

INVESTIGACIÓN

INVESTIGACIÓN

2008



EVOLUCIÓN RADIOGRÁFICA DEL IMPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO DIFERENCIADAS A OSTEÓBLASTOS EMBEBIDAS EN PLASMA RICO EN PLAQUETAS DURANTE LA REPARACIÓN DE DEFECTOS CAVITARIOS DEL FÉMUR

FUNDACIÓN MAPFRE

www.fundacionmapfre.com

Investigador Principal

Luis Rafael Ramos Pascua

Jefe de Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología.
Complejo Asistencial de León

Equipo Investigador

Francisco Javier Iglesias Muñoz

Responsable Banco de Tejidos
Fundación Clínica San Francisco

Andrés Saldaña Díaz

Médico Interno Residente
Complejo Asistencial de León

Marta López Laguna

Becaria
Fundación Clínica San Francisco

Elena Vuelta López

Becaria
Fundación Clínica San Francisco

Francisco Miguel Izquierdo García

Facultativo Especialista de Área
Complejo Asistencial de León

Índice

	Página
1. RESUMEN	4
2. OBJETIVOS DEL PROYECTO	4
2.1. Objetivo principal	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. FASES DE REALIZACIÓN DEL PROYECTO	4
4. METODOLOGÍA	4
5. MODIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA Y SU JUSTIFICACIÓN	6
6. RESULTADOS	6
6.1. Resultados radiológicos del crecimiento óseo (formación ósea)	6
6.2. Resultados radiológicos de la remodelación ósea	6
7. DISCUSIÓN	10
8. CONCLUSIÓN	10
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

1. RESUMEN

Se ha evaluado radiográficamente la capacidad de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADMSCs) y diferenciadas hacia fenotipo osteoblástico para regenerar defectos óseos cavitarios femorales en un modelo animal ovino.

Se obtuvieron muestras de tejido adiposo subcutáneo de las que se aislaron las ADMSCs, que fueron cultivadas para su expansión y diferenciación in vitro hacia células de tipo óseo. Se crearon defectos óseos cavitarios de tamaño crítico para asegurar la no regeneración espontánea de los mismos en el cóndilo medial del fémur de ovejas adultas y dichos defectos se rellenaron con ADMSCs diferenciadas osteogénicamente y embebidas en plasma rico en plaquetas (PRP), que actuó como vector para el implante y, además, aportó factores de crecimiento que favorecieron la regeneración ósea. En todos los animales incluidos en cada grupo de estudio se realizaron controles radiográficos para valorar la evolución de las lesiones.

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 4 y 12 semanas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

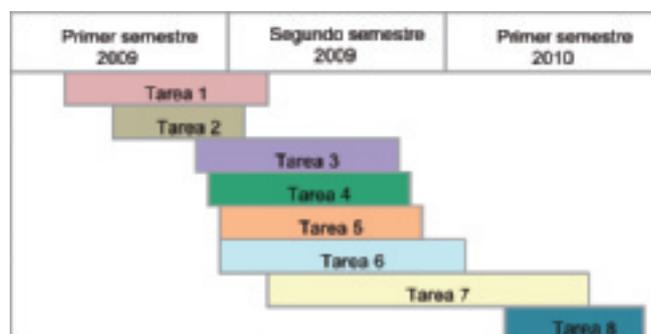
Cuantificar radiográficamente la regeneración de defectos óseos cavitarios tratados con células osteogénicas diferenciadas a partir de células madre mesenquimales del tejido graso y factores de crecimiento en un modelo experimental ovino.

2.2. Objetivos específicos

1. Obtención, expansión y manipulación de ADMSCs para inducir su diferenciación hacia células osteogénicas.
2. Creación de defectos óseos cavitarios en el fémur de ovejas adultas.
3. Utilización de ADMSCs con fenotipo osteogénico para el rellenado de los defectos cavitarios, utilizando como vector un gel de PRP.

3. FASES DE REALIZACIÓN DEL PROYECTO

Tabla 1. Cronograma del proyecto.



Tarea 1. Puesta a punto de las técnicas de aislamiento, purificación, cultivo y diferenciación de ADMSC.

Tarea 2. Estudios de multipotencialidad in vitro.

Tarea 3. Obtención de tejido graso de las ovejas objeto de estudio y aislamiento de ADMSC.

Tarea 4. Cultivo, diferenciación y marcaje de ADMSC.

Tarea 5. Creación de los defectos óseos e implante.

Tarea 6. Controles radiográficos.

Tarea 7. Comparación con estudios anatomopatológicos e histomorfométricos.

Tarea 8. Redacción de la memoria.

4. METODOLOGÍA

Animal de experimentación: Oveja adulta de 5 años de edad media y 40 kg de peso medio aproximado. El modelo de experimentación animal se desarrolló cumpliendo la normativa al respecto del manejo ético de los animales de experimentación según directiva EU 86 / 609 de la Unión Europea y Real Decreto 1201 / 2005 de España.

- Obtención y procesamiento de tejido adiposo: una vez tranquilizados y anestesiados los animales, se procedió a la obtención de muestras de tejido adiposo subcutáneo mediante técnicas mínimamente invasivas y bajo condiciones de asepsia. Las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio de cultivos celulares del Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco, donde fueron procesadas. Para el aislamiento de las ADMSCs las muestras de grasa fueron digeridas mediante técnicas de disgregación mecánica y enzimática para la individualización de los componentes celulares que constituyen el tejido. Las soluciones obtenidas fueron centrifugadas con el fin de eliminar los adipocitos maduros y recoger la fracción precipitada del estroma vascular, donde se encuentran las ADMSCs. El pellet fue resuspendido y se cuantificó el rendimiento celular del proceso de digestión y aislamiento de las ADMSCs.
- Cultivo primario y expansión de las ADMSCs: las suspensiones celulares obtenidas a partir del protocolo de digestión del tejido adiposo fueron sembradas sobre superficies plásticas y se cultivaron

- en medio de expansión para las ADMSCs, suplementado con factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF-b). Las células en cultivo primario se mantuvieron bajo condiciones in vitro hasta que alcanzaron el estado de confluencia. En dicho momento, las poblaciones celulares fueron separadas de la superficie de cultivo y cuantificadas.
- Inducción osteogénica de las ADMSCs: las células obtenidas a partir de los cultivos primarios confluentes de ADMSCs fueron sembradas en superficies plásticas y cultivadas en un medio de expansión para las ADMSCs hasta que alcanzaron el estado de preconfluencia (7-10 días). Una vez alcanzado dicho estado el medio de cultivo fue reemplazado por un medio de inducción de la diferenciación hacia osteoblastos, suplementado con Beta-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.
 - Caracterización de las ADMSCs: para el análisis del fenotipo de las células aisladas de las muestras de tejido graso, parte de las suspensiones celulares obtenidas fueron recogidas y utilizadas para la realización del estudio de la expresión de la siguiente batería de marcadores: CD73, CD 90, CD 105, CD34 y CD45, mediante citometría de flujo. No se hizo.
 - Multipotencialidad de las ADMSCs: para comprobar la multipotencialidad de las células madre derivadas del tejido adiposo, se indujo su diferenciación hacia células de tipo adiposo, óseo y cartilaginoso mediante su cultivo en medios específicos. Posteriormente se estudió la expresión de marcadores característicos de estos tipos celulares mediante técnicas de tinción básicas.
 - Pruebas inmunohistoquímicas: el estudio de la expresión de marcadores propios de células óseas se realizó sobre las poblaciones celulares sometidas a inducción de la diferenciación osteogénica mediante técnicas básicas de inmunohistoquímica. Se realizó un análisis de la presencia de las siguientes proteínas: osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina, y colágeno tipo I. No se hizo.
 - Preparación del plasma rico en plaquetas (PRP): una vez tranquilizado y anestesiado el animal de experimentación, antes de la generación del defecto óseo se recogió una muestra de sangre del animal en tubos de extracción de sangre con citrato para evitar la coagulación. Tras su centrifugación, la fracción del componente plasmático rica en plaquetas fue recogida en un recipiente estéril. La formación del gel de PRP se indujo añadiendo cloruro cálcico para desencadenar el proceso de coagulación.

- Creación del defecto óseo en animal de experimentación: Se creó un defecto óseo cavitario de 13 mm de ancho por 11 mm de profundidad de la misma manera que el modelo experimental de Walsh (18), centrado en el cóndilo medial del fémur de la oveja; es decir, dos defectos en cada oveja. Para el tratamiento de los defectos cavitarios se plantearon 4 grupos de estudio: GRUPO I: (control, n=5) defectos que no recibieron implante y que configuraron un grupo control negativo. GRUPO II: (n=5) defectos en los que se implantó el gel de PRP. GRUPO III: (n=10) defectos en los que se implantaron ADMSCs embebidas en gel de PRP. GRUPO IV: (n=10) defectos en los que se implantaron ADMSCs inducidas a osteoblastos embebidas en gel de PRP. Para el recubrimiento final de las lesiones se utilizó un parche de fascia autóloga.
- Tras realizar el relleno del defecto cavitario se procedió al cierre por planos. Finalmente se realizó un control radioscópico de lo realizado. En todos los grupos de estudio se realizó un control radiográfico cada 4 y 12 semanas, utilizando la escala de Lane y Sandhu (Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop. Clin. North Am.* 1987; 18: 213-25) para el estudio de la regeneración ósea, valorando el porcentaje de formación ósea y el remodelado óseo (Tablas 2 y 3 y Figuras 1 y 2).

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

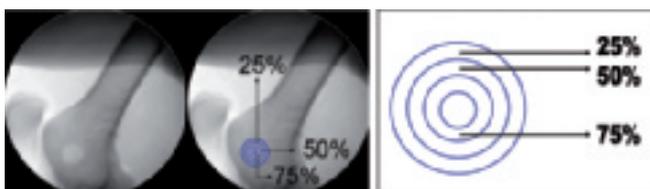


Tabla 2 y figuras 1 y 2. Arriba, tabla de porcentajes (%) de formación ósea en el defecto femoral y el valor concedido a cada %, considerando como formación ósea la pérdida de radiolucencia del defecto en círculos concéntricos desde la periferia hacia el centro. Abajo, esquema de los círculos concéntricos estimados para el cálculo del % de formación ósea.

Tabla 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.

REMDELACIÓN ÓSEA	VALOR
Ninguna	0
Apreciable	2
Completo	4

- Manejo de los datos: para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS. Debido al tamaño muestral se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas (prueba de Wilcoxon para la comparación de los resultados radiográficos). La principal limitación del estudio fue el tamaño muestral del que disponíamos. El elevado coste del animal de experimentación y su mantenimiento por un lado y la necesidad de reactivos, marcajes y anticuerpos necesarios para la demostración del crecimiento óseo por otro, determinó el tamaño muestral, que, por otra parte, usualmente es pequeño en este tipo de estudios.

5. MODIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA Y SU JUSTIFICACIÓN

1. Sobre el modelo animal de experimentación. Comenzamos trabajando con ovejas merinas adultas dada la disponibilidad de las mismas en la región. Sin embargo, tras intervenir a dos animales, tratándose de animales de una especie delgada, encontramos grandes dificultades para extraer grasa, con lo que decidimos cambiar de raza ovina para la investigación. Nos decantamos así por las ovejas de cola grasa de raza Asaaf, con un abundante tejido graso en su cola, lo que facilitó su localización y extracción en una cirugía sencilla y poco invasiva. Las ovejas de cola grasa de raza Asaaf fueron conseguidas en la granja de la Facultad de Veterinaria del Campus de Vegazana de León.
2. Cambio en la técnica de obtención del tejido graso del animal experimental. Se comenzó la extracción de grasa mediante liposucción, si bien debido a la consistencia de la grasa las muestras fueron insuficientes, por lo que se cambió la técnica quirúrgica a cirugía abierta mínimamente invasiva. Esta nos permite un buen acceso con mínima lesión de las partes blandas.
3. Supresión de las pruebas inmunológicas para la caracterización de las ADMSCs cultivadas y/o diferenciadas in vitro: dada la escasa disponibilidad en el mercado de anticuerpos reactivos frente a antígenos ovinos, nos hemos visto obligados a prescindir de dichas pruebas.
4. Cambio en el tamaño muestral de la serie. En relación con el tamaño muestral, inicialmente planificamos estudiar 30 ovejas y un defecto en cada cóndilo femoral de cada oveja, que posteriormente redujimos a 12 animales. Aumentar el número de controles y disminuir los tiempos de sacrificio nos permitió obtener más datos comparables minimizando el número de animales de experimentación (Tabla 4).
5. Cambio del parche de cierre del defecto cavitario del fémur. El parche para cerrar el defecto cavitario creado en el fémur fue realizado con una malla de ácido poliglicólico, sustituyendo a uno de fascia autóloga para

aumentar la reproducibilidad de la técnica y evitar la invasión del defecto óseo por parte del tejido fascio-graso.

