

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE ESTROMALES MESENQUIMALES EN
ORTOPEDIA CANINA**

“por”

Ana Karina HAZAN VILARDO

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección-Control y
Tecnología de los Alimentos de origen animal

MODALIDAD: Revisión Monográfica

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2014**

PÁGINA DE APROBACIÓN:

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa

Dr. Álvaro Hernández

Segundo miembro (Tutor)

Dr. Gabriel Semiglia

Tercer miembro

Dr. Pedro Martino

Co-tutora

Dra. Andrea Filomeno

Fecha

31 de Marzo de 2014

Autor

Br. Ana Karina Hazan

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Gabriel Semiglia por su “sí” INMEDIATO, por guiarme a lo largo de este trabajo, por compartir sus conocimientos, por su humor, su paciencia, sus frases celebres y por aumentar mi confianza.

A mi co-tutora, la Dra. Andrea Filomeno que también me dio su “sí”, por su disposición, paciencia, simpatía y por mostrarme por primera vez a las Células Madre en acción!

A las trabajadoras incansables de biblioteca y hemeroteca por la ayuda enorme que me brindaron, a Rosina por su paciencia y por estar siempre alegre.

A Leticia Ogando por su paciencia y gran disposición, tan fundamental para los que estamos en esta última etapa de la carrera.

A todos los profesores y profesoras que además de brindar sus conocimientos en clase me han “salvado” en varias oportunidades fuera de ella, me enseñaron sobre la realidad de esta profesión y a cuidarme como futura veterinaria. Gracias por la confianza y el gran cariño.

Al Dr. Porfirio Hernández que desde Cuba fue de gran ayuda para la realización de este trabajo, gracias por todas las explicaciones, información y calidez, ya nos conoceremos personalmente...

A mi familia por ABSOLUTAMENTE TODO...

A mis amigas y amigos del alma: Andrea, Fania, Javier, Julia, Lore, Mariana, Naicol, Noe, Patricia, Popi, Virgilio y Xime (están en orden alfabético!). GRACIAS!!!!!!!

A mi Jefecito, Nan, Gaby y Sebastián: sin ustedes iba a ser muy difícil hacer este trabajo.

A Susana Riet (y Loli), Flor Sosa (y Greta), Patricia Lodigiani (y Lorenzo), Julia Kantor (y Shanti), Eva Nathan (y Alegre) y a Giovanna Casanova (y Moncho) por su gran ayuda y cariño.

A Claudio por la ayuda, la paciencia, la sensibilidad, la alegría, POR TODO.

GRACIAS Titi, la mejor del mundo...

TABLA DE CONTENIDO

	Página
<u>Página de Aprobación</u>	2
<u>Agradecimientos</u>	3
<u>Tabla de cuadros y figuras</u>	6
<u>Resumen</u>	8
<u>Summary</u>	9
<u>Introducción</u>	10
<u>Generalidades sobre Células Madre</u>	14
Definición	14
Propiedades	15
Clasificación	15
Según plasticidad.....	15
Según estado evolutivo.....	16
Importancia de las Células Madre	20
Medicina Regenerativa	21
Anatomía y Fisiología del Hueso como órgano receptor de MSC	22
Estructura macroscópica y microscópica de los huesos largos.....	23
Mecanismo de regeneración ósea en fracturas	27
Fractura.....	27
Regeneración	28
Consolidación Directa.....	28

Consolidación Indirecta.....	29
Tratamiento de las Fracturas.....	30
Complicaciones en el tratamiento de las fracturas.....	32
Unión retardada.....	32
No unión.....	32
Osteomielitis.....	34
<u>Células Madre Mesenquimales</u>.....	37
Definición y Características.....	37
Fuentes y Mecanismos de obtención.....	42
Médula ósea.....	42
Tejido adiposo.....	45
<u>Aplicación en Ortopedia Veterinaria</u>.....	47
Implante de MSC aisladas de la Médula ósea o Tejido adiposo.....	47
Implante Autólogo de Médula Osea.....	52
Implante de Células Mononucleares.....	53
<u>Caso Clínico</u>.....	54
<u>Discusión</u>.....	57
<u>Conclusión</u>.....	63
<u>Referencias bibliográficas</u>.....	64

TABLA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Figura N° 1: Diferenciación de los tejidos.....	14
Figura N° 2: Esquema de generación de las CME y CMA.....	17
Figura N° 3: Mecanismos de acción de las CMA.....	20
Figura N° 4: Estructura de un hueso largo.....	23
Figura N° 5: Sección de un hueso largo.....	24
Figura N° 6: Histología del Hueso Compacto.....	25
Figura N° 7: Histología del Hueso Esponjoso.....	25
Figura N° 8: Estructura de la médula ósea, hueso compacto y hueso esponjoso...	26
Figura N° 9: Forma fibroblastoide de MSC caninos en cultivo.....	38
Figura N° 10: Osteoblastos caninos.....	38
Figura N° 11: Adipocitos caninos.....	39
Figura N° 12: Condrocitos caninos.....	39
Figura N° 13: Evidencia preliminar de Plasticidad.....	40
Figura N° 14: Diferenciación de CMH y MSC.....	42
Figura N° 15: Aspiración de Médula Osea desde la epífisis proximal del húmero...	44
Figura N° 16: Tipos de aguja de extracción.....	44
Figura N° 17: Zona lista para ser infiltrada con MSC.....	50
Figura N° 18: Implante de MSC.....	51
Figura N° 19: Carriers.....	51

Figura N° 20: Implante de Médula Osea percutáneo.....	52
Figura N° 21: Miembro afectado, día 0.....	55
Figura N° 22: Miembro afectado, semana 16.....	56
Tabla N° 1: Comparación de las fuentes de obtención de las MSC.....	46

RESUMEN:

El propósito del presente trabajo fue realizar la puesta a punto de la terapia regenerativa en Ortopedia enfocada en el uso de las Células Madre Mesenquimales (MSC).

Describimos sus características, tejidos de origen más estudiados en nuestro medio y las diferentes formas de ser aplicadas en el caso de las complicaciones surgidas durante la reparación de las fracturas como no uniones, uniones retardadas y osteomielitis en la especie canina.

Analizamos las fortalezas y debilidades de este tipo de tratamiento con respecto al actual.

Concluimos que si bien es necesario seguir investigando, la terapia celular basada en las MSC interviene en forma favorable estimulando la consolidación de las fracturas en pequeños animales.

SUMMARY

The objective of this study was to carry out a regenerative therapy update in Orthopedics, focused on the use of Mesenchymal Stem Cells (MSC).

We described its characteristics, origin tissues most commonly studied in our context, and its various forms of application in case of complications arising during fracture repair as non unions, delayed unions, and osteomyelitis in canine species.

We analyzed the strengths and weaknesses of this kind of treatment as compared to the one currently used.

We concluded that although further investigation is still necessary, cell therapy based on MSC intervenes favorably, stimulating the consolidation of fractures in small animals.

INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento, las Células Madre (CM) continúan adquiriendo una importancia cada vez mayor en las distintas ramas de la medicina.

Se las ha definido como células *no especializadas* provenientes del embrión, feto o el adulto, que tienen bajo ciertas circunstancias, la habilidad de *auto renovarse* por largos periodos, en el caso de las Células Madre Adultas, durante la vida del organismo.

Tienen la capacidad para *diferenciarse* en las células especializadas de los diferentes órganos, ya sea bajo condiciones fisiológicas o de laboratorio.

En suma, son células indiferenciadas capaces de replicarse por largo tiempo y con habilidad para generar células adultas con forma y función especializada para cada tejido (Kelly, 2007; NIH, 2001; ISSCR, 2011).

Se define Medicina Regenerativa como una rama de la ciencia que está ligada a la investigación de las CM y a su capacidad para convertirse en células de diferentes tipos. Esta dedicada al estudio y tratamiento del daño de los tejidos, ya sea por envejecimiento, enfermedad o trauma, basándose principalmente en reemplazar el tejido con células madre o administrando drogas que estimulen a las ya existentes en los tejidos a reparar (Kowaleski y Saunders, 2013).

Actualmente las formas más comunes de atacar las distintas patologías están basadas en fármacos o cirugías, la Medicina Regenerativa ofrece un cambio en la manera de combatirlas (Hernández, 2009).

Desde hace varios años se están llevando a cabo investigaciones y ensayos clínicos sobre su aplicación en distintas enfermedades entre las que se encuentran Alzheimer (Kelly, 2007), Parkinson (Brazzini y col, 2010), Huntington (Gearhart y col, 2009), trauma de médula espinal (Fujimoto y col., 2012), ACV, Esclerosis Lateral Amiotrófica (Kelly, 2007), enfermedades cardiovasculares (NIH, 2011; NIH), Leucemia, afecciones óseas (Yaneselli y col., 2013) y enfermedades autoinmunes (NIH, 2001).

A comienzos de los años 60s fueron identificadas por primera vez por McCulloch y Till como células estromales clónicas ubicadas en la médula ósea (Yi y Song, 2012), luego en el año 1966 fueron descritas por Friedenstein y Petrakova como células formadoras de progenies osteogénicas (Jackson y col., 2007). Fue en el año 1981 cuando Evans y Kaufman las aislaron por primera vez de la masa celular interna de un embrión de ratón, en el año 1998 lo hicieron Thomson y colaboradores, esta vez de blastocistos humanos.

Así surgieron los tipos de CM según su estado evolutivo, por un lado las Embrionarias (CME) y por otro las Adultas (CMA) (Mukhopadhyay y col., 2011).

Las CM Embrionarias son obtenidas de la masa celular interna del blastocisto. Son pluripotentes, es decir capaces de diferenciarse en todos los tipos de células que derivan de las tres capas germinales, y capaces de auto renovarse de forma indefinida en condiciones de laboratorio. Se debe tener en cuenta que son capaces de generar reacciones inmunológicas una vez implantadas y un tipo de tumor benigno llamado Teratoma (Thomson y col., 1998; Hernández-Ramírez y col., 2011).

Las CM Adultas son células indiferenciadas (no especializadas) que se encuentran en tejidos diferenciados (especializados). Presentan carácter de Multipotentes, pueden crear las células que provienen de una misma capa embrionaria, son capaces de diferenciarse en los distintos tipos de células que residen en el tejido en el cual están ubicadas. Se está encontrando evidencia que indicaría su pluripotencialidad, por lo que su estudio es de vital importancia ya que a partir de ellas se podría obtener cualquier tipo de tejido relacionado a un sitio determinado de implantación (Gearhart y col., 2009). Como desventaja se destaca su dificultad para ubicarlas y aislarlas ya que se encuentran en bajas concentraciones en los tejidos, a esto se le agrega que no se auto replican de forma indefinida in vitro lo que limita su cantidad en el laboratorio (Zachos y Smith, 2009; Mukhopadhyay y col., 2011).

En lo que respecta al campo de la Ortopedia, la aplicación de Células Madre para el tratamiento de la fracturas y sus complicaciones, ya sea no uniones, uniones retardadas u osteomielitis sería un gran avance, dado que los tiempos de recuperación son menores, el procedimiento para administrarlas es sencillo y

sobretudo porque brindan soluciones que en la actualidad no están presentes en medicina veterinaria (Livingston y col., 2003; Yaneselli, 2012).

Cuando se produce una solución de continuidad en el hueso este es capaz de regenerarse con su tejido original por medio de la formación de un callo óseo. A esta forma de osificación se le llama Indirecta en la cual las Células Madre Mesenquimales juegan un papel importante (Kraus y Kinker-Head, 2006). Sin embargo, cuando las pérdidas de hueso son extensas, o se suscitan complicaciones, el tejido óseo puede ver superada su capacidad para auto repararse. En la mayoría de los casos cuando esto ocurre la solución es quirúrgica, con los riesgos que implica, debiendo el animal ser reintervenido en varias oportunidades.

Debido a esto surgen nuevas estrategias que se basan en el implante de Células Madre Mesenquimales (MSC).

Entre las más estudiadas se encuentra el tratamiento que infiltra estas células *aisladas y cultivadas* provenientes de la médula ósea o tejido adiposo, la inyección de *aspirados de médula ósea* directamente sin ser procesada en el laboratorio, y una tercera donde se implanta un concentrado de médula ósea al que se le llama *Células Mononucleares (CMN)* que contiene los distintos tipos de Células Madre Adultas que en ella residen.

Cada una presenta distinto tipo y tiempo de manipulación (Kraus y Kinker-Head, 2006; Hernández y Forrellat, 2013).

Las Células Madre Mesenquimales (MSC) han sido objeto de estudio con respecto a este tema debido a su carácter de multipotentes, capaces de diferenciarse en células que componen el tejido óseo, cartilaginoso y adiposo, y a la posibilidad de obtenerlas de varios tejidos adultos (Granero-Molto y col., 2009; Kowaleski y Saunders, 2013).

Se describirán las etapas de la reparación ósea para una mejor comprensión del funcionamiento de las CM una vez implantadas.

