

---

**Regeneración ósea por medio  
de células madre en combinación  
con el Carrier Keraos®  
( $\beta$ fosfato tricálcico)**

---

**Antonio López-Valverde Centeno**

**Ayudas a la investigación 2011**

## **Equipo investigador:**

**Investigador responsable**  
**Antonio Lopez valverde y Centeno**

### **Miembros del equipo investigador**

**Joaquín de Vicente Vicente**

**María José Sánchez Ledesma**

**Begoña García Cenador**

**Leticia Blanco Antona**

**Sandra Muntión Olave**

**Rosa Rojo López**

**Antonio Cutando Soriano**

**Juan Carlos Prados Frutos**

**Clemente Muriel Villoria**

## Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACION DEL PROYECTO	4
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	4
3. METODOLOGIA	4
3.1. CELULAS MADRE. OBTENCION Y EXPANSION DE MUESTRAS	5
3.2. FASE QUIRURGICA	5
3.3. PROTOCOLO HISTOLÓGICO	6
3.4. TINCIONES	7
3.5. TÉCNICA FOTOGRÁFICA	7
4. FASES Y DESARROLLO DE LA INVESTIGACION	7
5. RESULTADOS	7
5.1. RESULTADOS RADIOLOGICOS	7
5.2. RESULTADOS ESTUDIO HISTOLOGICO	9
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	11
7. BIBLIOGRAFIA	12

## 1. INTRODUCCION Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Desde que Verfaillie y Prosper describieron la capacidad de ciertas células somáticas adultas (mesenquimales) de generar mediante transdiferenciación células funcionalmente activas de otros tejidos, se abrieron las puertas de la ingeniería tisular. Las estrategias de esta disciplina en la que se han depositado todas las esperanzas de la medicina regenerativa y reparadora, se fundamentan en la combinación de estas células pluripotenciales con materiales artificiales y moléculas bioactivas para inducir la neoformación tisular.

Las grandes reconstrucciones óseas de cabeza y cuello a las que tienen que enfrentarse los cirujanos ortopédicos, orales y maxilofaciales, consecuencia de múltiples patologías (traumáticas, oncológicas, degenerativas o congénitas) les han confinado a un constante peregrinar buscando la técnica más refinada y confiable, tanto desde el punto de vista funcional como estético<sup>4-5</sup>. La multitud de técnicas empleadas (injertos autólogos, alogénicos, xenogénicos o implante de biomateriales sustitutivos) se ha manifestado insuficiente debido a sus limitaciones. Problemas como la morbilidad sobre el sitio donante, los largos tiempos quirúrgicos, la reabsorción del injerto, el deficiente resultado estético, la escasez de tejido o la incapacidad de éste para remodelarse y reaccionar ante condiciones fisiológicas hace necesaria la búsqueda de soluciones en la pericia de un trasplante celular que ofrezca la posibilidad de preformar y conformar grandes estructuras de hueso adaptadas a las necesidades exigidas por el defecto creado.

Las células “stem” mesenquimales (CSM) fueron descritas por primera vez por Friedenstein como células no hematopoyéticas que residen en la médula ósea, con aspecto fibroblástico y características de célula stem: capacidad de auto-renovación, proliferación y con capacidad de diferenciarse a varias líneas de tejido mesodérmico<sup>1,4,5</sup>. A partir de entonces el interés clínico y biológico que han despertado estas células ha ido en aumento, siendo muchos los estudios sobre ellas en los que se han usando diferentes métodos de aislamiento, expansión y caracterización<sup>8-10</sup>. Existen diferentes fuentes celulares en el organismo de las que se pueden obtener MSC: Médula ósea (MO), tejido adiposo (TA), pulpa dentaria, folículo piloso, placenta etc.

Debido a su amplia capacidad de auto-renovación, proliferación, multipotencialidad, propiedades inmunomoduladoras y la capacidad para ser modificadas por técnicas de ingeniería molecular han demostrado que podrían utilizarse para la reparación y regeneración de tejidos tanto en estudios preclínicos como clínicos. Las CSM influyen directamente en la homeostasis del hueso<sup>12,13,15,16,17,19</sup>, por lo que cabe pensar que la pérdida de esta funcionalidad celular pueda tratarse gracias a la aplicación de CSM.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

La utilización de células madre mesenquimales, de procedencia humana, con matrices tridimensionales inducirá una regeneración ósea completa en un defecto cavitario masivo.

### OBJETIVOS

1. Establecer la validez del modelo experimental propuesto.
2. Demostrar, al menos, un 50% de regeneración ósea superior al de métodos sin la utilización de células madre.
3. Sentar las bases para la realización de un ensayo clínico en humanos.

## 3. METODOLOGÍA

Se han empleado 39 ratas Wistar machos, con peso entre 300 y 350 g, estabuladas en condiciones estandarizadas, según la legislación vigente, y alimentadas, ad libitum, con agua y dieta estándar (AØ4, Panlab, Madrid, España), con la siguiente composición: Proteína bruta (17.62% del total), materias grasas brutas (2.50%), celulosa bruta (4.05%), cenizas brutas (4.38%), almidón (43.30%), calcio (0.66%), fósforo (0.49%), sodio (0.14%), humedad (10.54%), lisina (0.85%), metionina (0.29%), vitamina A (7500 UI), vitamina D (1500 UI) y vitamina E (tocoferol) (15 mg). Los animales se sometieron a dieta absoluta, con agua ad libitum, 12 horas antes del experimento correspondiente.

### GRUPOS EXPERIMENTALES

Los 39 animales se han distribuido en un grupo simulado y de inicio, de 9 animales y otro grupo de 30, grupo problema, para el estudio con células madre.

**Grupo 1 simulado:** Una vez realizado un defecto óseo en la extremidad inferior derecha se deja a libre evolución procediendo a su estudio a las 3, 6 y 9 semanas.

**Grupo 2 problema:** En 30 animales el implante de CSM se realizó en el lado derecho y con el carrier βfosfato tricálcico (KeraOss®). El implante del carrier, sin CSM, siempre en el lado izquierdo. Como control se practicó a su vez un defecto óseo sin implante en el lado derecho, a 5mm del de CSM y carrier. Tiempos de estudio a las 3 y 6 y 9 semanas, estableciendo 3 subgrupos (2a, 2b y 2c) de 10 animales cada subgrupo

Todas las técnicas anestésicas y quirúrgicas se han realizado bajo estrictas condiciones de asepsia en campana de flujo laminar. Tras la cirugía, se estabularon los animales hasta la eutanasia y obtención de muestras.

### 3.1. CELULAS MADRE. OBTENCION Y EXPANSION DE MUESTRAS

Las CSM se obtuvieron a partir de células mononucleadas (CMN) de médula ósea de donantes voluntarios sanos. La extracción de médula ósea se realiza bajo anestesia loco-regional, por punción en la espina iliaca postero-superior. Posteriormente las muestras se procesan en el Laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca. Las CMN se obtienen mediante gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque™ Plus (densidad: 1.077k, GE Healthcare Bio-Sciences AB) durante 30 minutos a 500 g, siguiendo el método descrito previamente por Minguell y cols.<sup>15</sup> Las células mononucleadas (CMN) recuperadas de la interfase se lavan 2 veces con medio de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution with Phenol Red, BioWhittaker Lonza Verviers, Belgium) durante 10 minutos a 300g. Finalmente el botón celular se resuspende en 1ml del medio de expansión consistente en: Dulbecco's Modified Eagle's médium-low glucosa (DMEM, Gibco Invitrogen Paisely, UK) suplementado con 5% lisado plaquetario, heparina 2 U/ml y 1% Penicilina 104U/ml/Estreptomicina 104µg/ml (Gibco, Invitrogen, Paisely, UK) y se procede al recuento celular en cámara de Neubauer.

Las CMN se plantan a una concentración de 10<sup>6</sup> CMN/cm<sup>2</sup> con medio de expansión de células stem mesenquimales y se incuban a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Dos veces por semana se cambia la totalidad del medio y las células no adheridas se desechan. Este cultivo se mantiene hasta que se alcanza un 80-90% de confluencia. En este momento, se retira todo el medio de cultivo del frasco, se lava con PBS estéril (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisely, UK) y se incuba con tripsina 0.05% 1X (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisely, UK) durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se neutraliza la tripsina añadiendo medio de expansión de células mesenquimales y las células se vuelven a plantar a una concentración menor con el fin de aumentar el número de células a obtener. Tras el 2º pase se obtienen las células stem mesenquimales de interés que serán utilizadas para los implantes en asociación con el carrier β fosfato tricálcico (KeraOss®). 300-500 mil de CSM en 2º pase se tripinizan y la suspensión celular se pone en contacto con los gránulos de la mezcla que se implantan en la lesión femoral creada en el modelo animal.

### 3.2 FASE QUIRURGICA

**La técnica anestésica** se ha practicado empleando gas isoflurano (Forane, Abbott Laboratories),

#### Técnica quirúrgica:

Se practicó una incisión cutánea longitudinal de aproximadamente 1 cm sobre el cóndilo femoral medial, en ambas patas del animal. Se diseccionó la fascia muscular y el vasto medial para acceder a la región metafisaria del fémur. La rótula proporciona una buena referencia para la identificación del cóndilo femoral. Se desperiostizó la cara

medial de la metáfisis distal del fémur para poder centrar bien el orificio, teniendo presente que el diámetro de los cóndilos es de unos 4 mm y el defecto a crear es de 2 mm (Fig 1). El punto central de la perforación se marcaba con un punzón e inmediatamente se realizaba un primer orificio con una broca de 1 mm de diámetro (Fig 2). Posteriormente, se procedía a fresar con la broca de 3 mm para obtener el defecto óseo deseado.

Una vez que completado el defecto cavitario (Fig 3), se lavaba con abundante suero fisiológico para eliminar los detritus, se secaba el área con una gasa y se colocaba el implante correspondiente.

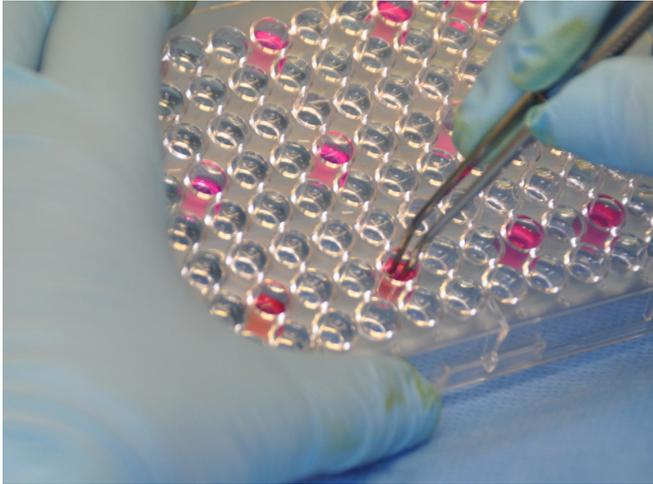
En todos los animales el implante de CSM se realizó en lado derecho y con el carrier. El implante del carrier aislado, sin CSM, siempre en el lado izquierdo. Como control se practicó a su vez un defecto óseo sin implante en el lado derecho, a 5mm del que contenía CSM y carrier (Fig. 4 y 5).



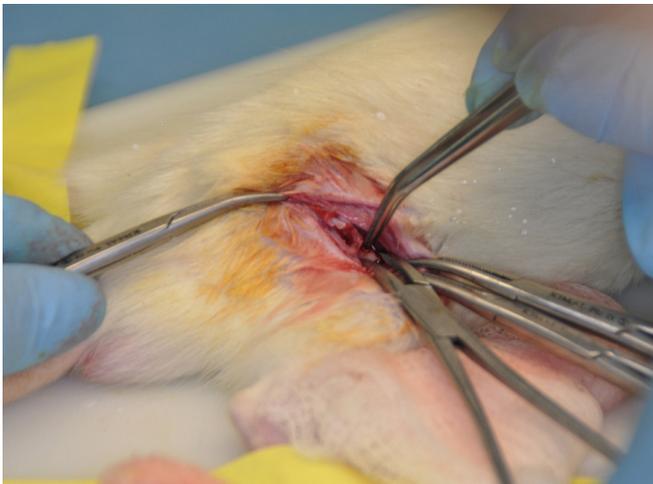
**Figura 1.** Incisión sobre el fémur del animal experimental. Exposición del campo quirúrgico.



**Figura 2.** Realización del defecto óseo empleando fresa de 2 mm Ø.



**Figura 3.** Células mesenquimales preparadas para la mezcla con el carrier.



**Figura 4.** Implante de la mezcla del carrier y las CSM en el defecto óseo.

Finalizada esta fase del procedimiento experimental se procedía a cerrar por planos y estabular los animales de acuerdo al tiempo estimado de evolución antes de realizar la extracción del fémur.

Una vez transcurridos, e, 6 o 9 meses, según el grupo, se procedía a practicar la eutanasia mediante la inyección de sobredosis de pentotal sódico. Se procedió a extraer los fémures, a practicar estudio radiológico en todos los casos y el posterior envío para estudio histológico al Departamento de Anatomía e Histología de la Universidad de Salamanca.

### 3.3. PROTOCOLO HISTOLÓGICO

Tras la práctica de los estudios radiológicos, el material óseo se post fijaba en formol salino al 10%. En el momento en que se iniciaba el procesado de las muestras, no descalcificadas, las piezas óseas se volvían a lavar con agua y se realizaba un serrado macroscópico en porciones que incluían hueso normal, hueso neoformado y material implantado. Las porciones óseas se introducían

en casetes y se deshidrataban empleando disoluciones de graduación creciente de etanol (70, 80, 90 y 95), estando embebidas cada día en una de las disoluciones, hasta llegar a etanol absoluto, donde permanecían dos días.

#### **Inclusión:**

Se procedió a la inclusión de las muestras en metilmetacrilato en estado líquido durante 15 días a 4°C en agitación.

#### **Componentes del metil metacrilato:**

§ 800mL M-metacrilato (monómero estabilizado de hidroquinona).

§ 160mL Nonifenol poliglicol-éter acetato (Plastoid N).

§ 16mL Dibutil-ftalato.

§ 40gr Peróxido de benzoilo (este catalizador se adiciona de inmediato).

Se introducían los tubos de vidrio en la estufa a 32°C para su polimerización durante 5 y 6 días. Seguidamente se rompía el tubo de vidrio quedando el bloque polimerizado con la muestra ósea, que se cortaba con sierra de cinta para desbastar la muestra, antes de realizar los cortes definitivos.

#### **Corte de las muestras:**

Tras cortar el bloque para conseguir un tamaño que permitiera su manejabilidad, se lijaba y se colocaba en el microtomo (Microm HM 350 S)

Los cortes de 5 µm se colocaban sobre un portaobjetos previamente gelatinizado con gelatina de Haupt. Los portaobjetos se lavaban en soluciones decrecientes de alcohol (100 → 70%) hasta agua destilada. Por último, se procedía a la tinción de las muestras.

#### **Gelatinizado de portaobjetos:**

Composición gelatina de Haupt:

§ 1gr de gelatina.

§ 100mL de agua destilada.

§ 15mL de glicerina.

§ 2gr de fenol.

Pasos a seguir:

Calentar el agua a 55°C y echar la gelatina.

Cuando se enfríe añadir la glicerina y el fenol.

Para gelatinizar el porta se pone una gota de gelatina sobre él y se extiende ayudándonos con otro porta.

### 3.4. TINCIONES

Las microfotografías que se presentan en este trabajo están realizadas con las técnicas que se exponen a continuación, por lo que se obviará su descripción en cada una de las figuras presentadas.

#### Tricómico de Goldner

- Hematoxilina férrica de Weigert 5': formada por dos compuestos: Weigert A (concentrada x2): Hematoxilina (2gr) + Alcohol 96° (100mL). Weigert B: Percloruro de hierro (1,16gr)
- HCl (10mL) + Agua destilada (5mL): 1mL
- Agua destilada 98mL.  
Mezclar a partes iguales las soluciones A y B sólo antes de su uso.
- Agua corriente 10'.
- Ponceau de xilidina 40': 200mL agua destilada; 2gr Ponceau de xilidina; 0,4mL ácido acético glacial; 1gr fucsina ácida.
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Diferenciar en ácido fosfotungstico-Orange G 10': 200mL agua destilada; 2gr ácido fosfotungstico; 1gr orange G
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Verde luz 15': 200mL agua destilada; 0,4gr verde luz; 0,4mL ácido acético glacial
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Deshidratar y montar.

#### Von Kossa

- Nitrato de plata al 3%, 5 min.
- Agua destilada x2 veces, 5 min.
- Formol-carbonato de sodio, 5 min: 10mg de carbonato de sodio; 150mL de agua destilada; 50mL de formaldehído al 37%.
- Agua corriente 10 min.
- Sulfato de sodio al 5%, 5 min.
- Agua corriente, 10 min.
- Ponceau de xilidina 45 min.
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Diferenciar en ácido fosfotungstico-Orange G 15 min.
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Deshidratar y montar.

### 3.5. TÉCNICA FOTOGRÁFICA

Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas se captaron utilizando una máquina fotográfica Nikon digital Sight DS-smc acoplada a un microscopio óptico Nikon eclipse 90i.

## 4. FASES Y DESARROLLO DE LA INVESTIGACION

A fecha 1 de octubre de 2012 (tal y como informamos en la memoria correspondiente) se había realizado la fase quirúrgica y alojado los implantes en todos los animales de los grupos simulado (9 animales) y problema (30 animales). Debido a que el estudio comenzó a finales de Junio, una vez que pudimos disponer de recursos económicos, decidimos acortar el tiempo de evolución en lo posible, sin perjudicar el objetivo del estudio. De esta forma, se había realizado la eutanasia del grupo simulado en su totalidad y de los subgrupos problema, de evolución 3 y 6 semanas. Quedaba pendiente la eutanasia del subgrupo problema de evolución 9 semanas. Se había realizado estudio radiológico en todos los animales eutanasiados y se habían enviado las muestras correspondientes para realizar el estudio histológico y valorar el grado de regeneración ósea al Departamento de Anatomía e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca. Por problemas de presupuesto y estableciendo prioridades, se decidió obviar por el momento la toma de muestras de sangre para análisis de marcadores y estudio de densitometría.

A principios de diciembre de 2012 se habían practicado todas las eutanasias del subgrupo problema de evolución 9 semanas. Se había realizado el estudio radiológico y enviado todas las muestras para el estudio histológico. El departamento de Anatomía e Histología ha elaborado unos resultados preliminares en la fecha de esta memoria, pendientes de la valoración de todas las muestras enviadas en un mes. Pendiente también la elaboración final de los resultados. Debido a que comenzamos a finales de Junio, ésta será aproximadamente la fecha en que tendremos una valoración final y los resultados definitivos.

## 5. RESULTADOS

Nos referiremos a los resultados preliminares del estudio haciendo referencia en primer lugar a los resultados radiológicos y a continuación a los histológicos.

### 5.1. RESULTADOS RADIOLOGICOS

El estudio radiológico, practicado mediante radiología simple de los fémures de los animales experimentales, muestra diferencias entre los fémures izquierdos y derechos del mismo animal.

Una vez analizadas todas las radiografías de los especímenes, observamos un número significativo de fracturas en los fémures en diferentes zonas, tanto en la zona operatoria con carrier y células madre como en zonas de defecto crítico, recogiendo más fracturas en el fémur derecho, correspondiendo a un 65 %.

Se colocaron las células madre mesenquimales siempre en el fémur derecho, pero las fracturas observadas en este lado no siempre coinciden en la misma zona operatoria. Sólo el 35 % de las fracturas corresponden con la zona en la que se colocaron las CSM con el carrier. La mayor parte de las fracturas que se observan radiográficamente no corresponden con la zona operatoria, sino con el defecto crítico realizado como control (Fig. 5,6,7,8,9). Radiográficamente se observa además un incremento significativo del volumen del callo de fractura en los fémures derechos (tratados con células madre).



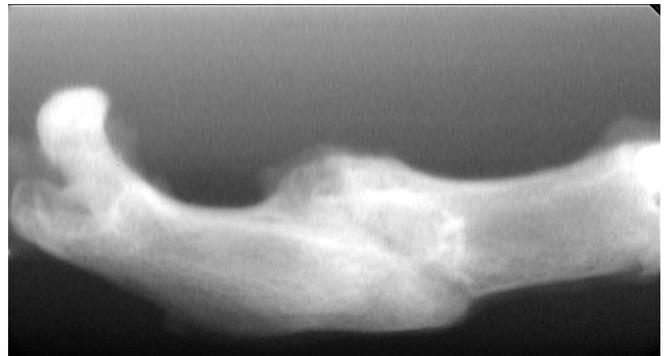
**Figura 5.** Fractura muy próxima al cóndilo femoral del espécimen nº 7 (grupo 2a) lado derecho. Se observan restos del carrier en el borde de la fractura. En la parte más distal de la fractura se observa el orificio control.



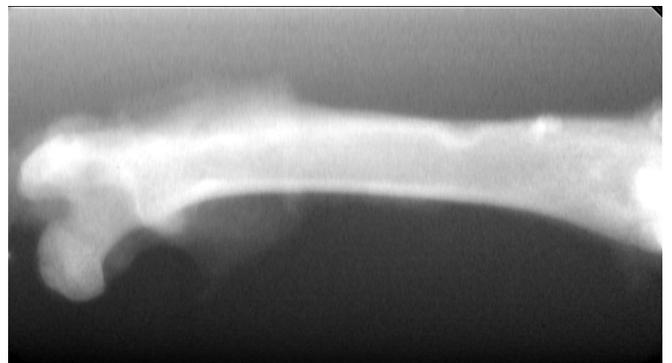
**Figura 6.** Fractura distal al carrier, coincidiendo con el orificio de fractura crítica (especimen nº 21, grupo 2a, lado derecho).



**Figura 7.** Se observa fractura completa del fémur en la que no se observa el carrier (especimen nº 29, grupo2b, lado derecho).



**Figura 8.** Callo óseo del espécimen nº 6 ( grupo 2c) lado derecho.



**Figura 9.** Especimen nº 4 (grupo 2a) lado izquierdo. Se observan los dos lechos operatorios: Uno de control (proximal) y el otro con el carrier (distal)

## 5.2. RESULTADOS ESTUDIO HISTOLÓGICO

Para el estudio histológico y su valoración se han analizado las muestras considerando varios grupos: Un primer grupo que incluye las perforaciones corticales controles sin adición de carrier ni células madre y otros 3 grupos problema (2a, 2b y 2c) definidos por el tiempo transcurrido hasta la eutanasia y toma de muestras (3, 6 y 9 semanas)

### Grupo perforaciones corticales controles

A las tres semanas se ha rellenado la cavidad a expensas de hueso trabecular con abundantes espacios rellenos de médula ósea. Los fenómenos regenerativos óseos ocupan no solo el espesor correspondiente al hueso diafisario sino además parte de la cavidad medular adyacente. Los mismos hallazgos se comprueban a las 6 y 9 semanas (Fig. 10 y 11)

### Grupo 2<sup>a</sup>

Este grupo está constituido por aquellos animales a los que se les administró en una de las perforaciones, bien el carrier o bien el carrier más células madre, sacrificados a las tres semanas de la intervención.

Los animales a los que se les rellenó la cavidad con el carrier muestran en los cortes histológicos acúmulos de cemento rodeados en algunos segmentos por una fina franja de hueso y en otros tejido conectivo (Fig.12 y 13). En aquellas zonas donde el cemento se encuentra delimitado por hueso neoformado (Fig.12), éste presenta continuidad directa con el cemento, sin tejido conectivo interpuesto (Fig.12 y 13), y presenta focalmente signos de actividad (Fig.13) (sustancia osteoide, indicadora de actividad osteosintética). En las zonas donde el cemento está en contacto con el tejido conectivo es posible identificar macrófagos con gránulos de cemento en su interior (Fig. 13). No se observaron signos inflamatorios a parte de los macrófagos, no se encontraron células multinucleadas y la médula ósea hematopoyética vecina no presentaba alteraciones relevantes.

Los defectos óseo tratados con carrier y células madre no presentaron diferencias significativas respecto a las cavidades que se trataron con carrier solo. Se demuestran áreas con tejido conectivo y también con actividad osteosintética, si bien en grado idéntico al grupo anterior. No se observaron signos de actividad inflamatoria, ni células multinucleadas, ni tampoco fenómenos de necrosis, mientras que la médula ósea adyacente no presentaba alteraciones relevantes (Fig. 14,15 y 16).

### Grupo 2b

Está formado por los animales a los que se les administró en la lesión quirúrgica, bien el carrier o bien el carrier más células madre y fueron sacrificados a las seis semanas.

Las imágenes histológicas correspondientes a este grupo muestran que las zonas de hueso que rodean a los acúmulos de cemento presentan en algunas áreas un mayor

espesor. En algunas áreas el cemento contacta con tejido conectivo. El hueso neoformado, en contacto directo con el cemento, es de tipo trabecular. A igual que en los grupos anteriores, no se observaron alteraciones inflamatorias ni medulares relevantes (Fig. 17 y 18 )

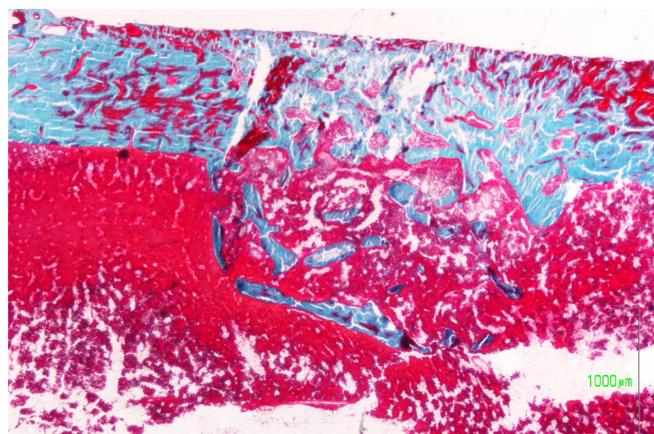
### Grupo 2c

Grupo constituido por aquellos animales a los que se les administró el carrier o bien carrier más células madre y fueron sacrificados a las nueve semanas de la intervención.

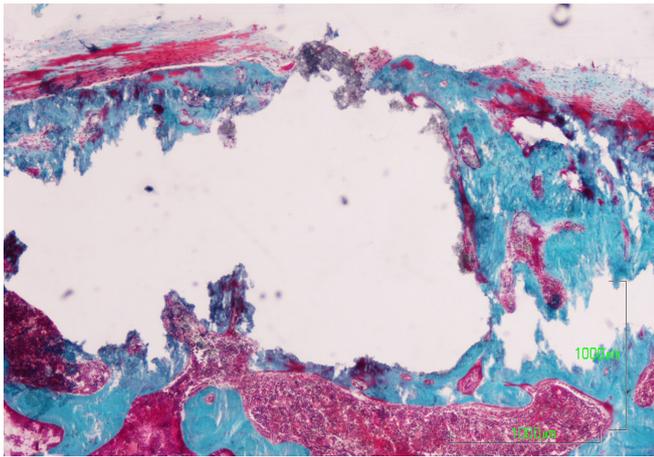
En los animales pertenecientes a este grupo, independientemente de la administración del carrier o carrier más células madre, el comportamiento histológico fue similar al grupo anterior. Persisten los acúmulos de cemento en la cavidad medular rodeados por una franja de tejido óseo neoformado. En algunos puntos persiste el tejido conectivo en contacto con el cemento si bien la mayoría del área periférica de los acúmulos de cemento está envuelta por tejido óseo (Fig. 19 y 20). No existen signos inflamatorios y la médula hematopoyética adyacente no presenta alteraciones.



