,233
		Sig. (bilateral)	.	,000	,323
		N	20	18	20
	Nº final Cresta	Coeficiente de correlación	,851(**)	1,000	,048
		Sig. (bilateral)	,000	.	,849
		N	18	18	18
	Días de cultivo Cresta	Coeficiente de correlación	,233	,048	1,000
		Sig. (bilateral)	,323	,849	.
		N	20	18	20

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 16. Correlaciones fémur.

			Pase 0 Fémur	Nº final Fémur	Días de cultivo Fémur
Rho de Spearman	Pase 0 Fémur	Coeficiente de correlación	1,000	,930(**)	,409
		Sig. (bilateral)	.	,000	,103
		N	17	12	17
	Nº final Fémur	Coeficiente de correlación	,930(**)	1,000	,004
		Sig. (bilateral)	,000	.	,990
		N	12	12	12
	Días de cultivo Fémur	Coeficiente de correlación	,409	,004	1,000
		Sig. (bilateral)	,103	,990	.
		N	17	12	17

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 17. Correlaciones tibia.

			Pase 0 Tibia	Nº final Tibia	Días de cultivo Tibia
Rho de Spearman	Pase 0 Tibia	Coeficiente de correlación	1,000	,946(**)	,542(*)
		Sig. (bilateral)	.	,000	,030
		N	16	8	16
	Nº final Tibia	Coeficiente de correlación	,946(**)	1,000	-,830(*)
		Sig. (bilateral)	,000	.	,011
		N	8	8	8
	Días de cultivo Tibia	Coeficiente de correlación	,542(*)	-,830(*)	1,000
		Sig. (bilateral)	,030	,011	.
		N	16	8	16

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).
 * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 18. Pruebas no paramétricas. Estadísticos de contraste (b). Tabla comparativa fémur vs cresta.

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
Nº total CMN Fémur - Nº total CMN Cresta	-3,621(a)	,000
Concentración Fémur - Concentración Cresta	-3,432(a)	,001
Viabilidad CMN (%) Fémur - Viabilidad CMN (%) Cresta	-2,262(a)	,024
Plantadas Fémur - Plantadas Cresta	-1,841(a)	,066
Pase 0 Fémur - Pase 0 Cresta	-1,420(a)	,156
ConcentracMSC.Fémur - ConcentracMSC.Cresta	-2,154(a)	,031
Nº final Fémur - Nº final Cresta	-1,423(a)	,155
Días de cultivo Fémur - Días de cultivo Cresta	-2,384(a)	,017
Viabilidad MSC (%) Fémur - Viabilidad MSC (%) Cresta	-1,885(a)	,059
Viabilidad MSC (%) Tibia - Viabilidad MSC (%) Cresta	-1,863(a)	,063

a Basado en los rangos positivos.
 b Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 19. Estadísticos de contraste (d). Tabla comparativa fémur vs tibia.

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
Volumen M.O Tibia - Volumen M.O Fémur	-1,487(a)	,137
Nº total CMN Tibia - Nº total CMN Fémur	-1,189(a)	,234
Concentración Tibia - Concentración Fémur	-,362(a)	,717
Viabilidad CMN (%) Tibia - Viabilidad CMN (%) Fémur	-,181(b)	,856
Plantadas Tibia - Plantadas Fémur	,000(c)	1,000
Pase 0 Tibia - Pase 0 Fémur	-,181(a)	,856
ConcentracMSC.tibia - ConcentracMSC.Fémur	-,362(b)	,717
Nº final Tibia - Nº final Fémur	-1,820(b)	,069
Días de cultivo Tibia - Días de cultivo Fémur	-,943(b)	,345
Viabilidad MSC (%) Tibia - Viabilidad MSC (%) Fémur	-,085(b)	,933

a Basado en los rangos negativos.
 b Basado en los rangos positivos.
 c La suma de rangos negativos es igual a la suma de rangos positivos.
 d Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon