



## Evolución radiográfica del implante de células mesenquimales de tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos en la reparación de defectos óseos. Estudio experimental en ovejas

Implant of adipose tissue-derived mesenchymal cells differentiated to osteoblasts in the repair of bone defects. Experimental study in sheep

Saldaña Díaz A<sup>1</sup>, Ramos Pascua LR<sup>1</sup>, López Laguna M<sup>2</sup>, Iglesias Muñoz FJ<sup>2</sup>, Gonzalo-Orden M<sup>4</sup>, Rodríguez Altónaga JA<sup>4</sup>, González Celador R<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial Universitario de León. <sup>2</sup> Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco, León. <sup>3</sup> Departamento de Medicina y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. <sup>4</sup> Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de León

### Resumen

**Objetivo:** Examinar la evolución radiográfica del implante de células mesenquimales derivadas de la grasa y diferenciadas a osteoblastos en defectos cavitarios del fémur ovino.

**Material y metodología:** Se realizó un defecto cavitario en el cóndilo medial femoral bilateral en 22 ovejas de raza Asaaf, de 3-5 años. Se implantaron células troncales mesenquimales obtenidas del tejido graso diferenciadas a osteoblastos, plasma rico en plaquetas y heteroinjerto de hueso liofilizado. Se realizaron controles radiográficos a las 4 y 12 semanas, evaluando el crecimiento óseo según la escala de Lane y Shandu.

**Resultados:** En ninguno de los grupos hubo formación o crecimiento óseo mayor del 25%. Se observó un mayor crecimiento óseo a las 12 semanas que a las 4 semanas no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

**Conclusiones:** El control radiográfico de la evolución de defectos óseos cavitarios tratados con células troncales diferenciadas a osteoblastos no es un método fiable ni a las 4 ni a las 12 semanas del implante.

**Palabras clave:**

Células troncales mesenquimales, defecto óseo cavitario, plasma rico en plaquetas.

### Abstract

**Objetivo:** To investigate the radiographic progress of the implant of adipose tissue-derived mesenchymal cells differentiated to osteoblasts in cavitary defects of sheep femur.

**Patients and methods:** A cavitary defect was performed in the bilateral medial femoral condyle in 22 Asaaf sheep aged 3-5 years. Mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue, differentiated into osteoblasts, platelet-rich plasma and lyophilised bone heterograft, were implanted. Radiographic controls were performed at 4 and 12 weeks, evaluating bone growth according to the Lane and Shandu scale.

**Results:** Bone formation or growth were not greater than 25% in any of the groups. A greater bone growth was seen at 12 weeks than at 4 weeks, with no statistically significant differences between the groups.

**Conclusions:** Radiographic control of the progression of cavitary bone defects treated with stem cells differentiated to osteoblasts is not a reliable method at 4 or at 12 weeks of implantation.

**Key words:**

Mesenchymal stem cells, cavitary bone defect, platelet-rich plasma.

### Correspondencia

A. Saldaña Díaz  
Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología  
Complejo Asistencial Universitario de León  
Altos de Nava s/n. 24071 León  
ansaldiaz@gmail.com



## Introducción

El mejor sustitutivo para reparar un defecto óseo es el injerto autólogo de hueso esponjoso, por sus propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras, aunque está limitado por su escasa disponibilidad y la morbilidad propia de su obtención. Por ello, en las últimas décadas ha cedido terreno en favor del aloinjerto y de los sustitutivos óseos sintéticos [1]. Con una finalidad parecida se ha desarrollado la ingeniería tisular, entendida como la creación o inducción de la formación de un tejido específico, en una localización específica, por medio de la manipulación y selección de células, matrices y estímulos biológicos [2].

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society Cellular Therapy, ISCT) propuso tres criterios para definir las células troncales mesenquimales (MSC): debían ser adherentes en cultivo; expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos, como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B, y ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo. Adicionalmente, mostrarían la posibilidad de autorrenovarse, de desarrollarse en múltiples líneas celulares y de proliferar sin límite [3].

Uno de los tejidos de donde pueden obtenerse estas células es el adiposo. El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica embrionaria y contiene un estroma fácil de aislar, con adipocitos, células estromales y células troncales [4][5]. Estas células pueden ser aisladas mediante digestión enzimática del tejido y separadas de los adipocitos maduros por centrifugación. Esta población, denominada células madre o estromales derivadas del tejido adiposo (ADSCs), comparten muchas de las características de las células madre de la médula ósea, incluyendo el elevado potencial de proliferación y la habilidad para la diferenciación multilínea. También se las conoce como células madre adultas derivadas del tejido adiposo (ADAS), células estromales adultas derivadas del tejido adiposo, células estromales adiposas (ASC), células madre adiposas mesenquimales (ADMSC), lipoblastos, pericitos, preadipocitos, células procesadas del lipoaspirado (PLA), y como «células madre derivadas del tejido adiposo» (ASCs), que es como la Sociedad Internacional para las Aplicaciones Tecnológicas de la Grasa ha decidido que se las conozca, con la particularidad de la multipotencialidad y adherencia al plástico [6].

En el presente trabajo pretendemos estudiar la evolución radiográfica del efecto osteogénico que las células troncales derivadas de la grasa y diferenciadas a osteoblastos, como hemos demostrado previamente, tienen. [7].

## Material y método

Realizamos un estudio experimental prospectivo utilizando 22 ovejas de raza Asaaf, con un peso comprendido entre 50 y 70 kg y una edad de 3-6 años, cumpliendo la normativa al respecto del manejo ético de los animales de experimentación. Se excluyeron 3 ovejas, una por pérdida involuntaria de la muestra (oveja C2) y dos por fallecimiento durante el periodo de seguimiento, debido a sendas anorexias que ocasionaron una disbiosis intestinal, con toxemia y exitus (ovejas VII y XI). Con todo, el material final del estudio fueron 19 ovejas, de las que se obtuvieron el doble de muestras como unidad de estudio (defecto en el cóndilo femoral interno).

Se establecieron 8 grupos, incluyendo el control (grupo I) y otros siete en los que se implantaron diferentes «construcos» (plasma rico en plaquetas -PRP-, células mesenquimales troncales derivadas de la grasa sin diferenciar -ADMSC- y diferenciadas a osteoblastos -ADMSC0- y un chip de heteroinjerto óseo) (Tabla 1).

En todos los animales se obtuvo y procesaron muestras de tejido adiposo de las que se aislaron células troncales mesenquimales que se cultivaron y expandieron. Se indujo su diferenciación osteogénica, se caracterizaron y se demostró su multipotencialidad. En todos los animales se creó un defecto óseo cavitario que se rellenó con los diferentes implantes según el grupo de estudio. Tras el sacrificio del animal a las 4 y 12 semanas, se realizaron estudios radiográficos y se analizaron las variables decididas.

### 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

Tabla 1. Grupos del estudio

Grupo	Descripción	Nº de defectos
I	Control	6
II	PRP	6
III	PRP + ADMSC	4
IV	PRP + ADMSC-0	5
V	Heteroinjerto óseo	4
VI	Heteroinjerto óseo + PRP	4
VII	Heteroinjerto óseo + ADMSC-0	4
VIII	Heteroinjerto óseo + PRP + ADMSC-0	5

(PRP = plasma rico en plaquetas; ADMSC = células mesenquimales no diferenciadas; ADMSC-0 = células mesenquimales diferenciadas).



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.

#### 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.

#### Preparación del plasma rico en plaquetas (PRP).

Una vez tranquilizado y anestesiado el animal de experimentación, antes de la generación del defecto óseo se reco-

gió 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 el 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 [8], centrado en el cóndilo medial de los fémures de cada una de las ovejas, donde se implantó el constructo decidido en cada grupo del estudio. Para el recubrimiento final de las lesiones se utilizó un parche sintético.

En todos los casos y controles se realizó un control radiográfico inmediatamente después de cada intervención y a las 4 y 12 semanas, según el momento del sacrificio del animal. Todas las radiografías se realizaron con una distancia focal de 100 cm, 42 KV, 36 mAs, empleando placas de mamografía de grano fino (Min-RS, Kodak®). Las radiografías fueron digitalizadas para facilitar la interpretación de las imágenes e interpretadas por el mismo investigador aplicando la escala de Lane y Sandhu [9], valorando el porcentaje de formación ósea y el remodelado óseo (Tabla 2) (Tabla 3) (Figura 1).

#### Estadística

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).

**Tabla 2.** Formación ósea en el defecto femoral (%)

% de formación ósea	Valor
Ninguno	0
25%	1
50%	2
75%	3
100%	4

**Tabla 3.** Valores de la remodelación ósea

Remodelación ósea	Valor
Ninguna	0
Apreciable	2
Completo	4

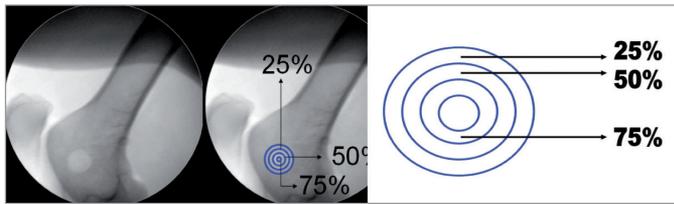


Fig. 1. Esquema de los círculos concéntricos estimados para el cálculo del % de formación ósea.

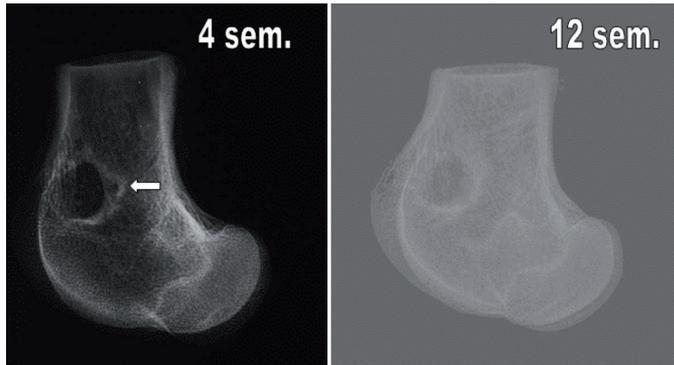


Fig. 2. Aspecto radiográfico de un defecto óseo de 2 animales del grupo VIII, a las 4 y 12 semanas. A las 4 semanas se observan los puntos transóseos de la fijación del parche (flecha).

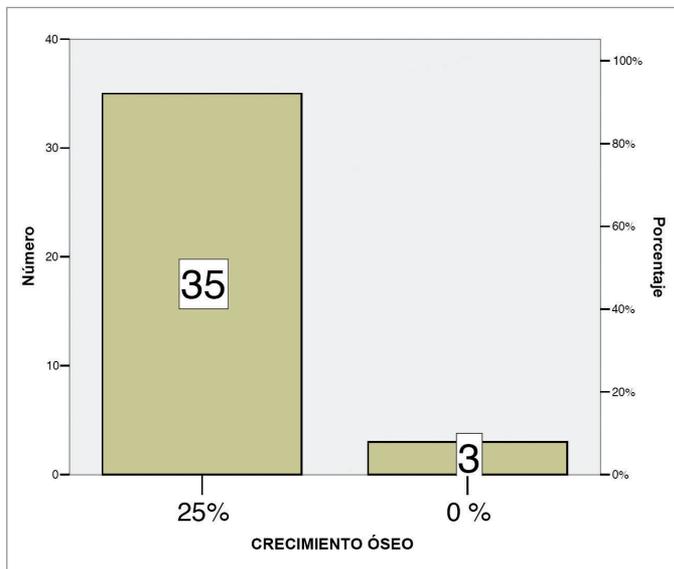


Fig. 3. Representación esquemática del crecimiento óseo general en los animales del estudio.

## Resultados

En ninguno de los grupos del estudio hubo formación o crecimiento óseo mayor del 25%. En los grupos donde no se implantaron células troncales mesenquimales diferenciadas a osteoblastos o heteroinjerto, con la asociación o

no de plasma rico en plaquetas, no hubo crecimiento óseo a las 4 semanas en un 20 % de los casos (Figura 2). No obstante, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. A las 12 semanas, aunque se objetivaron mejores resultados, no hubo diferencias significativas con los resultados observados a las 4 semanas en los diferentes grupos del estudio (Figura 3) (Figura 4) (Figura 5).

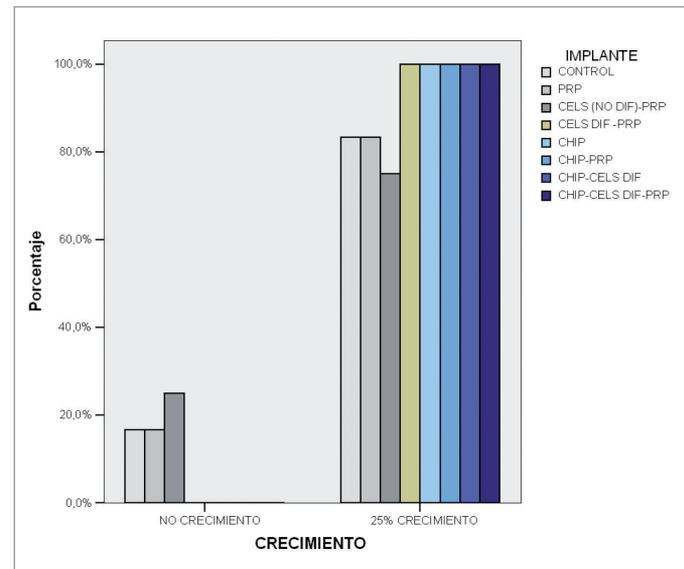


Fig. 4. Representación esquemática del crecimiento óseo en los grupos del estudio.

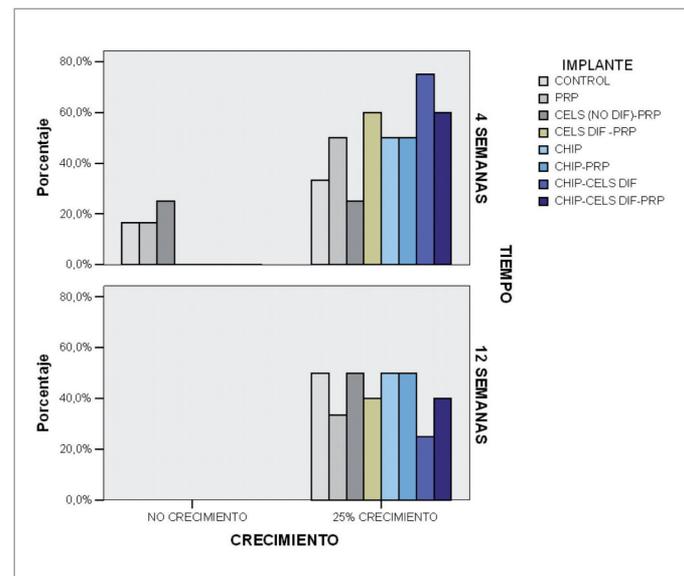


Fig. 5. Representación esquemática del crecimiento óseo en los diferentes grupos del estudio en función del tiempo, al cabo de 4 y 12 semanas.

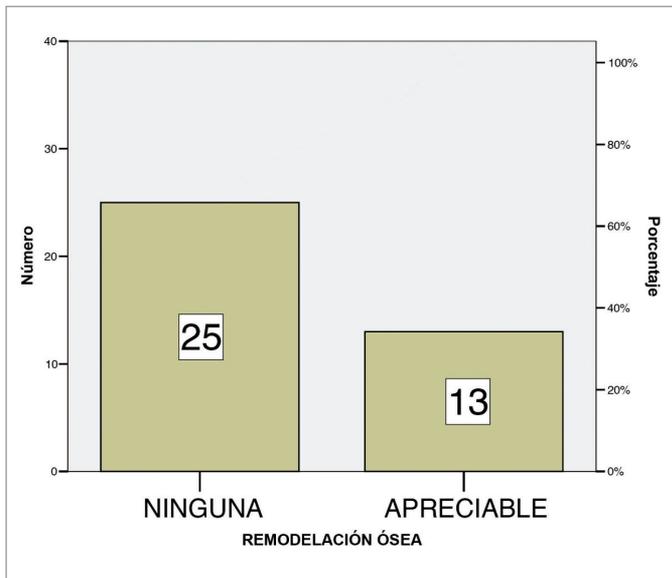


Fig. 6. Representación esquemática de la remodelación ósea general en los animales del estudio.

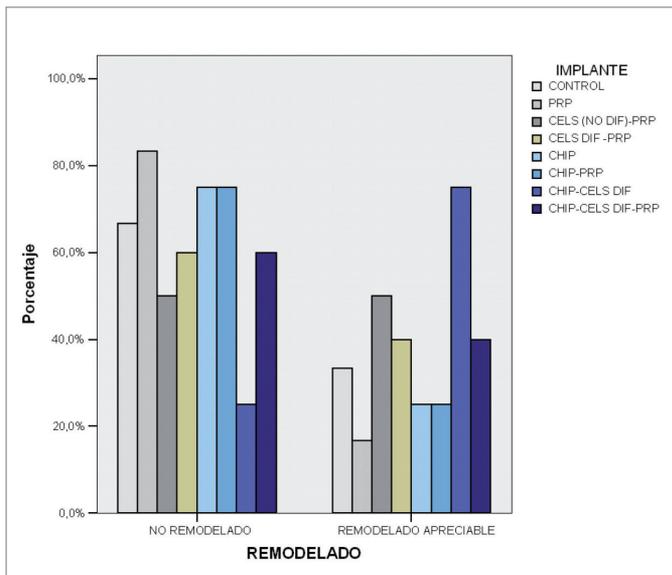


Fig. 7. Representación esquemática de la remodelación ósea en los grupos del estudio.

En ninguno de los grupos del estudio hubo remodelación ósea completa. En el análisis individualizado de los grupos observamos que en el grupo control no hubo ningún caso de remodelación ósea apreciable. En los grupos II (plasma rico en plaquetas) y III (células troncales mesenquimales obtenidas del tejido graso) la mayor parte de los casos no mostraron ninguna remodelación, siendo ésta mayor a las 12 que a las 4 semanas, excepto en el grupo VIII, donde se implantaron células troncales mesenquima-

les obtenidas del tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos asociadas a plasma rico en plaquetas y heteroinjerto de hueso liofilizado.

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, 7 y 8.

## 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 mecánica [10]. En la actualidad, sólo los injertos de hueso esponjoso autógeno poseen las propiedades de osteoinducción, osteoconducción, osteointegración y osteogénesis necesarias para conseguir la regeneración ósea, si bien con las limitaciones de la disponibilidad y la morbilidad en el paciente [11-15]. Una de sus alternativas es la utilización de células de naturaleza mesenquimal. El implante de células mesenquimales para el tratamiento de diferentes tipos de lesiones ortopédicas ha ido adquiriendo cada vez más importancia. La inyección percutánea de este tipo celular en necrosis óseas [16-18] y en pseudoartrosis [19] ha resultado exitosa. Además, su utili-

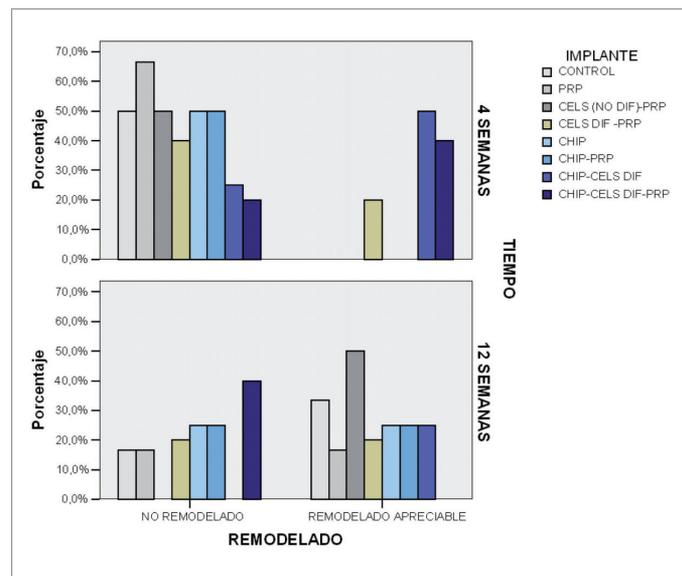


Fig. 8. Representación esquemática de la remodelación ósea en los diferentes grupos del estudio en función del tiempo, al cabo de 4 y 12 semanas.



zación permite el desarrollo de técnicas mínimamente invasivas, aplicadas bajo anestesia local y con pocas complicaciones, evitando, en la medida de lo posible, la necesidad de utilizar técnicas quirúrgicas de mayor agresividad.