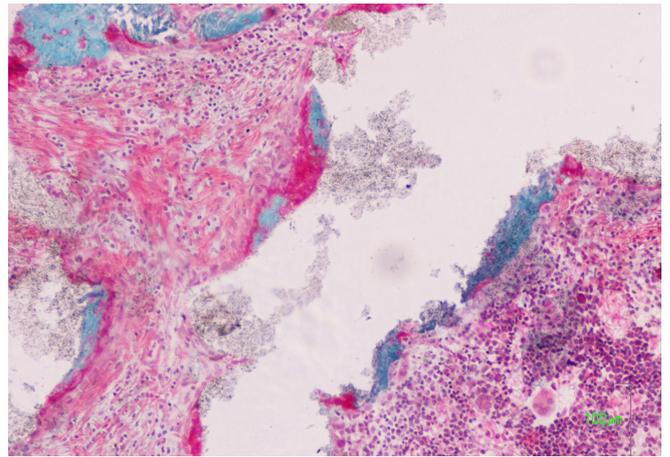
**Figura 10.** Reparación del defecto óseo sin administración de los productos problema. El hueso cortical diafisario del fémur se ha reemplazado por un hueso trabecular hipertrófico que hace protrusión en la cavidad medular. Von Kossa. 3 semanas postoperatorio.



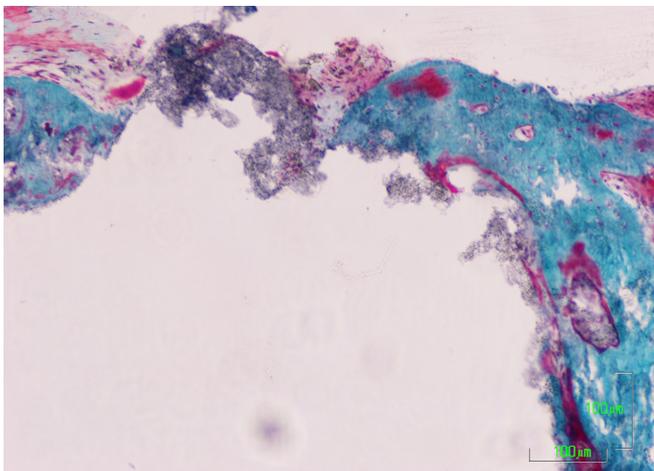
**Figura 11.** Reparación del defecto óseo sin administración de productos problema. El hueso cortical está reemplazado por hueso trabecular inmaduro hipertrofico. Tricrómico de Goldner. 3 semanas postoperatorio.



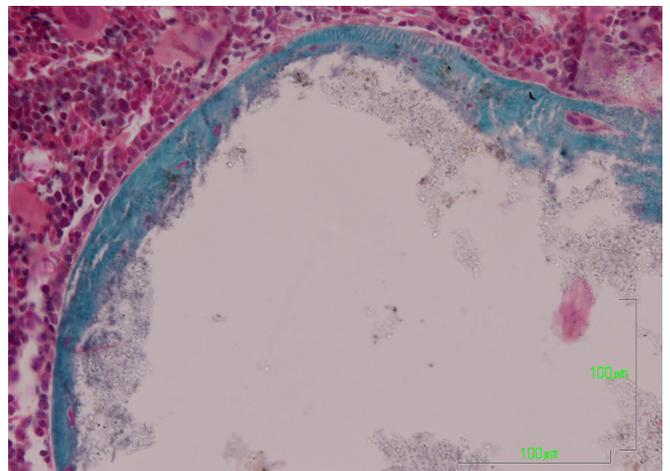
**Figura 12.** Imagen de la cortical diafisaria con el carrier de color pardo, osteointegrado, rodeado por una capa fina de hueso neoformado. Grupo simulado. 3 semanas de evolución Tricrómico de Goldner.



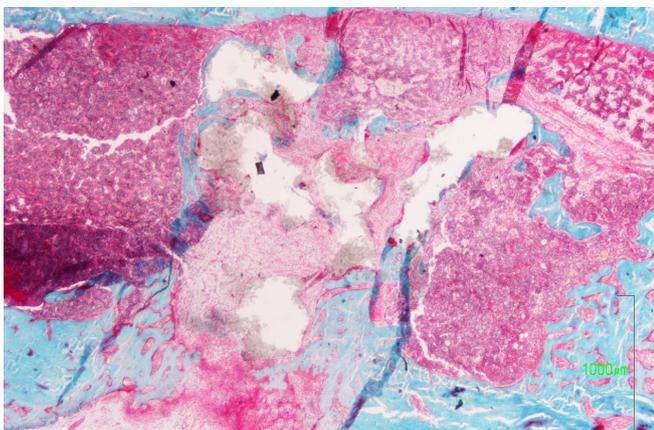
**Figura 15.** Detalle que ilustra la osteointegración del cemento (color azul ), la relación con tejido conectivo y finalmente la actividad sintética ósea como franjas de color rojo intenso. 3 semanas evolución. Tricrómico de Goldner