Tabla 4. Distribución de los defectos óseos en los grupos de estudio.

GRUPO	DESCRIPCIÓN	Nº 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

6. RESULTADOS

6.1. 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 Shandru. 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 3-5. En la tabla 5 se representa el crecimiento en función del tiempo, observándose que éste se incrementa desde las 4 a las 12 semanas.

6.2. Resultados radiológicos de la remodelación ósea

En ninguno de los grupos hubo remodelación ósea completa según la escala de Lane y Shandru. En el grupo

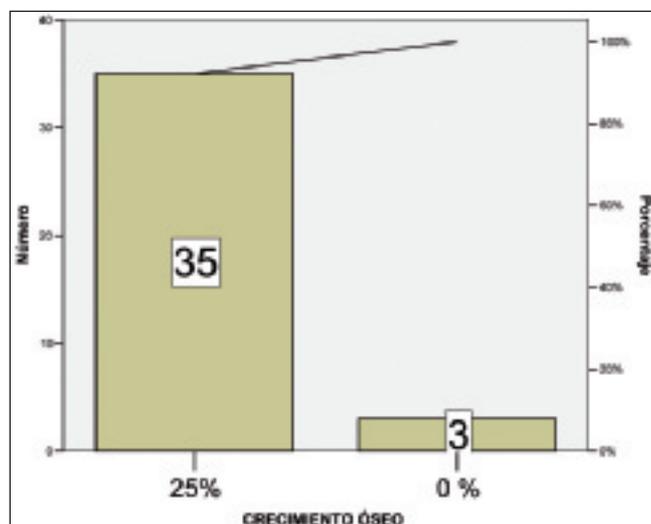


Figura 3. Representación esquemática del crecimiento óseo general en los animales del estudio.

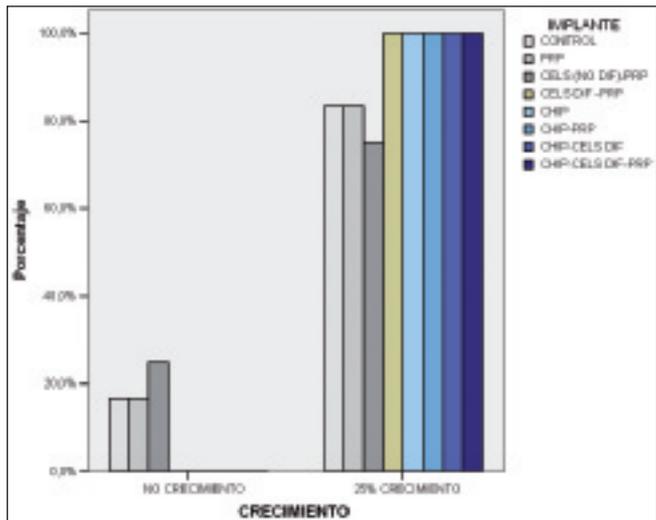


Figura 4. Representación esquemática del crecimiento óseo en los grupos del estudio.

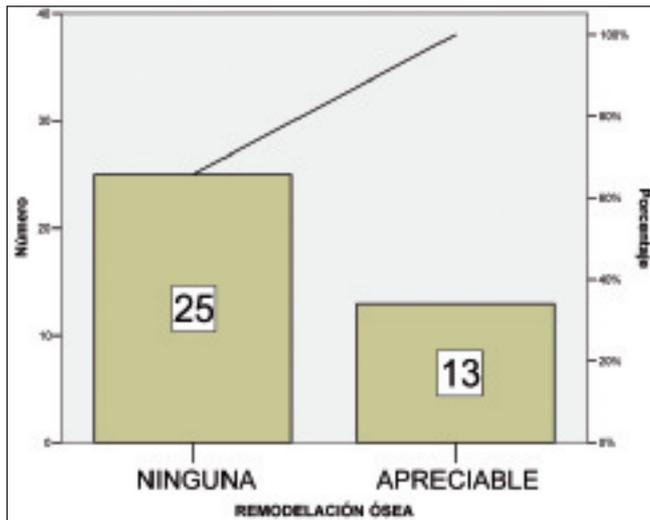


Figura 6. Representación esquemática de la remodelación ósea general en los animales del estudio.