Aceptando la conveniencia de añadir células en los tratamientos de regeneración tisular [20-24], 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* [7][25]. 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. Hedberg et al [26] compararon radiografías con tomografías microcomputarizadas e histología en el seguimiento de defectos del radio del conejo, considerando el estudio radiográfico 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 radiográficos 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 et al. y Hatakeyama et al. [27][28], 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 Shandu [9] 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 observaron Niemeyer et al. [29], que informaron 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 el trabajo de Kon et al. [24], si bien con tiempos de seguimiento de 6 meses. Borden et al. [30] con una matriz polimérica microesférica vieron, sin embargo, que el crecimiento óseo aparecía a partir de la sexta semana. De todas formas, de nuestro estudio se deduce un intento de regeneración ósea mayor en los grupos con heteroinjerto. El hecho de la adición de factores osteoinductores (PRP) y osteogénicos 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.

Con todo, en el control de la regeneración ósea de defectos cavitarios a partir de células troncales derivadas de la grasa y diferenciadas a fenotipos osteogénicos, lo que supone una mayor formación y remodelado óseo [7], la radiografía simple no parece un método fiable de evaluación ni a las 4 ni a las 12 semanas. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carson JS, Bostrom MP. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* 2007; 38(Suppl 1):33-7.
2. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 395:66-8.
3. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; 355:1253-61.
4. Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27:6052-63.
5. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; 54:132-41.
6. Bunnell BA, Flaak M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008; 45:115-20.



7. 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] Universidad León, 2010.
8. Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 395:11-22.
9. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987; 18:213-25.
10. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials* 2006; 27:1817-23.
11. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg (Am)* 2002; 84-A:454-64.
12. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res* 1996; 329:300-9.
13. De Long WG, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg (Am)* 2007; 89-A:649-58.
14. Vacanti J, Vacanti C. Tissue engineering. En: Lanza R, Langer R, Vacanti J (eds). *Principles of tissue engineering*. 13 ed. Oxford: Elsevier, 2007: 3-6.
15. Sancho R, Valera M, Farre J, Roura S, Bayés A. Viabilidad celular en un aloinjerto de hueso esponjoso humano criopreservado. *Rev Ortop Traumatol* 2008; 52:27-31.
16. Phemister B. Treatment of ununited fractures by onlay bone grafts without screw or tie fixation and without breaking down of the fibrous union. *J Bone Joint Surg (Am)* 1947; 29-A:946-60.
17. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone; an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J Bone Joint Surg (Br)* 1964; 46-B:110-40.
18. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg (Br)* 2005; 87-B:896-902.
19. Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury* 2005; 36:203-6.
20. Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2002; 13:111-21.
21. Ueki K, Takazakura D, Marukawa K, Shimada M, Nakagawa K, Takatsuka S, et al. The use of polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and gelatin sponge complex containing human recombinant bone morphogenetic protein-2 following condylectomy in rabbits. *J Craniomaxillofac Surg* 2003; 31:107-14.
22. Kubler N, Michel C, Zoller J, Bill J, Mühling J, Reuther J. Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. *J Craniomaxillofac Surg* 1995; 23:337-46.
23. 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.
24. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, 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.
25. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR. 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.
26. Hedberg EL, Kroese-Deutman HC, Shih CK, Lemoine JJ, Liebschner MA, et al. Methods: a comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2005; 11:1356-67.
27. 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.
28. Hatakeyama M, Beletti ME, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. 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.
29. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, 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.
30. Borden M, Attawia M, Khan Y, El-Amin SF, Laurencin CT. Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *J Bone Joint Surg (Br)* 2004; 86-B:1200-8.

#### Conflicto de intereses

Los autores han recibido una ayuda como Proyecto de investigación en biomedicina, biotecnología y ciencias de la salud de la Gerencia Regional de Salud del Sacyl, aprobada por Resolución de 18 agosto de 2008; y otra como Proyecto de investigación de FUNDACIÓN MAPFRE, en las Ayudas a la Investigación 2008.