Se profundizará en las características de las CM en general, con especial atención en las MSC.

Gracias a las investigaciones más recientes se podrá ahondar sobre las distintas formas de aplicación de las MSC en ortopedia canina y en sus logros.

Si bien queda mucho camino por recorrer antes de poder llevar este tipo de tratamiento a la práctica clínica, los resultados obtenidos hasta el momento son sumamente alentadores (James y Gaynor, 2008; Zachos y Smith, 2009; Canapp, 2012; Kowaleski y Saunders 2013).

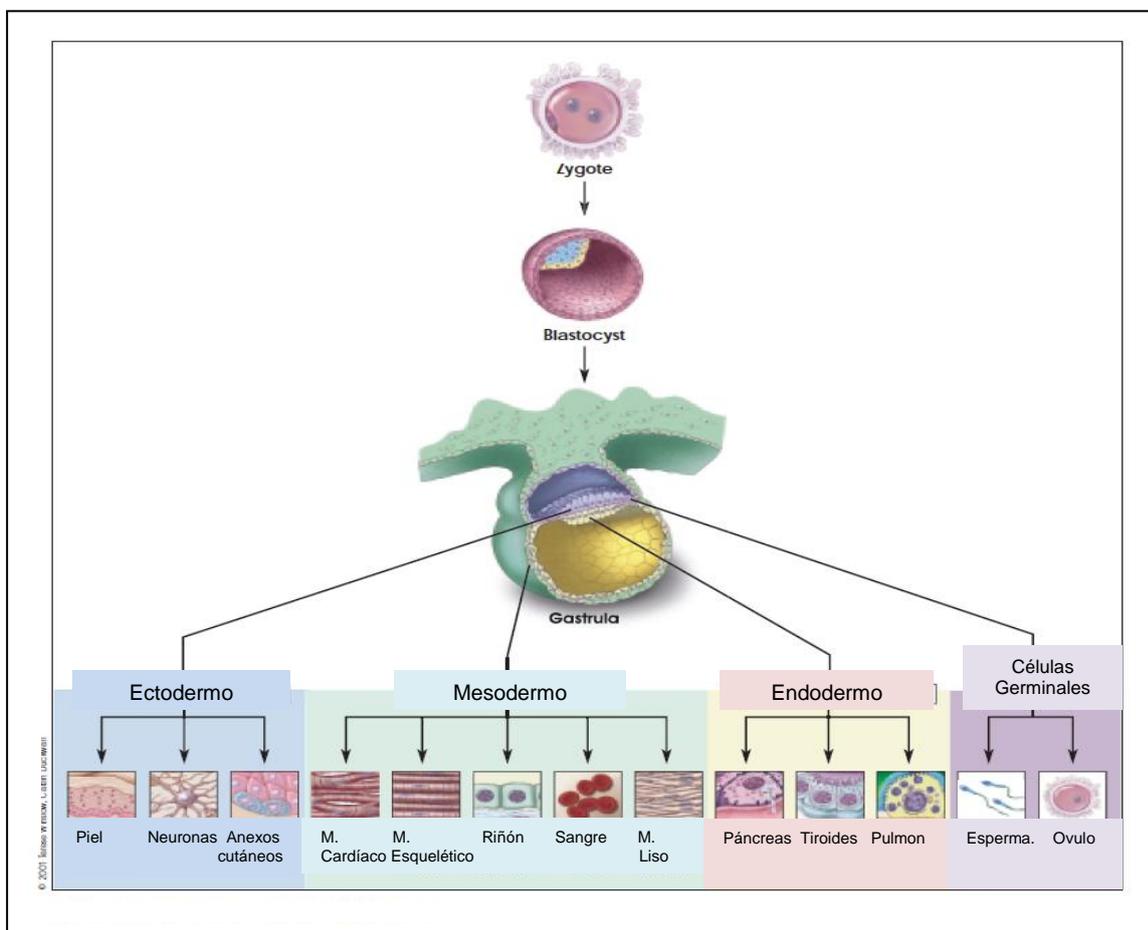
GENERALIDADES SOBRE CÉLULAS MADRE

Definición

Son células *indiferenciadas*, que se destacan por dos propiedades, la *auto renovación* y *diferenciación*.

Son las células fundamentales desde donde se originan los órganos y tejidos especializados del cuerpo, que provienen de un pool inicial de células formado luego de la fertilización. Estas se mantienen a lo largo de la vida actuando en el recambio natural de las células, así como para reemplazar el tejido dañado (ISSCR, 2011).

Figura Nº 1: Diferenciación de los tejidos.



Fuente: Modificado de National Institutes of Health, 2011.

Propiedades

Las CM poseen características que las diferencian del resto de las células del organismo y son compartidas sin importar de donde provengan.

A) *Indiferenciadas*: son células *no especializadas* provenientes del embrión, feto o el adulto incapaces de realizar las funciones específicas de un determinado tejido (NIH, 2011).

B) *Diferenciación*: es la capacidad para transformarse en las células de los distintos tejidos, aparatos y sistemas que forman a los individuos, ya sea bajo condiciones fisiológicas o en el laboratorio. Esto requiere de un proceso donde actúan factores intrínsecos y extrínsecos, a lo largo del cual la célula se va haciendo cada vez más diferenciada. Los intrínsecos son controlados por los genes y los extrínsecos que se conocen hasta el momento incluyen estímulos hormonales, químicos y físicos existentes en el ambiente o nicho.

Sobre estos factores se está prestando especial atención, ya que una vez descifrados, se podría dirigir la especialización hacia el órgano o tejido que se necesite (Csaki y col., 2007).

C) *Proliferación*: son capaces de multiplicarse por largos periodos de tiempo. Por lo tanto, en condiciones de laboratorio, una población inicial de CM puede dividirse por un largo periodo de tiempo dando lugar a millones de células hijas indiferenciadas.

Si bien las Células Madre Embrionarias (CME) pueden replicarse por largo tiempo en condiciones de laboratorio, no sucede lo mismo con las Células Madre Adultas, que tienden a diferenciarse (NIH, 2011).

Clasificación

Según Plasticidad:

A las CM se las clasifica según su capacidad para transformarse en distintos tipos celulares. Este rango de diferenciación se va perdiendo a medida que las células se van haciendo cada vez más especializadas.

A) *Totipotentes*: las CM que presentan esta característica son las más versátiles. El cigoto y las células que se generan a partir de este hasta el estado de blastocisto, son totipotentes. Son capaces de generar un individuo completo, ya que de estas estructuras derivan todas las células necesarias para formar el embrión y las estructuras para que sea viable (placenta) (Kelly, 2007).

B) *Pluripotentes*: estas son las CM capaces de transformarse en todos los tejidos del organismo. A lo largo del desarrollo embrionario se encuentran en la masa celular interna del blastocisto, que dará lugar a las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Carecen de la habilidad para generar un individuo, ya que no se diferencian en las estructuras extraembrionarias necesarias para su desarrollo (Hernández y Dórticos, 2004).

C) *Multipotentes*: disminuyendo en el grado de versatilidad, se encuentran las CM Multipotentes. Su característica es la de diferenciarse en los distintos tipos de células provenientes de una misma capa embrionaria. Son células cuyo grado de especialización es mayor al de las anteriores (ISSCR, 2011).

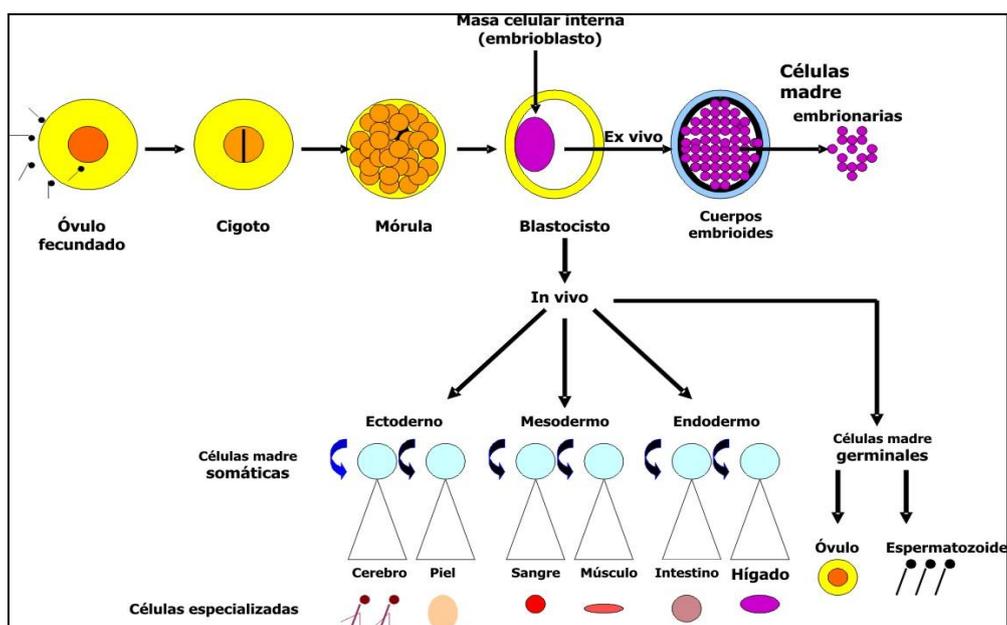
D) *Unipotentes*: son las menos versátiles de todas, y por lo tanto las más diferenciadas. Se transforman en un único tipo de célula, razón por la cual en algunos trabajos se las denominan células en tránsito o células precursoras.

Según estado evolutivo:

Dependiendo de la etapa del desarrollo en la que se encuentran, existen las CM Embrionarias (CME) y las CM Adultas (CMA) (Figura N°2).

A partir del año 2006 se comienza a hablar de un tercer tipo, las Células Madre Pluripotentes Inducidas (CMPI), quienes presentan las ventajas de las CME sin sus problemas relacionados con la inmunidad y ética (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Figura Nº 2: Esquema de generación de las CME y CMA.



Fuente: Hernández y Dórticos, 2004.

A) Embrionarias-Definición y Características.

Las CME son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna de embriones de 5 días de desarrollo, que se caracterizan por tener la capacidad de diferenciarse en células que derivan de las tres capas germinales y por tener la capacidad de proliferar de forma indefinida en condiciones de laboratorio sin sufrir cambios. Esto último es una gran ventaja desde el punto de vista de la medicina regenerativa, ya que serán necesarias cantidades importantes de células para generar los órganos o tejidos que cada patología requiere para su tratamiento

Entre sus desventajas se encuentran su capacidad para generar teratomas (tumor benigno que contiene células derivadas de las tres capas germinales), reacciones inmunológicas, y por otro lado cuestiones éticas y legales (Evans y Kaufman, 1981; Aflatoonian y Moore, 2006).

B) Adultas-Definición y características.

Las Células Madre Adultas, también llamadas Células Madre Somáticas, son células indiferenciadas que se encuentran en tejidos fetales y adultos.

Si bien aun no se conoce con exactitud de donde provienen, se ha propuesto que tienen origen en células embrionarias que fueron apartadas durante el desarrollo, permaneciendo indiferenciadas en los tejidos adultos. Una segunda teoría establece que se desarrollan luego de la formación del embrión, gracias a un proceso de desdiferenciación.

Se dividen de forma asimétrica, a partir de una CMA se genera una CM hija y una diferenciada. De esta forma, conservan el tamaño de su población y reponen las células que se pierden normalmente o por injurias. La capacidad de proliferar la mantienen a lo largo de la vida del organismo.

Antes de llegar a diferenciarse por completo, las CMA se dividen generando Células Progenitoras o Precursoras quienes serian un paso intermedio entre el estado indiferenciado y las células que han adquirido un fenotipo y funciones específicas.

Son Multipotentes, una vez diferenciadas adquieren las características necesarias para funcionar en el tejido en el que se encuentran.

Han sido localizadas en la médula ósea, tejido adiposo, sangre, cornea, retina, pulpa de los dientes, hígado, piel, tracto gastrointestinal, páncreas, cerebro, médula espinal, folículo piloso, pulmón, mucosa nasal, riñón, corazón, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico y endometrio. Es decir, existen en tejidos que derivan de las tres capas germinales.

Una de sus ventajas está relacionada con la medicina regenerativa, ya que se podrían obtener trasplantes autólogos, con lo que se estaría solucionando el problema de los rechazos. Se ha observado que no producen tumores luego de ser implantadas. La otra está relacionada con los temas éticos y legales que en este caso no están presentes ya que se extraen de tejidos adultos, sin recurrir al uso de embriones.

Como desventaja se destaca que no se auto replican en forma indefinida in vitro. Es sabido que en el organismo pueden permanecer sin diferenciarse por largos periodos, pero in vitro tienden a diferenciarse (Mukhopadhyay y col., 2011).

Mecanismo de acción de las CMA: aún no está bien esclarecido cual es el mecanismo de acción de estas células una vez implantadas, sin embargo existen varias hipótesis que indican a los procesos de proliferación y diferenciación como los más relevantes, los que se llevarían a cabo gracias a la transdiferenciación, fusión celular y secreciones autocrinas, paracrinas y telecrinas (Figura N° 3).

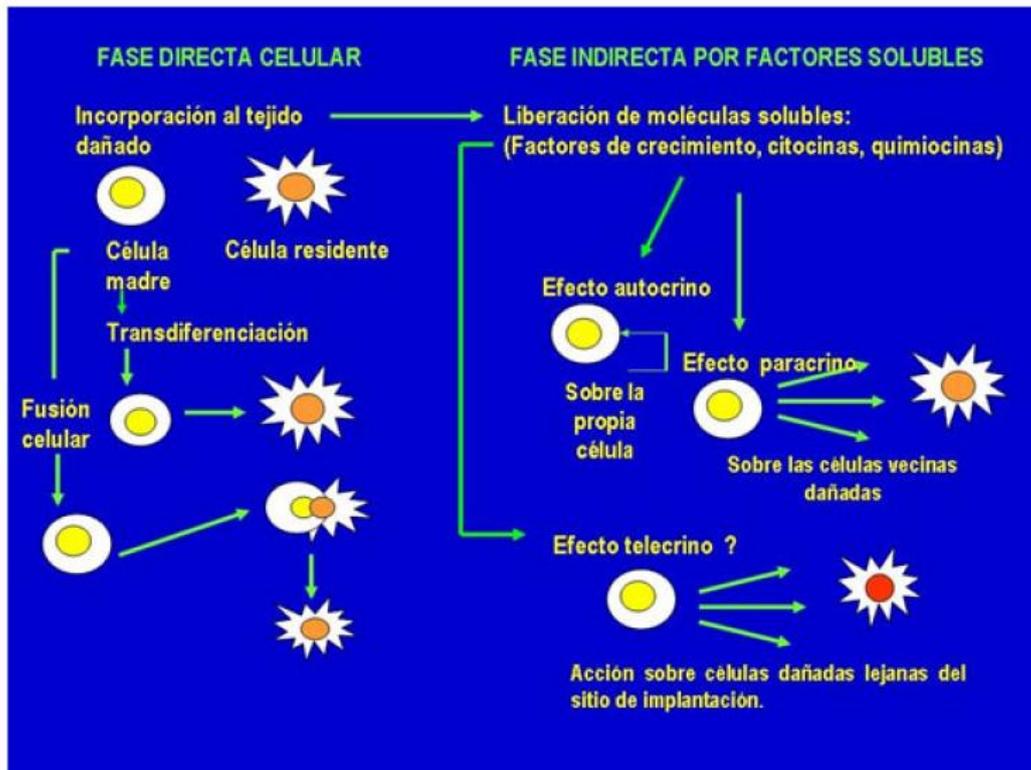
Se ha sugerido que existen señales emitidas por las células residentes en el tejido a ser trasplantado que estimularían la *transdiferenciación* de las CM hacia el tipo de célula propio de ese tejido, de manera tal que se puedan adaptar a ese nicho en particular ejerciendo su acción regenerativa.

Estas mismas señales podrían actuar de otra forma induciendo *fusión* celular es decir, la unión de las células implantadas con las del tejido residente generándose así nuevas células con las características apropiadas para funcionar correctamente en ese tejido.

La tercer hipótesis está relacionada con distintos tipos de *secreciones*, macromoléculas bioactivas que actuarían de forma *autocrina* modulando la proliferación de la propia célula implantada que las secreta, asegurando de esta manera la continuidad de sus funciones. De forma *paracrina*, las CMA implantadas segregan factores para estimular a las células del propio tejido.

Hernández y su grupo de trabajo en Cuba (2009), realizaron un trasplante autólogo de CM Hematopoyéticas en un humano con linfedema crónico de ambas extremidades inferiores, el paciente recibió las células en una de sus extremidades aunque ambas presentaron gran mejoría, de este y otros estudios se desprende el posible efecto telecrino que pueden tener las secreciones de las CMA.

Figura Nº 3: Mecanismo de acción de las CMA.



Fuente: Hernández, 2009.

Existe evidencia que sugiere la pluripotencialidad de algunos tipos de CMA, entre estas se encuentran las Células Madre Hematopoyéticas y Mesenquimales.

De confirmarse esta propiedad no habría distinción entre el uso de las CM Embrionarias y las Adultas en lo que a Medicina Regenerativa se refiere, evitando las cuestiones éticas que rodean a las CME (Escario, 2008; Hernández, 2009).

Importancia de las Células Madre

Desde su descubrimiento han captado la atención de los científicos especializados en la salud tanto humana como animal ya que gracias a sus características serían la única manera de tratar patologías que actualmente no tienen solución adecuada. Por otro lado se encuentran aquellos cuyas enfermedades cuentan actualmente con un tratamiento adecuado (Diabetes Mellitus, insuficiencia renal, cardíaca, etc.) pero su calidad de vida se vería favorecida si este se basara en CM.

En cuanto a la aplicación de estas células en ortopedia, los pacientes se beneficiarían con un tratamiento menos cruento, con una mejor y más rápida recuperación, y con la posibilidad de evitar amputaciones en los casos más complicados gracias a la utilización de Células Madre Mesenquimales (NIH, 2011; Hernández, 2013).

Medicina Regenerativa

La medicina regenerativa comprende el estudio de la renovación de los tejidos ya sea por causas fisiológicas o patológicas.

Se basa en los distintos mecanismos regenerativos que están presentes en el reino animal, desde la salamandra, capaz de recuperar partes enteras de su cuerpo, hasta los humanos, donde esta capacidad está reservada para algunos tejidos como hueso, piel, pelo, hígado e intestino (ISSCR, 2011).

Busca descifrar y promover esta capacidad regenerativa intrínseca llevada a cabo por las Células Madre (CM) para poder ser utilizadas en el tratamiento de distintas enfermedades.

Su aplicación ofrece una forma integral de atacarlas ya que los efectos no están dados solamente por estas células sino que se ha demostrado que ellas producen sustancias bioactivas que regulan y activan tanto a las implantadas como a las propias del tejido receptor contribuyendo a una recuperación más fisiológica. Dichas sustancias van tomando cada vez más importancia, un ejemplo son los factores de crecimiento generados por las plaquetas, por lo que se está investigando el uso de la terapia celular en conjunto con estas moléculas, potenciando ambos efectos (Zapatán y García, 2011).

Estudios recientes han sugerido que la terapia con Células Madre Mesenquimales (MSC) puede ser beneficiosa para una variada cantidad de patologías como esqueléticas (Caplan, 1991), autoinmunes, neurológicas, etc.

Mientras que en humanos y roedores las MSC han sido estudiadas durante décadas, recientemente se ha comenzado su estudio en caninos.

Hasta el año 2011 la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado cuatro productos basados en Terapia Celular, condrocitos autólogos cultivados in vitro (Carticel) para el tratamiento sintomático de defectos del cóndilo femoral, fibroblastos autólogos (LAVIV™) para la reducción de las líneas de expresión en el rostro, células dendríticas obtenidas de monocitos para inmunoterapia autóloga contra el cáncer de próstata —resistente a tratamiento hormonal— asintomático o mínimamente invasivo (PROVENGE ®ó sipuleucel-T), y células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de cordón umbilical y placenta (HEMACORD) para reconstitución del sistema hematopoyético (Zapatan y García, 2011; Kowalwski y Saunders, 2013).

Anatomía y Fisiología del Hueso como órgano receptor de MSC

El tejido óseo forma el esqueleto, es el armazón que soporta el cuerpo, la gravedad y protege los órganos. Está implicado en la homeostasis mineral, en la hematopoyesis y permite la locomoción.

Es un tejido dinámico, tiene la capacidad para adaptar su arquitectura dependiendo de las presiones que deba soportar, mediante procesos de resorción y formación ósea. Su forma y funciones dependen del mineral que compone la matriz extracelular que es un análogo de la hidroxiapatita, distribuido en forma de cristales microscópicos que es removido y re formado como respuesta a estímulos mecánicos, bioquímicos y fisiológicos normales (Baskey, 2006).

Clasificación:

Dependiendo de la forma existen tres tipos de huesos:

1) largo: son de forma cilíndrica y se encuentran en los miembros. Se caracterizan por depender de tres centros de osificación para su desarrollo, uno para la diáfisis y dos para las epífisis.

2) cortos: presentan forma irregular, la mayoría forman parte de la columna vertebral, carpo y tarso. Se desarrollan a partir de un centro de osificación.

3) planos: están organizados en dos dimensiones, sus grandes superficies le dan inserción a importantes músculos. Ejemplos de este tipo de hueso son la escapula, los huesos de la pelvis y los del cráneo (Dyce y col., 1999).

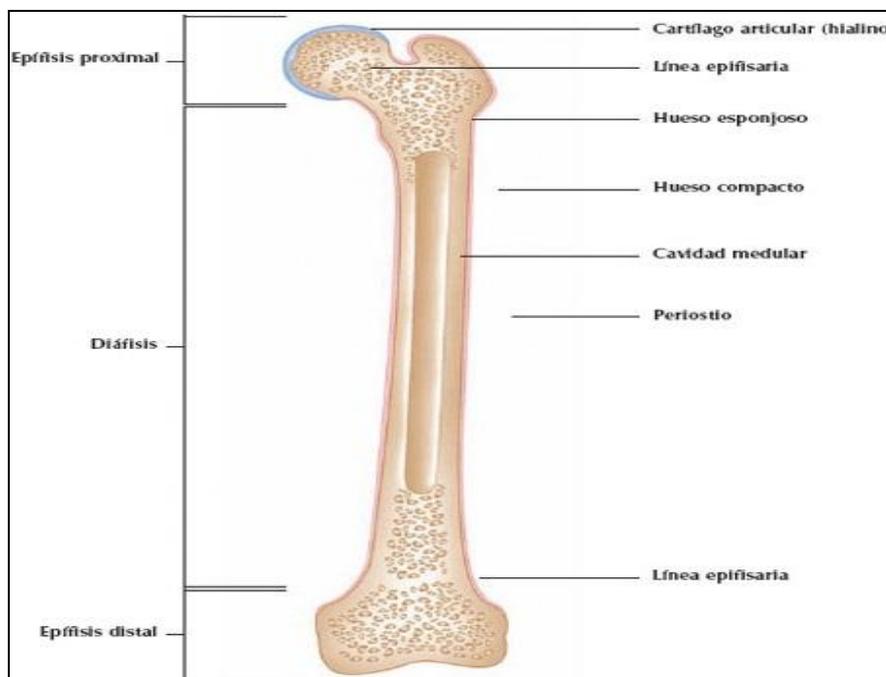
Estructura macroscópica y microscópica de los huesos largos:

Están ordenados en una *diáfisis* larga y cilíndrica en cuyos extremos se encuentran las *epífisis* de tamaño pequeño y forma irregular. Entre estas dos estructuras se observa la *metáfisis* que durante el desarrollo es de tejido cartilaginoso (cartílago de crecimiento), luego presenta la misma composición ósea que la epífisis (Figura N°4).

La *cavidad medular* esta en el centro de la diáfisis.

El *periostio* es una membrana fibrosa que envuelve la superficie externa de los huesos excepto donde se encuentra cartílago articular (epífisis). Su capa profunda es celular, donde se albergan las células osteoprogenitoras, razón por la cual conserva la capacidad para formar hueso en individuos adultos. La capa externa está formada por tejido conectivo fibroso.

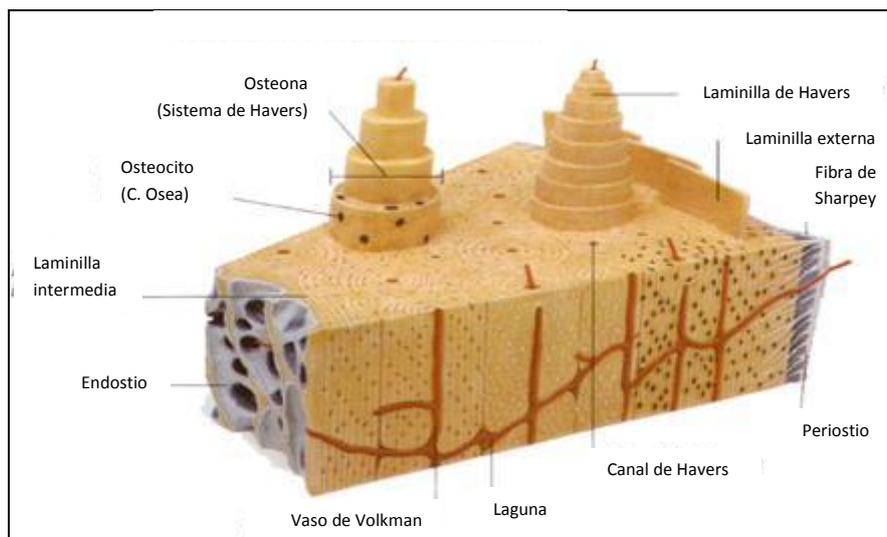
Figura N° 4: Estructura de un hueso largo.



Fuente: Walker, 2005.

La forma del hueso está determinada por una corteza de hueso compacto formado por finas laminillas conteniendo los osteocitos y osteoblastos. Estas son la unidad funcional del tejido, se ordenan de a 10 o 12 paralelamente en tubos concéntricos alrededor de pequeños canales centrales llamados conductos de Havers (Figura N° 5). A cada uno de estos sistemas se les llama Osteona o sistema de Havers, que a su vez se colocan de forma paralela al eje longitudinal del hueso (Baskey, 2006).

Figura N° 5: Sección de un hueso largo.



Fuente: Torres Ríos, 2011.

Microscópicamente se observa que cada Osteona está delimitada por una línea de cemento y que entre ellas existen sistemas intermedios de laminillas (Figura N° 6).

Los conductos de Volkman esta formados por tejido fibroso, contienen vasos sanguíneos y nervios, son quienes comunican a los sistemas de Havers entre sí, con el periostio y con la cavidad medular, están orientados en forma perpendicular al eje longitudinal del hueso. No están rodeados por laminillas óseas (Di Fiore, 1996).

La porción externa de la *diáfisis* está formada por este tipo de hueso

Figura N° 6: Histología del Hueso Compacto.

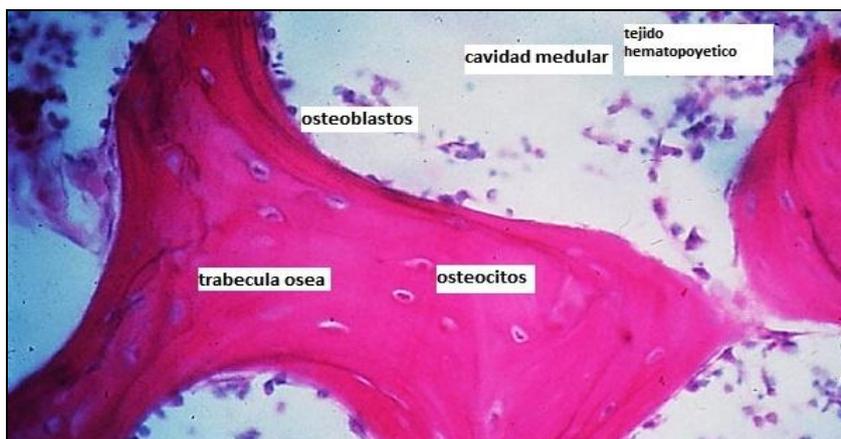


Os:osteona; CH: Conducto de Havers; CV: Conducto deVolkman; L: laminillas; IL: laminillas intermedias; Flechas:osteocitos.

Fuente: Slideshare, 2013.

Por su parte la zona interna de la *epífisis* está compuesta por hueso esponjoso, en este caso las laminillas de osteocitos están inmersas en trabéculas de densidad y forma variables. Son delgadas, se ramifican y se unen delimitando espacios amplios que son ocupados por la médula ósea, este tipo de organización hace que sea de consistencia más blanda que el hueso compacto (Figura N° 7).

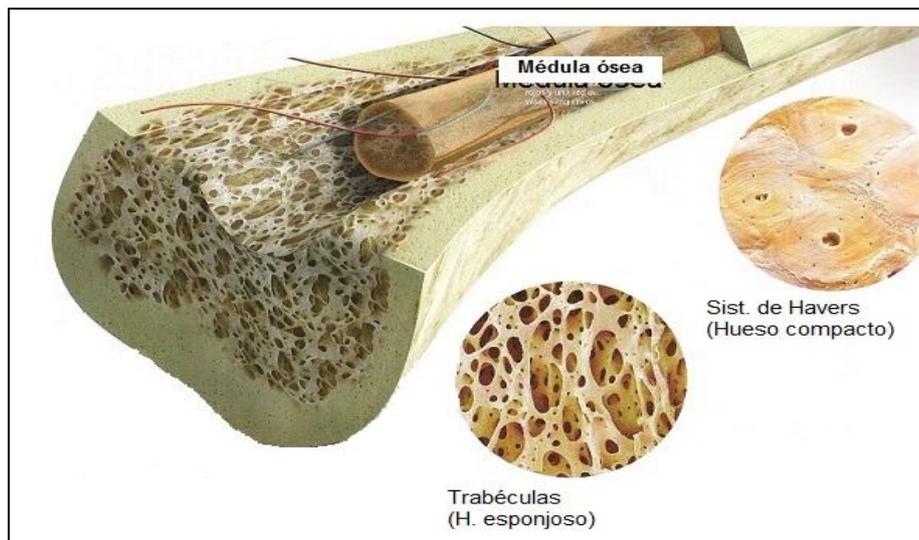
Figura N° 7: Histología del Hueso Esponjoso.



Fuente: Universidad católica de Chile, 2014

En el centro de la diáfisis y entre las trabéculas del hueso esponjoso se encuentra la *médula ósea* (Figura N° 8). Está compuesta por tejido conjuntivo reticular y abundantes vasos sanguíneos que generan el microambiente apropiado para la actividad celular (Welch, 2010).

Figura N° 8: Estructura de la médula ósea, hueso compacto y esponjoso.



Fuente: Walker, 2005.

Dentro de los componentes celulares se encuentran las Células Madre Hematopoyéticas (CMH), encargadas de dar origen a todas las células sanguíneas, Células Madre Mesenquimales (MSC), con capacidad osteogénica y células progenitoras endoteliales (Hernández, 2011).

Las MSC se dividen en dos tipos, las inducidas y las determinadas. Las primeras son células mesenquimales indiferenciadas que bajo determinadas señales son capaces de formar hueso, se las encuentra en varios tejidos. Las determinadas son células que están diferenciadas para formar tejido óseo, llamadas osteoprogenitoras, se alojan en el endostio o estroma de la médula (Di Sevo Mallo, 2013).

Está contenida por el endostio, capa de tejido conectivo que tapiza la cavidad medular y la superficie de las trabéculas.

La médula ósea representa un 5% del peso corporal, a medida que pasa el tiempo es reemplazada por tejido adiposo, pasando de medula ósea roja a medula ósea amarilla (Welchu, 2010).

Células óseas: existen cuatro tipos, las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las primeras derivan de las células mesenquimales embrionarias mediante su proceso de diferenciación hacia células formadoras de hueso, por lo que su potencial para generar distintos tipos celulares es menor. Los osteoblastos sintetizan la matriz ósea (osteóide) y actúan en el proceso de calcificación por medio de la secreción de la enzima fosfatasa alcalina sérica (FAS) que aumenta la concentración de calcio y fósforo hasta que precipitan. Estos pueden morir por apoptosis o diferenciarse en osteocitos una vez que son rodeados por matriz ósea mineralizada. Los osteoclastos existen en la superficie de la matriz, son los sensores mecánicos del hueso responsables de la resorción (Fawcett, 1995).

Irrigación sanguínea: su aporte sanguíneo representa entre un 5 a 10% del gasto cardíaco. La arteria nutricia penetra por el centro de la diáfisis llegando a la médula donde se va bifurcando hacia proximal y distal hasta las epífisis donde se anastomosan con sus vasos sanguíneos y con los de la metáfisis. A su vez los vasos más pequeños son los que penetran en los conductos de Havers del hueso compacto.

Inervación: existen junto a los vasos sanguíneos en los conductos Haversianos. Las fibras sensitivas se dirigen al tejido óseo, especialmente periostio, las vasomotoras hacia las arterias y venas (Dyce, 1999).

Mecanismo de regeneración ósea en Fracturas:

Fractura:

Los huesos largos están sujetos a fuerzas fisiológicas (peso, contracción muscular, actividad física) y no fisiológicas (traumatismos). Cuando estas se transmiten al hueso de forma tal que superan su resistencia máxima, se produce la fractura (Hulse y Hyman, 2006).

Se define como la rotura completa o incompleta del hueso y se acompaña de varios grados de lesión en los tejidos blandos, quedando comprometida la funcionalidad del aparato locomotor (Piermatei y Flo, 1999).

Regeneración:

La reparación de un hueso dañado es un proceso biológico destinado a devolver la funcionalidad normal del tejido, mediante la formación de nuevo tejido óseo. Su éxito depende de varios factores como la localización de la fractura, la circulación sanguínea, el daño en los tejidos blandos y la estabilidad ósea entre otros. Expresado de otro modo, el hueso se recupera del daño sin formar cicatriz ya que es capaz de regenerarse, siempre y cuando las condiciones para dicho proceso estén presentes (Goods, 2009).

El aporte sanguíneo es de especial importancia ya que sin él no es posible la formación de nuevo tejido. Durante este proceso la sangre proviene de la arteria nutricia, sus ramificaciones y del tejido blando circundante, esta última fuente desaparece una vez que el tejido recupera su estructura (Hulse y Hyman, 2006).

Se debe prestar atención durante el acto quirúrgico a la hora de elegir los implantes, con la manipulación de los tejidos blandos y se debe tener la precaución de lograr una inmovilización adecuada para evitar movimientos que deterioren la vasculatura.

El proceso de reparación se puede dar de dos formas, Consolidación Directa o Primaria (reconstrucción de hueso) e Indirecta o Secundaria (formación de callo), dependiendo del grado de estabilidad que tenga la fractura.

C. Directa: es la regeneración ósea en ausencia de tejido cartilaginoso y la menos frecuente en forma natural ya que los cabos deben estar prácticamente en contacto en toda su superficie (Di Sevo Mallo, 2013).

Existe C. Directa 1ª, cuando los cabos están alineados y estabilizados en forma absoluta (por placas, clavos etc.), los extremos óseos están en contacto en casi toda la superficie o separados por una distancia menor a 0.1mm. El hueso se repara sin la necesidad de callo cartilaginoso previo (o con la formación de uno muy pequeño),

gracias a la remodelación osteoclastica y a las Células Mesenquimales precursoras de osteoblastos.

La C. Directa 2ª o Intramembranosa se da si la estabilidad ofrecida por el método de fijación empleado no es la adecuada como para que se forme tejido óseo directamente, por lo tanto se forma un callo externo pequeño en los extremos de la fractura con la finalidad de reducir el movimiento permitiendo la unión de los cabos por un puente donde las Células Mesenquimales se diferencian en osteoblastos y forman hueso (Fossum, 2009).

Si la brecha entre los extremos óseos es mayor a 0.1 mm se produce la reparación ósea por Consolidación Indirecta o Endocondral. Esta vez el hueso se forma a través de tejido cartilaginoso o fibroso.

Etapas de la C. Indirecta:

1ª) *Inflamación*: como respuesta al daño ocurre una reacción inflamatoria local con la liberación de prostaglandinas que estimulan la angiogenesis, la resorción ósea por parte de los osteoclastos y la proliferación de las CM óseas. La degranulación plaquetaria promueve la liberación de citocinas que son quimiotácticas para las MSC haciendo que migren hacia la zona dañada. Ellas segregan factores de crecimiento que promueven la proliferación y diferenciación celular, que dependiendo del pH del nicho lo harán en fibroblastos o condroblastos (Kraus y Kinker-Head, 2006).

En el momento de la lesión los vasos sanguíneos se dañan, sobreviene la hemorragia, formación de coágulo y posteriormente el tejido de granulación (soporta un 100% de deformación) que evolucionará a tejido fibroso o fibrocartilago dependiendo de las condiciones del ambiente. Estos soportan un 10% de deformación, brindando mayor estabilidad y menor movimiento permitiendo que los tejidos con menor tolerancia a la deformación proliferen dentro de la brecha, dándole rigidez a la fractura (Hulse y Hyman, 2006).

2ª) *Callo Blando*: se forma entre los cabos de la fractura, su parte externa es de tejido fibroso, donde el aporte sanguíneo es mayor, y la interna de fibrocartilago. Su tamaño va a depender de la estabilidad, a menor estabilidad mayor será el callo.

3ª) *Callo Duro*: la mineralización comienza desde el centro (fibrocartílago) hacia la superficie, se aumenta la rigidez y resistencia, limitando las deformaciones, creando el ambiente propicio para la proliferación y diferenciación de los osteoblastos.

El fibrocartílago sufre osificación endocondral, siendo reemplazado por hueso esponjoso que le permite al paciente retomar el movimiento normal del miembro afectado (Fossum, 2009).

4ª) *Remodelación*: si bien el hueso ha retomado funcionalidad su estructura no es la adecuada, tiene mayor diámetro de lo habitual, esta deformado, por lo que puede interferir con el trabajo de los músculos y tendones, la reabsorción es llevada a cabo por los osteoclastos. En este proceso el tipo de hueso cambia de esponjoso a cortical vía remodelación Haversina. Llegar a su tamaño y forma normal puede llevar meses o años (Skerry, 1998).

Tratamiento de las Fracturas.

El proceso natural de reparación ósea es suficiente para reconstruir la fractura siempre y cuando las condiciones biomecánicas sean las adecuadas. Si estas no están presentes se debe intervenir de manera exógena para lograr un correcto y precoz resultado (Di Sevo Mallo, 2013).

Existen ciertas condiciones clínicas que determinan el tratamiento quirúrgico de las fracturas como es el caso de las expuestas, conminutas, las que presentan gran desplazamiento y las infectadas.

Lo que se pretende con este tipo de tratamiento es devolverle la función original al tejido afectado, para esto se debe estabilizar la fractura cuidando el aporte sanguíneo tan fundamental para la recuperación (Hulse y Hyman, 2006).

Se utilizan fijadores externos, internos y mixtos. En el caso de los fijadores esqueléticos externos se aplican clavos o tornillos en forma perpendicular al eje

longitudinal del hueso que luego de unir los cabos de la fractura son inmovilizados entre sí por una barra externa paralela al eje del hueso. Los fijadores esqueléticos internos se implantan cuando los cabos son difíciles de estabilizar, los más

conocidos son las placas de osteosíntesis y los clavos intramedulares. Es una cirugía más invasiva ya que se debe entrar al hueso, el daño en los tejidos circundantes es importante lo que puede llegar a retrasar la recuperación (Piermattei y Flo, 1999).

Se presentan casos en los que la consolidación endocondral combinada con los distintos métodos utilizados para estabilizar las fracturas no son suficientes. Entre estos se incluye las pérdidas sustanciales de hueso, enfermedades metabólicas, no uniones, uniones retardadas, animales con patologías locales o sistémicas que ven disminuido su potencial regenerativo o pacientes gerontes (Bennet, 1998).

En estos casos se deben utilizar estrategias que potencien y ayuden a las fisiológicas y quirúrgicas empleadas.

Una de las más importantes es el implante de hueso esponjoso autólogo que se realiza en el quirófano junto con los métodos de fijación. Este es obtenido por legrado de la cresta iliaca, tubérculo mayor del humero o en la zona proximal de la tibia, por lo general se coloca luego de realizar la fijación (Fossum, 2009).

La razón para usar hueso esponjoso son sus propiedades osteogénicas, (contiene osteoblastos, MSC y les brinda un soporte donde puedan proliferar y diferenciarse) osteoinductores, (cuando es aplicado junto con matriz ósea desmineralizada, MOD, encargada de reclutar MSC y su progenie, tiene la capacidad para inducir la formación de hueso en un lugar donde de otra forma no se iba a regenerar, por lo general la MOD se utiliza como una extensión cuando la cantidad de H. Esponjoso no es suficiente) y osteoconductoras (son los implantes que sirven de armazón a las células sobre el cual pueden trabajar). (Di Sevo Mallo, 2013).

Los inconvenientes que presenta su utilización son que se debe realizar otra intervención sobre el mismo animal para extraer el injerto por lo que el tiempo que el paciente debe estar bajo anestesia es mayor, pueden surgir complicaciones en el sitio de donde fue extraído y por último, la cantidad de hueso esponjoso extraído puede ser insuficiente (Fossum, 2002).

Complicaciones en el tratamiento de las Fracturas:

La curación exitosa de las fracturas es un proceso ordenado cuando las condiciones biológicas y mecánicas son las adecuadas. En algunas ocasiones pueden aparecer inconvenientes relacionados con la elección del tipo de implante, su colocación, cuidado post quirúrgico, etc., que alteran el curso normal de la reparación ósea (Millis y Jackson, 2006).

Unión retardada: esto ocurre cuando la fractura no se consolida en el tiempo esperado. Si bien se observan signos radiológicos de actividad ósea, no se puede asegurar que la reparación ocurra.

Entre las causas más comunes se encuentra el método de fijación utilizado para reparar la fractura ya que puede ser inadecuado, el tipo de fractura (expuesta, con pérdida importante de hueso, tejidos blandos y vasculatura) o las infecciones, en donde el hueso puede llegar a regenerarse, pero tardara más de lo normal. También se deben tener en cuenta los factores propios del paciente como la edad, estado general, etc. (Piermattei y Flo, 1999).

Con los tratamientos actuales la solución depende de la causa, si la reducción y método de fijación son adecuados se debe reducir la actividad del animal empleando cabestrillos que eviten el apoyo del miembro. Cuando el método de fijación no sea el adecuado o la reducción no fue exitosa el animal se debe someter a una nueva cirugía para corregir estos errores, con el objetivo de lograr una zona de fractura alineada y estable (Millis y Jackson, 2006).

No unión: se le llama de esta forma cuando el proceso de cicatrización se detiene.

Generalmente se deben a un tratamiento inadecuado, ya sea por la mala elección del método de fijación o por errores durante el acto quirúrgico que llevan a la inestabilidad de la fractura, aunque también se deben nombrar como factores predisponentes las fracturas con grandes pérdidas de tejido óseo y blando, fracturas expuestas, pacientes gerontes y/u obesos. (Fossum, 2009).

Se clasifican en viables y no viables, ambas pueden complicarse con infecciones (Piermattei y Flo, 1999).

Las viables son biológicamente activas, se observa reacción ósea proliferativa. Se subdivide en 3 tipos, que son los que se presentan con mayor frecuencia en pequeños animales:

- 1) hipertrófica: se forma gran cantidad de callo que no se osifica por el movimiento presente en la fractura.
- 2) moderadamente hipertrófica: el callo es más chico que en el caso anterior.
- 3) oligotrófica: el callo es mínimo o no se forma, el espacio de la fractura puede estar unido por tejido fibroso.

Las no viables o avasculares son poco comunes y se dividen en:

- 1) distroficas: uno o ambos cabos están poco vascularizados, por lo tanto no se unen.
- 2) necróticas: persisten secuestros en el espacio de la fractura.
- 3) por defecto: ocurre cuando se pierden grandes fragmentos de hueso, si el espacio entre los cabos es mayor a 1.5 veces el diámetro del hueso, es posible que no haya suficiente potencial osteogénico para regenerar la fractura, independientemente de la estabilidad lograda.
- 4) atróficas: es el estadio final de la mayoría de las no uniones no viables, se produce resorción y redondeamiento de los cabos, puede presentarse osteoporosis por desuso y cese absoluto de la actividad osteogénica.

En el caso de las fracturas con no uniones viables que presentan una reducción adecuada, se debe realizar otra cirugía para estabilizarlas tratando de afectar el callo lo menos posible, si la reducción es insatisfactoria la cirugía comprenderá dividir el callo en el lugar de la fractura, alinear y fijarla adecuadamente. En cuanto a las no viables se deben reavivar los bordes, abrir el canal medular con el fin de vascularizar

nuevamente la zona e implantar un método de fijación adecuado. En algunos casos se pueden necesitar hasta 3 cirugías (Fossum, 2009).

Osteomielitis: es la inflamación de la médula y corteza ósea causada por la generación de un ambiente propicio para la contaminación microbiana. En la mayoría de los casos los agentes causales son bacterias aerobias siendo las más encontradas *Staphylococcus intermedius* o *aureus* (50-60%), en el caso de mordeduras se aíslan anaerobias como *Actinomyces*, *Clostridium*, *Bacteriodes* entre otros. En un número menor de casos la infección está dada por hongos y virus (Anderson, 1998).

La infección clínica es el resultado de mas que una simple contaminación microbiana ya que se deben dar ciertas condiciones para que estos puedan desarrollarse como daño extenso de partes blandas, poca irrigación (dificultando la llegada de los nutrientes, anticuerpos, macrófagos y fármacos), formación de detritos celulares del propio paciente que protege las colonias y por ultimo poca estabilidad de las fracturas tratadas que favorecen el daño en los tejidos circundantes. El estado del paciente también se debe tener en cuenta, ya que si presenta una enfermedad sistémica es otro factor de riesgo. Efectivamente un 72% de fracturas abiertas y un 39% de las cerradas tienen contaminación bacteriana, pero un bajo porcentaje sufren infección (Bubenik y Smith, 2006).

Las vías de infección en orden de frecuencia son (Piermattei y Flo, 1999):

1ª) fractura expuestas, reparación abierta de fracturas cerradas, colocación de implantes (vehiculizan los microorganismos, el mejor ejemplo son las placas metálicas) y las heridas punzantes.

2ª) extensión de la infección desde el tejido blando adyacente al hueso.

3ª) hematógena (es muy rara).

En la Osteomielitis Aguda el animal presenta depresión, anorexia, dolor localizado, tumefacción, eritema y temperatura corporal aumentada. Radiológicamente los signos no son muy claros.

A nivel tisular los cambios que se suceden son congestión vascular, edema y exudado inflamatorio que se extiende por el hueso destruyendo los osteocitos y las células medulares. Los polimorfonucleares liberan enzimas proteolíticas que dan necrosis tisular, descenso del pH, desmineralización de la matriz ósea y rotura de las trabéculas. El exudado se llega a extender por la médula, corteza y periostio. A medida que este aumenta la presión intraósea también aumenta quedando comprometido el aporte sanguíneo por lo que, en las zonas afectadas el hueso queda anoxico y muere. (Fossum, 2002).

En la Osteomielitis Crónica, clínicamente se detectan trayectos fistulosos, atrofia y contractura muscular por la claudicación presente. En las radiografías se pueden observar secuestros rodeados de exudado inflamatorio.

Durante esta fase el tejido de granulación piógeno absorbe la sustancia esponjosa muerta y separa en forma de secuestros los trozos de hueso cortical necrosado. A su vez, el contenido purulento acumulado en la zona subperiostica lo separa del resto del hueso, por lo que el periostio responde generando capas de hueso en un intento de unirse al área afectada. Con el tiempo forma trayectos fistulosos que drenan secreción purulenta hacia el exterior. Este proceso empeora si la fractura es inestable por la mayor destrucción de vasos y tejido blando (Anderson, 1998).

El tratamiento médico de la osteomielitis Aguda comprende la indicación de antibióticos sistémicos según el resultado del antibiograma durante 4 a 6 semanas y atender el estado general de paciente dependiendo del grado de dolor o anorexia que manifieste, si presenta exudados drenarlos y realizar curaciones diariamente. Quirúrgicamente se debe desbridar cuando corresponda, reemplazar los implantes previamente colocados si no son los adecuados o están flojos (Piermattei y Flo, 1999).

La osteomielitis Crónica también se trata con antibioticoterapia sistémica prolongada, la muestra para el antibiograma se debe extraer de las zonas más profundas de infección ya que las secreciones de las fístulas están contaminadas con bacterias tisulares. Es más común encontrar microorganismos anaerobios. El tratamiento quirúrgico incluye retirar los secuestros y el hueso desvitalizado hasta

llegar a reavivar sus bordes. De ser necesario reemplazar los implantes por nuevos que sirvan para estabilizar la fractura, una vez regenerada la fractura se deberían retirar para eliminar por completo la infección. Una opción es implantar hueso esponjoso cuando las pérdidas óseas son importantes (Fossum, 2002).

Si bien los avances en las técnicas quirúrgicas y los implantes han permitido a los cirujanos ortopédicos reparar fracturas relativamente complejas con resultados exitosos, las complicaciones se continúan presentando cuya solución en la mayoría de los casos requiere que el animal se someta a más de una cirugía con los riesgos, tiempos y cuidados que esto implica (Fossum, 2009). Lamentablemente en ciertas ocasiones la única solución es la amputación del miembro afectado.

Fue señalado anteriormente que el hueso es uno de los pocos tejidos capaces de regenerarse gracias a la capacidad de proliferación y diferenciación que poseen las MSC localizadas tanto en periostio como en la medula ósea. Sin embargo, en los procesos crónicos esta habilidad se ve afectada por la disminución de células madre debido a los cambios que sufre el nicho en el cual se encuentran (Kraus y Kinkor-Head, 2006; Semiglia, 2014, comunicación personal).

Es por estas razones que el tratamiento de las fracturas y sus complicaciones con el aporte externo de Células Madre Mesenquimales sería una solución eficaz y definitiva al imitar el proceso fisiológico de recuperación. Implica un procedimiento quirúrgico sencillo y corto, más seguro para el paciente. Si bien su aplicación está en pleno estudio, los resultados obtenidos hasta el momento indican que la recuperación se logra en menor tiempo y sin inconvenientes (Zachos y Smith, 2009).

Células Madre Mesenquimales

Definición y características:

Como fue mencionado anteriormente en los años 1960s fueron identificadas por primera vez por McCulloch y Till como células estromales clónicas de la médula ósea, luego en el año 1966 fueron descritas por Friedenstein y Petrakova como células de morfología fibroblastoide formadoras de progenitores osteogénicos localizadas en el estroma de la médula ósea (Jackson y col., 2007; Yi y Song, 2012).

Son Células Madre Adultas Multipotentes que se encuentran en varios tejidos adultos como médula ósea, periostio, tejido adiposo, músculo, pulpa dental, páncreas, hígado, dermis, membrana sinovial, pulmón y riñón, también en tejidos fetales como sangre del cordón umbilical, sangre fetal, y líquido amniótico (Erickson, 2008; Reich, 2009). Se encuentran en grandes cantidades en los individuos jóvenes, a medida que pasan los años su concentración va disminuyendo (Di Sevo Mallo, 2013).

En el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC) estableció ciertos parámetros de laboratorio que las definen. Se deben adherir al medio de cultivo, expresar los receptores de superficie CD73⁺ y CD105⁺ pero no los marcadores hematopoyéticos CD14⁻, CD34⁻ y CD45⁻ y tienen que ser capaces de diferenciarse en células que derivan del mesodermo como osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Ghannam y col., 2010).

Tienen capacidad de expansión muy alta, desde 230 veces en 28 días a 6966 veces en 58 días de cultivo. Asimismo conservan su funcionamiento intacto a pesar de ser cultivadas, replicadas y criopreservadas, razones por las cuales son tan importantes dentro de la terapia regenerativa (Carrasco y col., 2010).

Sus características fueron comprobadas por primera vez en caninos en el año 2007 gracias a Csaki y colaboradores. Ellos demostraron su capacidad de proliferación y diferenciación a partir de aspirados de médula ósea. Como primer paso aislaron las MSC basándose en los parámetros ya descritos establecidos por la SITC (habilidad para adherirse al medio de cultivo, morfología fibroblastoide y expresar marcadores

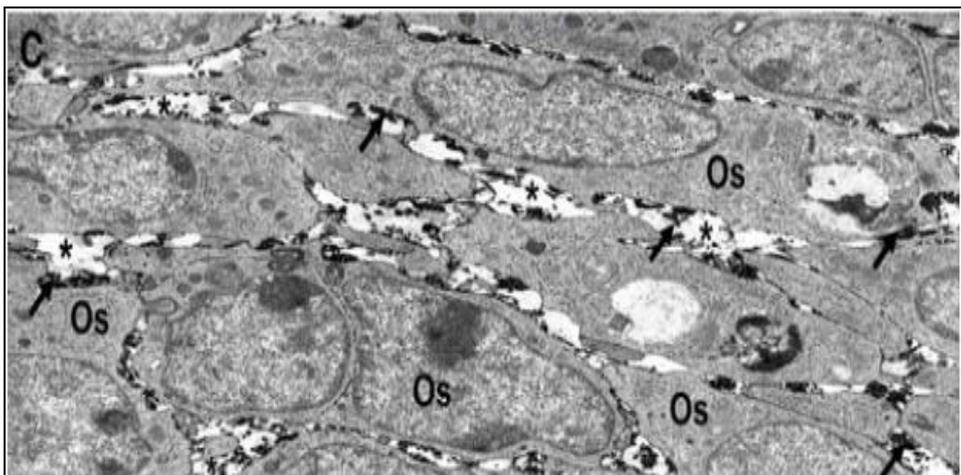
específicos) (Figura N° 9). Luego fueron sembradas en tres medios de cultivo, cada uno con las condiciones necesarias para dirigir la diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Concluyeron que las MSC caninas son capaces de generar células altamente especializadas, y funcionales (Figuras N° 10, 11 y 12).

Figura N° 9: Forma fibroblastoide de MSC caninas aisladas en cultivo.



Fuente: Csaki y col., 2007.

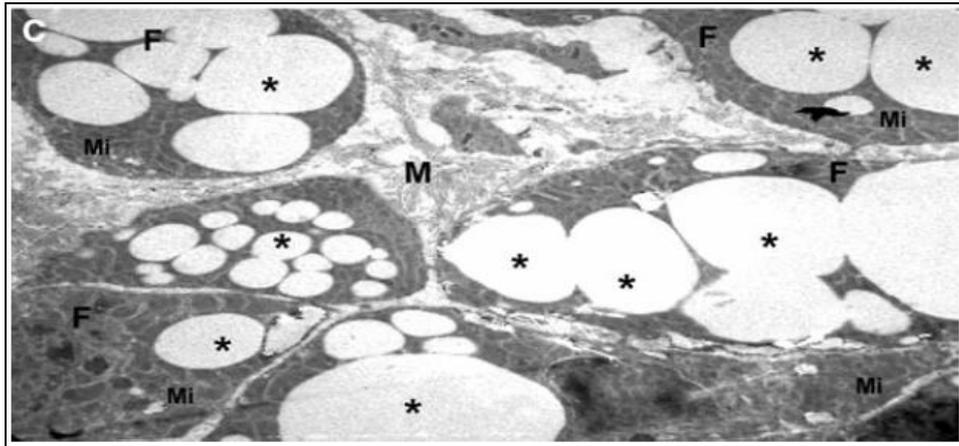
Figura N° 10: Osteoblastos caninos.



Os: osteoblastos; (*): matriz extracelular; (→): fibras.
Microscopía electrónica, 3000x.

Fuente: Csaki y col., 2007.

Figura N° 11: Adipocitos caninos.



F: adipocitos; (*): vacuolas lipídicas; Mi: mitocondrias; M: matriz extracelular formada por colágeno tipo I. Microscopía electrónica, 5000x.

Fuente: Csaki y col., 2007.

Figura N° 12: Condrocitos caninos.



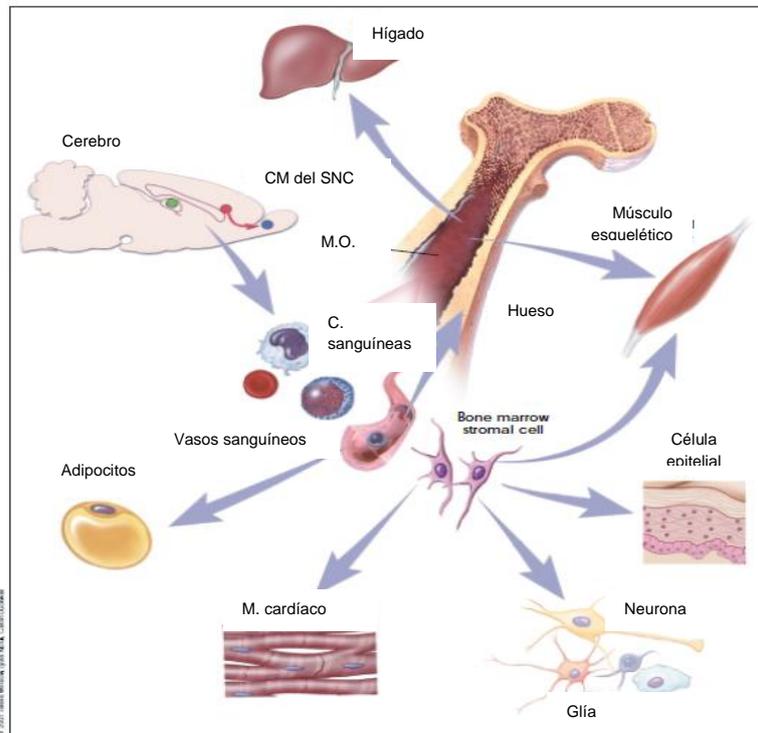
C: condrocitos; M: matriz extracelular. Microscopía electrónica, 5000x.

Fuente: Csaki y col., 2007.

Si bien su principal función en el organismo es la regeneración ósea, se ha encontrado evidencia in vitro que indicaría su capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, músculo cardíaco, epidermis, cornea, tendones e intestino, entre otros, demostrando su posible pluripotencialidad y por lo

tanto potencial para ser utilizadas como terapia de reemplazo en una amplia variedad de patologías (Socarrás-Ferrer y col., 2013).

Figura Nº 13: Evidencia preliminar de Plasticidad.



Fuente: National Institutes of Health, 2011.

Presentan otra particularidad, son Inmunoprivilegiadas. Tienen efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios ya que tienen baja expresión del factor mayor de histocompatibilidad I (MHC I) y no expresan el MHC II, además segregan en forma paracrina distintas citocinas que interfieren con la proliferación de los linfocitos T y B, por lo tanto, con su función de rechazar tejidos extraños (Escario, 2008; Benedetti, 2013).

Su rol en el tratamiento de patologías inmunomediadas y en la enfermedad del injerto vs. huésped ya está en investigación (Jackson y col., 2007).

Más importante aun es la posibilidad de realizar tratamientos con CM autólogas como alogénicas de forma indistinta (Liu y col., 2013).

Con respecto a esto último, Liu y col. (2013) resaltan en una de sus experiencias en base al estudio de MSC derivadas de tejido adiposo, la posibilidad de crear bancos de MSC alogénicos para tenerlas disponibles en el momento que sean necesarias, ahorrando el tiempo que se pierde en la extracción, aislamiento y expansión cuando se opta por las del propio paciente. En este ensayo pudieron observar que esta propiedad inmunológica es conservada luego de diferenciarse en osteoblastos.

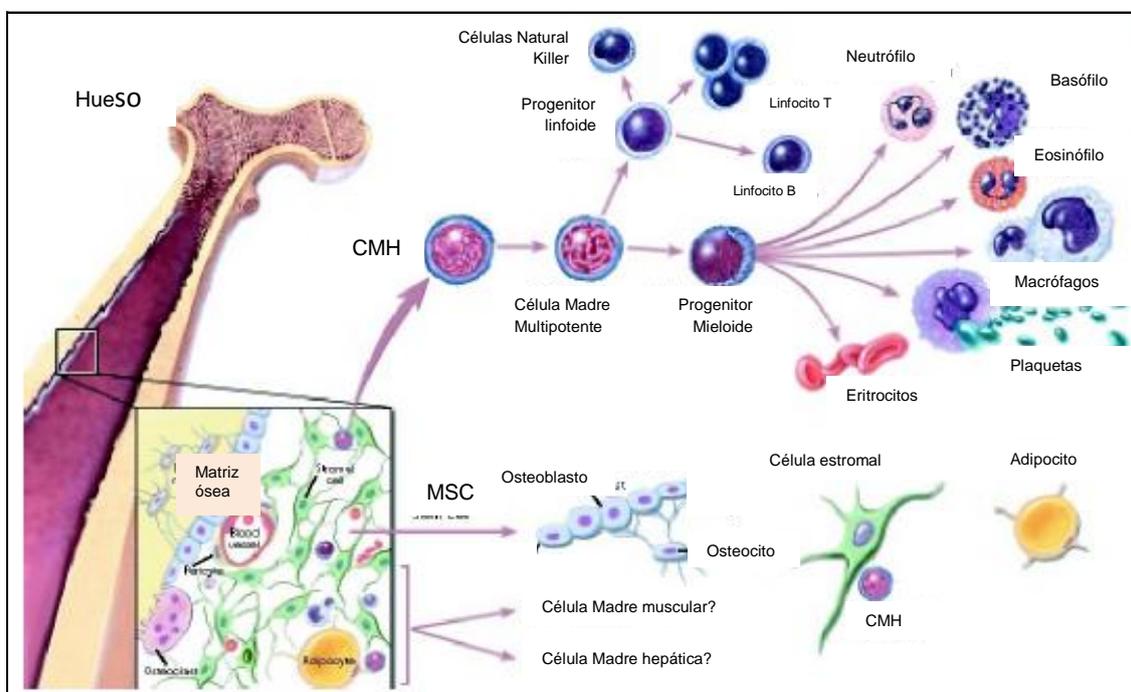
Fuentes y Mecanismos de obtención

Entre las fuentes más estudiadas se encuentran la médula ósea y el tejido adiposo (Black y col., 2007; Carrasco y col., 2010).

Médula ósea (M.O.).

La médula ósea contiene dos poblaciones principales de CMA, las Células Madre Hematopoyéticas (CMH) encargadas de la renovación de las células sanguíneas y las Células Madre Mesenquimales (MSC), responsables de la regeneración ósea (Kelly, 2007) (Figura N° 14).

Figura N° 14: Diferenciación de CMH y MSC.



Fuente: Modificado de National Institutes of Health, 2011.

Ésta tiene como limitante que las MSC se encuentran en muy poca concentración, conforman entre un 0,00001 y un 0,01% del total de las células que allí residen, por lo tanto su cultivo y expansión son necesarias para obtener las cantidades que se

necesitan en la práctica clínica, lo que lleva entre 4 a 6 semanas (Zachos y Smith, 2009).

Otro inconveniente, es su método de obtención si se lo compra con el tejido adiposo. Se debe realizar un procedimiento quirúrgico específico para extraer la médula del donante, aunque es más sencillo que el realizado para conseguir el injerto de hueso esponjoso.

De todas formas, desde su hallazgo en los años 60's, las MSC ubicadas en la médula ósea continúan siendo de las más aplicadas y estudiadas por los científicos. El procedimiento quirúrgico empleado para su extracción es el *aspirado*. Es un método relativamente sencillo, de corta duración y sus contraindicaciones son escasas estando relacionadas con la sedación o anestesia del animal (McSherry, 2007).

Los lugares más comunes en donde se realiza son el húmero en su porción proximal (de elección por estar cubierto de poco tejido) (Figura N° 15), cresta ilíaca (difícil de ubicar en animales obesos) y la fosa trocantérica (se evita en obesos o con mucha masa muscular) (Aceña y col., 1992; Filomeno, 2013, comunicación personal).