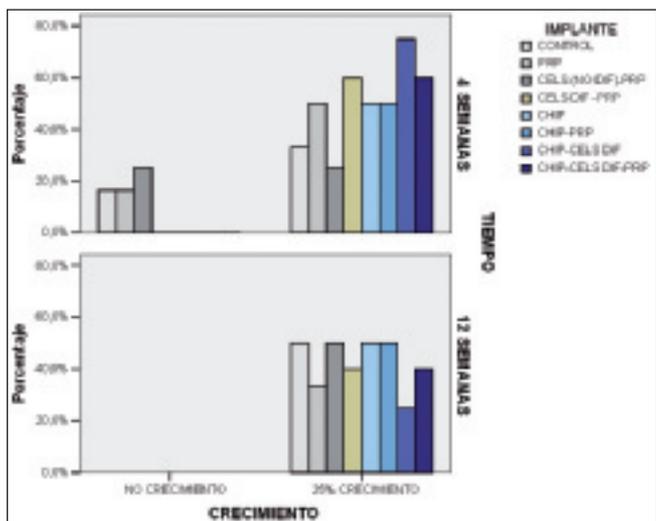


Figura 5. Representación esquemática del crecimiento óseo en los diferentes grupos del estudio en función del tiempo, al cabo de 4 y 12 semanas.

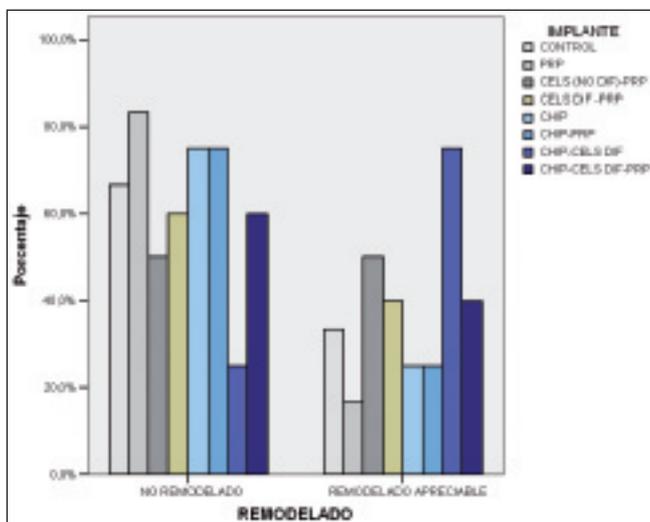


Figura 7. Representación esquemática de la remodelación ósea en los grupos del estudio.

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 6-8. En la tabla 6 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 5-12 y en las figuras 9-16 Se representa el crecimiento y el remodelado óseo de cada uno de los grupos de manera individual.

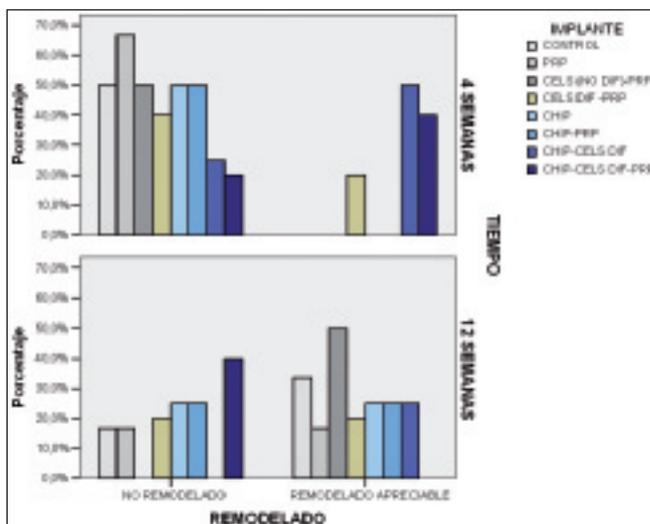


Figura 8. Representación esquemática de la remodelación ósea en los diferentes grupos del estudio en función del tiempo, al cabo de 4 y 12 semanas.