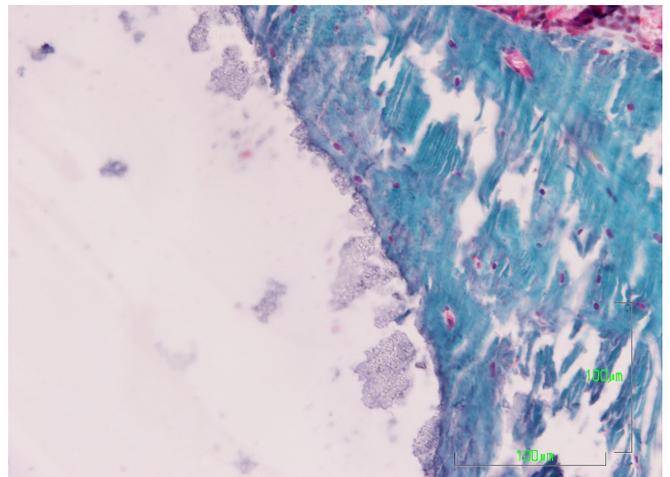
**Figura 13.** Detalle de la fotografía anterior que muestra la superficie cortical ocupada parcialmente por el carrier, así como algunos macrófagos con fragmentos de cemento en su citoplasma. El hueso adyacente presenta una delgada banda de sustancia osteoide de color rojo. 3 semanas de evolución. Tricrómico de Goldner.



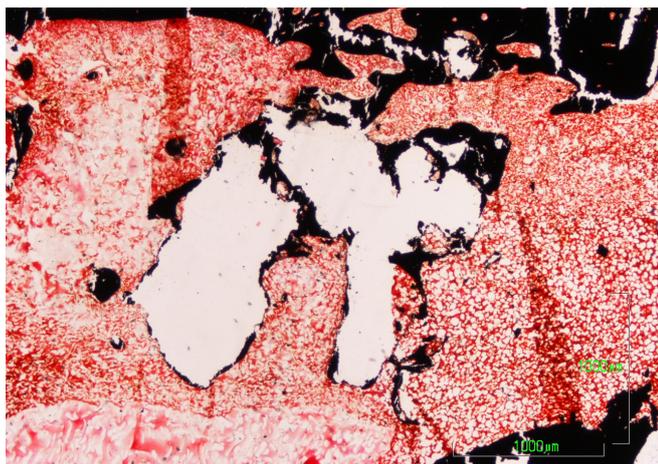
**Figura 16.** Área de carrier recubierta por una fina capa de hueso neoformado, sin signos de actividad sintética en un animal tratado con cemento y células madre. 3 semanas evolución. Tricrómico de Goldner.



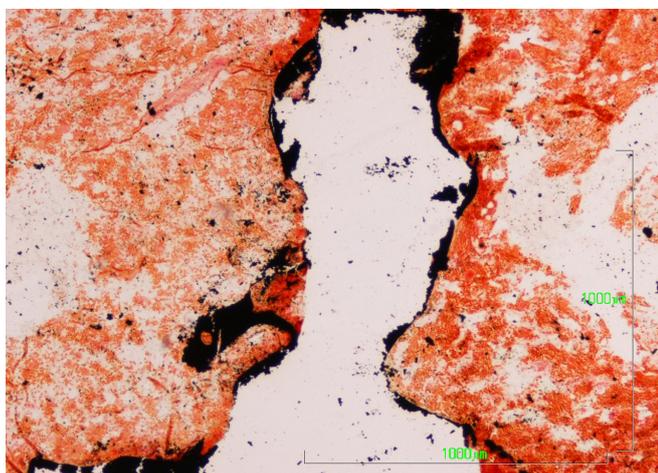
**Figura 14.** Panorámica de la diáfisis femoral en una cavidad tratada con carrier y células madre. Se observan acúmulos de cemento rodeados por hueso teñido de azul en algunas zonas y por conectivo en otras áreas. La médula ósea hematopoyética adyacente no presenta alteraciones significativas. 3 semanas evolución. Tricrómico de Goldner.



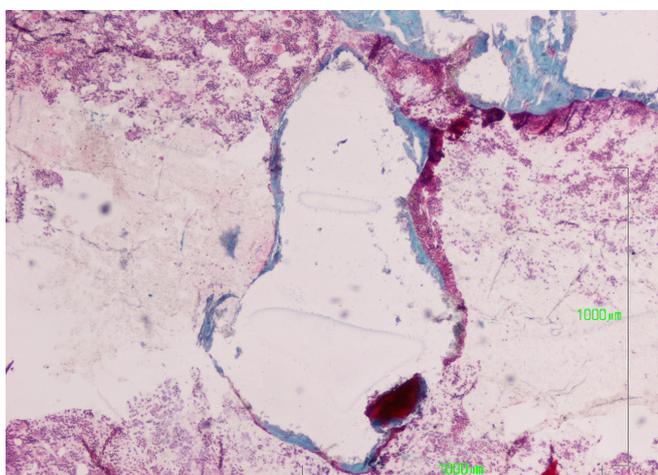
**Figura 17.** Detalle que muestra la osteointegración del material sin transición de tejido conectivo entre Kera-OSS y el hueso neoformado adyacente. Grupo 2b, 6 semanas evolución. Tricrómico de Goldner.



**Figura 18.** Panorámica que muestra la osteointegración de Kera-OSS más células madre. El carrier se observa rodeado por una fina capa de hueso neoformado. Médula ósea hematopoyética sin alteraciones. Grupo 2b, 6 semanas de evolución. Von Kossa.



**Figura 19.** Panorámica con la técnica de Von Kossa, que muestra el cemento rodeado por una fina franja de tejido óseo neoformado, aunque en algunas zonas se conserva la relación del Kera-Oss con el tejido conectivo y la médula adyacente. Grupo 2c, 9 semanas de evolución. Von Kossa.



**Figura 20.** Panorámica de un caso con Kera-Oss y células madre que muestra la envoltura del carrier por tejido óseo neoformado de espesor similar al presente en la fotografía anterior. Grupo 2c, 9 semanas evolución. Técnica de Goldner.