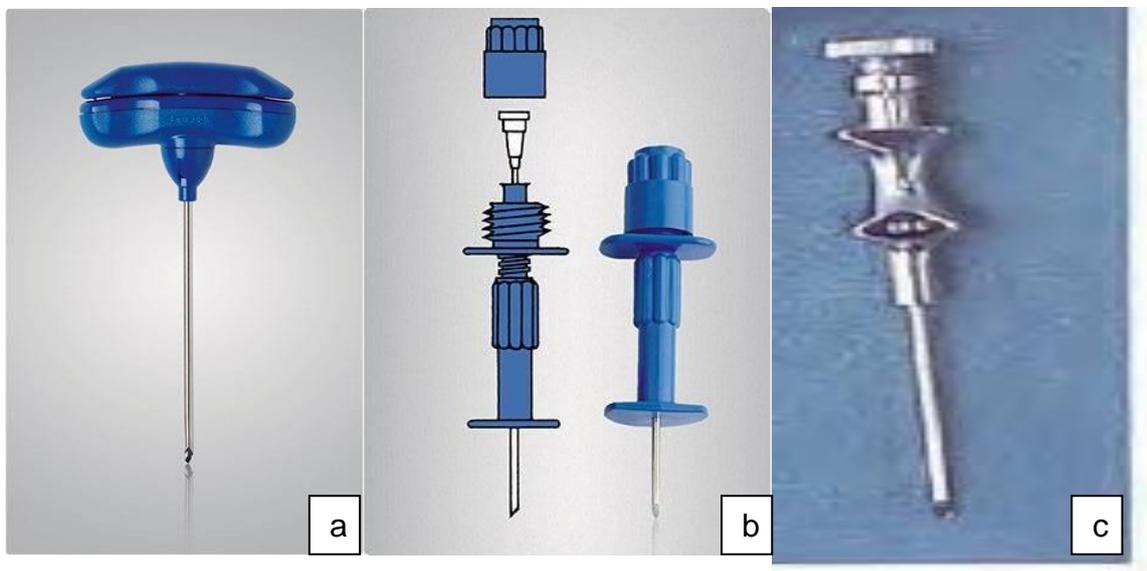
Una vez sedado el paciente y desinfectada la zona se incide la piel con bisturí (1-2 mm) sobre el lugar seleccionado con la finalidad de que la aguja de extracción (aguja de Jamshidi, Illinois o Rosenthal) (Figura N° 16), atraviese la piel fácilmente, esta se apoya sobre el periostio aplicado presión y rotación hasta sentir una disminución de la resistencia cuando se llega a la cavidad medular. A continuación se retira el estilete, se acopla una jeringa y se procede a la aspiración de médula ósea (Aceña y col., 1992; McSherry, 2007; Filomeno, 2013, comunicación personal).

Figura N° 15: Aspiración de Médula Osea desde epífisis proximal del húmero.



Fuente: Filomeno, 2014.

Figura N° 16: Tipos de agujas de extracción.



(a) aguja de Jamshidi. (b) aguja Illinois. (C) aguja Rosenthal

Fuente: Aceña y col., 1992; Cardionef, 2014; CareFusion, 2014.

Tejido adiposo.

El Dr. Hedrick en el año 2000 advirtió que el tejido adiposo contenía una gran cantidad de MSC, de hecho unas 500 veces más que en la médula ósea.

Las células provenientes de este tejido se diferencian en adipocitos, condrocitos y osteoblastos, al igual que las derivadas de medula ósea (Pineda Molina y Londoño Pelaez, 2009).

Su obtención no reviste mayores complicaciones, se pueden aprovechar cirugías de rutina para este fin eliminando la posible morbilidad del sitio donante como sucede cuando el origen es la M.O. La ovariectomía es el procedimiento que se tiene más en cuenta para este propósito ya que la cantidad de grasa periovárica que se puede extraer es suficiente para aislar y cultivar estas CM (Semiglia, 2014, comunicación personal). Se puede extraer también del subcutáneo de la zona inguinal, escapular o de la región intra abdominal (James y Gaynor, 2008).

Actualmente es la fuente que se utiliza con más frecuencia en la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, por lo que se describirá brevemente su procesamiento en el laboratorio (Filomeno, 2014, comunicación personal).

La grasa se troza y se somete a digestión enzimática con colagenasa tipo I, luego se centrifuga a 300 g por 5 minutos y el pellet se resuspende en medio esencial mínimo (MEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 2% de penicilina- estreptomicina. Las células son sembradas en botellas de cultivo celular e incubadas a 37°C con 5% de CO₂, cada 48 el medio de cultivo es cambiado. Cuando se llega a un 80% de confluencia son tripsinadas y expandidas con una siembra de 2×10^4 células/cm². Las MSC expandidas son utilizadas para implantes o almacenadas a -196°C. El procedimiento requiere 2 semanas aproximadamente.

En el control de calidad se verifica que las células tengan morfología fibroblastoide, se adhieran al medio de cultivo y expresen los marcadores de superficie específicos para MSC (Yaneselli y col., 2013).

Reich y col. en el año 2009 presentaron un estudio donde compararon las propiedades de las MSC caninas provenientes de médula ósea y del tejido adiposo donde concluyeron que si bien ambos tipos de células madre presentan un potencial osteogénico comparable, las provenientes del tejido adiposo llegan antes a la zona a reparar y su velocidad de proliferación es mayor. Esto último fue confirmado por Socarrás-Ferrer y col. en un trabajo realizado en Cuba durante el año 2013.

En el año 2012 Spencer y col. publicaron un artículo basado en una experiencia realizada en caninos donde llegaron a la misma conclusión que los grupos anteriores, además establecen que las derivadas del tejido adiposo aunque hayan sido criopservadas son una alternativa viable a las derivadas de la medula ósea.

Tabla N° 1: Comparación de las fuentes de obtención de las MSC.

Parámetro	Médula ósea	Tejido adiposo
Éxito de aislamiento	100%	100%
Formación de monocapa adherente	4-5 días	4-5 días
UFC-F obtenidas en la monocapa adherente (número)	83±61	557±673
ES Capacidad de diferenciación osteogénica	71.4%	78.8%
Capacidad de diferenciación adipogénica	100%	98%
Capacidad de diferenciación condrogénica	100%	100%

Fuente: Arevalo y col., 2007.

Se debe tener en cuenta que independientemente de la fuente, las MSC que han sido cultivadas durante largo tiempo presentan *cambios genotípicos y fenotípicos* debido al *envejecimiento del cultivo*, a la *contaminación con virus* o por *toxinas* que pueden alterar su potencial terapéutico.

Se ha visto que existe una mínima posibilidad de transformarse en *tejidos atípicos* como el carcinoma, por lo que se deben controlar durante un largo tiempo a los pacientes que hayan sido tratados (Carrasco y col., 2010; Kowaleski y Saunders, 2013).

APLICACIÓN EN ORTOPEDIA VETERINARIA

Cómo ya fue expresado, actualmente la mayoría de las fracturas son tratadas por métodos quirúrgicos con los riesgos que esto significa. Si estos fallan o el tejido óseo no responde surgen las uniones retardadas, no uniones y osteomielitis que requieren nuevos actos quirúrgicos para conseguir la recuperación del hueso afectado o en última instancia la amputación del miembro afectado. Si bien el uso de injertos de hueso esponjoso e implantes son de gran ayuda, en muchos casos no es suficiente. Debido a los inconvenientes que presenta este tipo de tratamiento es que se necesita otro cuyos beneficios sean concluyentes, aquí es donde las Células Madre Mesenquimales (MSC) demuestran sus habilidades (Livingston y col., 2003; Fossum, 2009; Yaneselli y col, 2013).

No se debe perder de vista que estas células actúan en conjunto con la terapéutica actual, es decir, es necesario que la fractura sea estable para que puedan funcionar correctamente (Gardel y col., 2009).

Entre las formas de aplicación más estudiadas se encuentran:

1) Implante de MSC aisladas de Médula ósea o Tejido adiposo.

Si bien ya se mencionaron sus diferencias con respecto a la concentración en cada tejido de origen y los métodos de obtención, se sabe que una vez aisladas su capacidad para diferenciarse en condrocitos y osteoblastos es muy similar, por lo que se hablara de ellas en conjunto.

Una vez implantadas las CMA ejercen su función de varias formas, *diferenciándose* en el tipo de tejido en el cual se encuentran siguiendo las señales emitidas por el nicho (cada órgano presenta un tipo distinto de nicho) y mediante sus propias *secreciones*, ya sean factores de crecimiento, moléculas antiinflamatorias, inmunomoduladoras o antifibróticas que estimulan la proliferación y diferenciación de las MSC inyectadas y de las existentes en los tejidos además de inhibir la apoptosis (Yi y Song, 2012; Benedetti, 2013).

Hay estudios que demuestran que otra de las funciones es la de estimular la angiogénesis, de esta manera los tejidos dañados vuelven a contar con su flujo sanguíneo tan fundamental para el proceso de regeneración. Esto se debe a la secreción de moléculas bioactivas como el factor de crecimiento vasculo endotelial (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y la IL-6 (Yaneselli, 2012).

De una experiencia realizada por Granero-Molto y col. (2009) se pudo determinar que las MSC inician el proceso de reparación formando un callo cartilaginoso que será reemplazado por tejido óseo. Este callo es de mejor calidad al que se forma normalmente luego de una fractura, debido a que presenta menor rigidez en su estructura y por lo tanto es menos quebradizo.

Se pudo observar también el efecto antiinflamatorio local y sistémico que ofrecen las células implantadas lo que beneficia la regeneración.

Las propiedades mecánicas una vez completada la reconstrucción del hueso fueron mejores comparadas con las obtenidas en los tratamientos convencionales (Livingston y col., 2003).

Estas pueden ser inyectadas en la zona de la fractura o en forma endovenosa ya que por citocinas quimiotácticas liberadas por las células dañadas son atraídas hacia la zona a reparar. Las MSC presentan en su superficie el receptor específico para quimiocina CXCR4 que se une con su ligando, la quimiocina SDF-1 cuando es liberada por los tejidos durante la injuria (Granero-Molto y col., 2009). De esta forma se crea el ambiente apropiado para que las MSC encuentren el lugar dañado y

procedan a la regeneración. Dicho de otra manera, si no hay injuria en los tejidos no se genera el nicho apropiado para que las células migren y se diferencien.

Del mismo trabajo realizado por Granero-Molto y col. se observó que la migración dependía también de la cantidad de células que eran administradas en el paciente.

A la hora de hacer un tratamiento con estas células, se debe evaluar si serán extraídas del propio individuo (MSC *autólogas*) o de otro de la misma especie (MSC *allogénicas*). Para esto hay que tener en cuenta que las *autólogas*, al igual que lo que ocurre con cualquier implante de este tipo, no presentan riesgo alguno de ser rechazado por el organismo ni de transmitir enfermedades, aunque presentan como inconveniente el tiempo que lleva su obtención y procesamiento para tratar un solo paciente (Kowaleski y Saunders, 2013). Sucede lo contrario con las *allogénicas*, ya que es posible tener bancos celulares disponibles para varios individuos en el momento que se las necesite. Si bien el riesgo de transmitir enfermedades existe, éste puede ser eliminado en el laboratorio previo a ser utilizadas.

Con respecto al rechazo por parte del sistema inmune fue descrito anteriormente que las MSC son inmunoprivilegiadas, por lo tanto el rechazo hacia CM *allogénicas* es bajo o nulo.

En perros con pérdidas importantes de tejido óseo a los que se les implantaron MSC *allogénicas* sin previa administración de inmunodepresores, se comprobó la presencia de células viables 8 semanas después de haber sido tratados y los resultados finales fueron comparables a los obtenidos con MSC *autólogas* (Livingston, 2003).

Yaneselli y col. (2013) estudiaron durante un año la evolución de un canino con no unión y osteomielitis del miembro anterior izquierdo que recibió repetidos implantes *allogénicos* de MSC, como resultado observaron regeneración ósea, remisión de la infección y ausencia de reacciones adversas derivadas de este tipo de implante.

Es por estas ventajas que las MSC *allogénicas* podrían ser una alternativa viable al uso de las *autólogas* y al de los injertos óseos empleados en la actualidad, más aún

si su efectividad y seguridad han sido y continúan siendo demostradas (Liu y col., 2013).

Por otro lado, se ha comprobado que la función de las MSC puede verse incrementada si son aplicadas junto con carriers (también llamados andamios biológicos) como auto injerto de hueso esponjoso o corticoesponjoso, medula ósea autóloga, esponjas de colágeno o de gelatina, gelatina en polvo, y sus combinaciones (Hernández-Hernández y col., 2013). Esto se debe a sus propiedades osteoinductoras, osteoconductoras y osteogénicas, a su vez logran que la implantación celular sea más fácil y segura (Goodship, 2009).