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



Tabla 5 y figura 9. 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 + CÉLULAS (III)	CRECIMIENTO ÓSEO	REMODELACIÓN ÓSEA
Oveja 1	25%	Apreciable
Oveja 2	25%	Ninguna
Oveja 3	25%	Apreciable
Oveja 4	0%	Ninguna

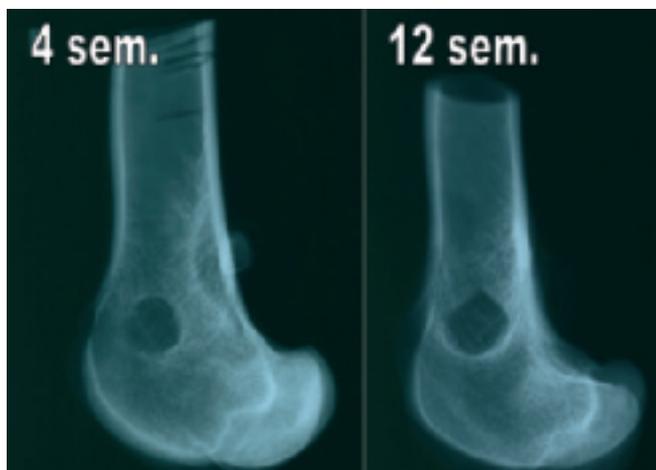


Tabla 7 y figura 11. Arriba, resumen del crecimiento y remodelado óseo en el grupo del PRP y células (III). Abajo, aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo III a las 4 y 12 semanas. Se observa remodelado estimado como apreciable a las 12 semanas.

GRUPO PRP (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 6 y figura 10. 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	25%	Ninguna
Oveja 5	25%	Ninguna



Tabla 8 y figura 12. 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 9 y figura 13. 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 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 11 y figura 15. 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 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 10 y figura 14. 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 + 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 12 y figura 16. 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).

7. DISCUSIÓN

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 mecánica¹.

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 paciente²⁻⁶.

Aceptando la conveniencia de añadir células en los tratamientos de regeneración tisular⁷⁻¹¹, la obtención y el uso de células troncales de la grasa para aquel fin 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*^{12,13}. En este contexto, habiendo desarrollado previamente el método y demostrado que estas células aumentan la regeneración ósea, si bien es sorprendente que cuando se combinan con heteroinjerto su efecto es menor, el análisis de variables radiográficas de remodelación ósea se adivina como un elemento de interés para ratificar la justificación de la técnica.

Los resultados radiográficos de nuestro estudio, pretendiendo demostrar la regeneración ósea cuando se añadían células troncales a injertos y elementos osteoinductores, fueron, en general, decepcionantes. Hedberg¹⁴, 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. Aunque la escasez puede atribuirse al corto tiempo de seguimiento, como también lo han apuntado autores como Aghaloo y cols. y Hatakeyama y cols.^{15,16}, 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, también pudieran deberse a las limitaciones de las lecturas radiográficas por parte del observador. Abundando en la dificultad de la interpretación de las radiografías por la subjetividad del método, con las guías de la escala de Lane y Shandu¹⁷ 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.¹⁸, 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.¹¹, si bien con tiempos de seguimiento de 6 meses. En los de Borden y cols.¹⁹, 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 y obliga al empleo de otros métodos de imagen más específicos o a recomendar el radiográfico al cabo de más tiempo de seguimiento de los implantes.

8. CONCLUSIÓN

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.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2002; 84-A: 454-64.
3. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG *et al*. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat Res.* 1996; 300-9.
4. 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.
5. Vacanti J, Vacanti C. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of tissue engineering*. 13 ed. Oxford: Elsevier, 2007: 3-6.
6. Sancho R, Valera M, Farre J *et al*. Viabilidad celular en un aloinjerto de hueso esponjoso humano criopreservado. *Rev Ortop Traumatol* 2008; 52: 27-31.

7. 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.
8. 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 cleftotomy in rabbits. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2003; 31: 107-14.
9. Kubler N, Michel C, Zoller J *et al.* Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 1995; 23: 337-46.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Saldaña A. Efecto de la implantación de células mesenquimales de tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos en la reparación de defectos cavitarios del fémur en un modelo experimental ovino. *Tesis Doctoral* León, 2010.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop. Clin. North Am.* 1987; 18: 213-25.
18. 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.
19. 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.

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.