## 6. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En síntesis, los resultados preliminares de este trabajo no permiten afirmar diferencias de comportamiento biológico significativas en este modelo experimental, entre los animales a los que se les administró el carrier Kera-OSS y el mismo carrier más células madre, ni tampoco al comparar estos mismos grupos con los controles de cavidad vacía. Aunque se demuestra actividad osteosintética en el caso de asociación del carrier con células madre, los estudios histológicos no permiten afirmar que esta actividad sea especialmente relevante. Por otra parte, no se han observado fenómenos inflamatorios marcados a excepción de los macrófagos encontrados en las primeras etapas, a las 3 y 6 semanas, y tampoco se han evidenciado células multinucleadas. El hueso neoformado en torno al carrier administrado no presenta actividad sintética en la etapa más tardía, esto es a las 9 semanas.

Estos hallazgos están en consonancia con algunas de las últimas publicaciones<sup>11,22</sup>. Al respecto, Vahabi y cols<sup>22</sup> recogen que no existen cambios en la regeneración ósea obtenida en un modelo canino en alveolos postextracción, tanto con células madre en asociación con el carrier Betafosfato tricálcico como empleando el carrier Bio-OSS, siempre comparando con un grupo control con cavidad vacía.

Sin embargo, los resultados iniciales de nuestro estudio orientan hacia la utilización de un carrier en condiciones distintas a las empleadas, tal y como se afirma en otras publicaciones<sup>2,3,14,21</sup>, que muestran como la actividad regenerativa de las células madre en el fémur de la rata es significativa cuando se utilizan asociaciones con factores de crecimiento y plasma rico en plaquetas

En definitiva, es necesario no solamente completar los hallazgos y conclusiones de nuestro estudio, aun pendiente de resultados de inmunohistoquímica, sino que es preceptivo realizar nuevas investigaciones perfeccionando el modelo experimental y fundamentalmente adaptando el carrier a los requerimientos en este caso de las células madre. Parece imprescindible encontrar un carrier apropiado para las MSCs con una degradación óptima y una superficie osteoconductiva, sobre el cual la regeneración del hueso pueda tener lugar. De hecho sigue siendo un reto alcanzar el equilibrio correcto entre las propiedades biológicas y físicas del material de soporte.

A pesar de que existen numerosos estudios demostrando el potencial de las MSCs<sup>1-10,12-13,15-17,19,20</sup> en el momento actual se pone en tela de juicio la calidad de muchas de estas publicaciones y de los resultados obtenidos<sup>18</sup> dejando en evidencia que es necesario potenciar la investigación en fase experimental para poder dar el paso a la aplicación de la técnica en humanos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Akita S, Fukui M.; Ectopic bone formation by Human Mesenchymal Stem Cells and osteogenic cytokines in a nude rat superficial Epigastric flap model. *Japanese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 2004; 47: 983-92.
2. Behnia H, Khojasteh A, Kiani MT, Khoshzaban A, Abbas FM, Bashtar M, Dashti SG. Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silicagel platelet rich in growth factor, and mesenchymal stem cell: A histological study in rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2012; 115:7-15.
3. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40:2-7.
4. Brooke G, Cook M, Blair C et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin. Cell Dev.Biol*. 2007;18:846-858.
5. 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; 8:315-317.
6. Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographical animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet rich plasma. *International Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 2002; 31: 281-6.
7. Forbes S J, Vig P, Poulosom R, Wright NA, Alison M R. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)*, 2002, 103(4): 355-69.
8. Fukui M, Akita S, Akino K. Ectopic bone formation facilitated by human mesenchymal stem cells and osteogenic cytokines via nutrient vessel injection in a nude rat model. *Wound repair and regeneration*, vol. 13, 2005, 3: 332-340.
9. Gimble J M, Guilak F. Differentiation potential of adipose derived adult stem cells. *Curr Top Dev Biol*, 2003, 58:137-60.
10. Gu F, Amsed B, Neufeld R. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *J Control Rel*, 2004; 96: 463-72.
11. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, Houshmand B. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:14-24
12. 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.
13. Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, Schwartz R E, Keene C D, Ortiz-Gonzales X R, Reyes M, Lenvik T., Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W C, Largaespada D A, Verfaillie C M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* vol.418, 2002: 41-49.
14. Khojasteh A, Baghaban Eslaminejad M, Nazarian H, Morad G, Dashti SG, Behnia H, Stevens M. Vertical bone augmentation with simultaneous implant placement using particulate mineralized bone and mesenchymal stem cells: A preliminary study in rabbit. *J Oral Implantol*. 2011 May 13.
15. Kruyt MC. Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats. *Tissue Engeneering*, 2003. 9(2): 327-36.
16. Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. 2 ed. San Diego: Academic Press, 2000.
17. Lennon DP, Haynesworth SE, Arm DM, Baber MA, Caplan AI. Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Dev Dyn*. 2000; 219: 50- 62.
18. Mangano FG, Tettamanti L, Sammons RL, Azzi L, Caprioglio A, Macchi A, Mangano C. : Maxillary sinus augmentation with adult mesenchymal stem cells: a review of the current literature. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol (in Press)*, 2013
19. Marie PJ, Fromigue O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen.Med*. 2006;1:539-548.
20. Minguell JJ, Erices A, Conget P.: mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med (Maybood)* 2001; 226: 507-520
21. Rai B, Teoh SH, Ho KH. An in vitro evaluation of PCL-TCP composites as delivery systems for platelet rich plasma. *J Controlled Release* 2005; 107:330-342.
22. Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar MA, Mofeed R, Mashhadi A, Aghaloo M, Sharifi D, Jabbareh L. A comparison between the efficacy of Bio-Oss, Hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration. *Chang Gung Med J*. 2012 Jan-Feb;35(1):28-37.