¿Cómo es la implantación de las MSC en el paciente?

A continuación se describirá la técnica empleada por el Dr. Semiglia y la Dra. Filomeno, en el Centro Hospital Veterinario (Montevideo) de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

El primer paso es anestesiarse al paciente. A continuación se prepara la zona mediante tricotomía, limpieza y embrocación. (Figura N° 17).

Figura N° 17: Zona lista para ser infiltrada con MSC.



Fuente: Filomeno, 2013.

Una vez protegida la zona mediante un campo quirúrgico, las MSC son inyectadas en forma percutánea. (Figura N° 18).

Figura N° 18: Implante de MSC.



Fuente: Filomeno, 2013.

Este procedimiento requiere 30 minutos aproximadamente (Filomeno, 2014, comunicación personal).

Pueden ser implantadas directamente o junto con carriers (Figura N° 19) para potenciar sus propiedades, como se indicó anteriormente (Zachos y Smith, 2009).

Figura N° 19: Carriers.



Fuente: Zachos y Smith, 2009.

2) Está en estudio, con resultados prometedores, el **Implante Autólogo de Médula Ósea** en el sitio dañado (Figura N° 20). Cuando se elige esta opción se están inyectando en el paciente MSC, Células Madre Hematopoyéticas y plaquetas. Como fue explicado, las Células Madre Mesenquimales se encuentran en muy baja concentración en la medula ósea mientras que la de las plaquetas es mucho mayor, por lo que en este caso la regeneración está basada principalmente en su presencia.

Estas no solo actúan en la hemostasia sino que son esenciales en las etapas iniciales de la recuperación de los tejidos gracias a los factores de crecimiento provenientes de sus gránulos. Entre ellos se destacan el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , agente quimiotáctico de las MSC y promueve la diferenciación de los osteoblastos), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, promueve la mitosis), el factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF, agente angiogénico) y el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF, al igual que el PDGF promueve la mitosis), las plaquetas liberan el contenido de los gránulos cuando toman contacto con fibrina o con el factor von Willebrand.

Esto tiene grandes implicancias ya que podrían ser una alternativa al uso de las MSC aisladas, lo que ahorra tiempo en el quirófano ya que se implantan directamente en el paciente luego de ser extraídas del humero o íleon.

Figura N° 20: Implante de Médula Osea percutáneo.



Fuente: Filomeno, 2013.

El procedimiento para conseguir Médula ósea es el mismo que el descrito anteriormente para realizar los aspirados (Kraus y Kinker-Head, 2006).

3) La medula ósea contiene varios tipos de CMA. Se encuentran las ya conocidas Hematopoyéticas y Mesenquimales, también las endoteliales, las de la población lateral, las progenitoras adultas Multipotentes, ovals y las CM muy pequeñas parecidas a embrionarias. A todas ellas se les ha dado el nombre de **Células Mononucleares (CMN)** (Hernández y Forrelat Barrios, 2013).

Estas son obtenidas a partir de la centrifugación y concentración de MO autóloga luego de descartar los hematíes y plaquetas, quedando listas para ser implantadas en el propio paciente (Hernández, 2013, comunicación personal), en forma local o sistémica.

Se han realizado experiencias alentadoras donde se explicaría que sus logros están dados por el sinergismo existente entre ellas.

En el año 2011 Hernández y col. diseñaron un trabajo donde se trataron humanos con CMN de médula ósea autóloga extraída de la cresta ilíaca, quienes padecían necrosis aséptica de la cabeza del fémur. Un mes después del implante en la mayoría de los pacientes la sintomatología había disminuido, a los cuatro meses podían caminar sin apoyo y un año y medio más tarde mediante densitometría ósea se pudo comprobar el aumento de la masa ósea en los sitios afectados. Concluyeron que el resultado era independiente de la cantidad de MSC presentes en cada implante, lo que reforzaría la teoría de que el resultado no depende de un solo tipo de CMA, sino del conjunto.

Si bien para obtener este concentrado de CMAdultas es necesario trabajo en el laboratorio, este requiere muy poco tiempo, es más, se podrían procesar en el momento de la cirugía.

Caso clínico

A continuación se presentara el caso de un paciente con patología ortopédica cuyo tratamiento se baso en el implante de MSC, realizado en el Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria, UdelaR (Yaneselli, 2012).

Datos del paciente:

Nombre: Sasha.

Especie: canino.

Raza: Greyhound.

Edad: 3 años.

Sexo: hembra.

Motivo de consulta: se fracturo la mano izquierda.

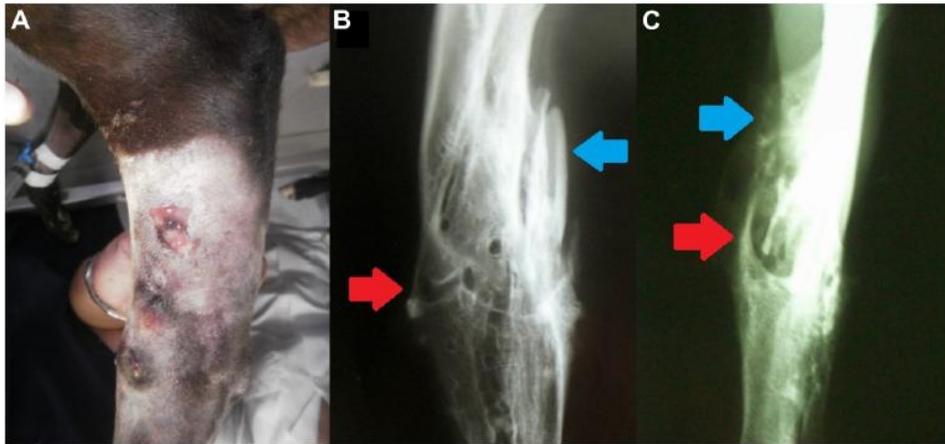
Anamnesis: la encontraron hace un mes con esta alteración ya instalada, por lo que no saben cuál fue la causa ni el tiempo de evolución.

Examen clínico: a la inspección se pudieron constatar fístulas múltiples con descargas de tipo purulento, atrofia muscular y claudicación severa.

A la palpación se comprobó dolor en la zona de las fistulas.

Diagnostico: gracia a las radiografías se pudo evidenciar una no unión en tercio medio de radio y ulna con osteomielitis crónica (Figura N° 21).

Figura N° 21: Miembro afectado, día 0.



(A) Fístulas. (B) Rx. lateral. (C) Rx frontal. Flechas rojas: no unión. Flechas azules: fragmentos de hueso y sitios de osteólisis.

Fuente: Yaneselli y col., 2013.

Tratamiento: se realizaron implantes de MSC alogénicos provenientes de tejido adiposo el que fue extraído de una hembra canina de 10 meses durante su ovariectomía.

Las MSC fueron aplicadas en 5 oportunidades, con intervalo de una semana entre ellas. Se inyectaron en forma subcutánea sobre la zona de no unión (ubicada por palpación) en la cantidad de 2×10^6 células por implante.

Como antibioticoterapia se decidió por la Clindamicina oral cada 12hs, durante 4 semanas.

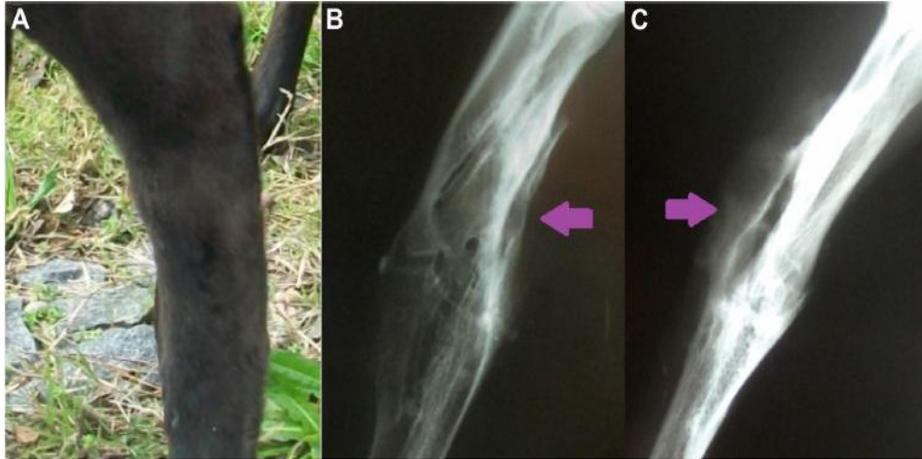
Resultados: se evaluó a la paciente por medio del examen clínico y radiológico durante 16 semanas.

En la semana 0 se observó claudicación severa y presencia de fístulas con contenido purulento, radiológicamente existen zonas de osteogénesis, osteólisis junto a la no unión.

A la 4ª semana la paciente presentó claudicación media y libre de fístulas, en la semana 16 el grado de claudicación disminuyó continuando libre de fístulas, en las

radiografías se ven zonas de reabsorción, regeneración y remodelación ósea correspondientes a una incipiente consolidación de la no unión (Figura N° 22).

Figura N° 22: Miembro afectado, semana 16.



(A) Miembro sin fístulas. (B) Rx lateral. (C) Rx frontal. Flechas violetas: áreas de reabsorción y regeneración ósea.

Fuente: Yaneselli y col., 2013.

DISCUSIÓN

La Terapia Regenerativa está en plena etapa de investigación en prácticamente todas las ramas de la medicina.

En lo que respecta a la Ortopedia Veterinaria, las MSC son el centro de atención por sus propiedades relacionadas a la regeneración del tejido óseo.

Como toda CM Adulta son células indiferenciadas que se encuentran en tejidos especializados, van renovando su población y son multipotentes, se diferencian en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Existe evidencia que indica su pluripotencialidad (Csaki y col., 2007).

Se ha descrito que estas se alojan en el tejido óseo actuando en su regeneración cuando son dañados, mediante los mecanismos de proliferación y diferenciación, secreción de distintas moléculas bioactivas, estimulando la angiogenesis y disminuyendo la reacción inflamatoria local (Yaneselli y col., 2013).

Cuando la pérdida de hueso es muy grande, existe daño crónico o infección, las MSC del paciente ven superada su capacidad de recuperación. Teniendo esta información resulta lógico pensar en la implantación de MSC exógenas para la reconstrucción ósea ofreciendo de esta manera una solución para las fracturas y sus complicaciones que es menos cruenta, requiere menos tiempo de cirugía, de recuperación, de cuidados post operatorios y que sobretodo puede llegar a evitar las amputaciones (Caplan, 1991).

Si bien las teorías referentes a su funcionamiento son similares entre los autores, Escario (2008) establece que este tipo de CM no se diferencia una vez implantadas sino que actúan estimulando a las propias del tejido a hacerlo. Arévalo Romero y col. (2007) consideran que se deberían estudiar en el nicho en el cual se desean implantar y no de forma aislada debido a que su mecanismo de acción podría variar según la interacción entre cada microambiente con las células implantadas, señalan que otras variables son el origen y número de células utilizadas. Es de común acuerdo que falta investigación al respecto.

La información con respecto al implante de Médula Ósea en ortopedia veterinaria es escasa. Lo que se conoce es que de esta forma la terapia estaría basada en los factores de crecimiento provenientes de las plaquetas, debido a que la concentración de MSC en este tejido es muy baja.

Éstas se pueden criopreservar (-196°C) o conservar refrigeradas (4°C) siempre y cuando sean utilizadas en un plazo de 54 horas (Rozman y col., 1995; Lamana Luzuriaga, 1996).

En cuanto a las CMN se mencionó que pueden ser extraídas de la médula ósea (Crovace y col., 2009). Con la finalidad de evitar la anestesia y morbilidad en la zona Hernández y col. (2011) diseñaron un método para movilizar las CMN desde la medula ósea hacia la sangre periférica. Para ello se basaron en el funcionamiento del sistema receptor/ligando (CXCR4/SDF-1) que las mantiene ancladas a los tejidos. A los pacientes, en este caso humanos, se les inyectó en forma subcutánea el factor estimulador de colonias de granulocitos (FECG), un factor movilizador que rompe el complejo CXCR4/SDF-1 permitiendo la liberación de las células al torrente sanguíneo. Luego de extraer la sangre de los pacientes, procedimiento que no causa mayores daños, se continúa con su procesamiento en el laboratorio.

Por esta razón es que son de elección con respecto a las provenientes de la médula ósea, ya que los resultados obtenidos luego de ser implantadas son prácticamente iguales.

Otra aplicación de la terapia regenerativa basada en las CMN es en las patologías que requieren la formación de nuevos vasos sanguíneos, ya que su administración puede influir en la liberación de factores angiogénicos o puede aportar progenitores de células endoteliales. En el mismo trabajo diseñado por Hernandez y col. (2011) estas fueron inyectadas en humanos con afecciones que tienen como denominador común la falta o disminución del aporte sanguíneo como isquemia de miembros inferiores, úlceras en pacientes diabéticos, infarto agudo de miocardio, enfermos con trastornos neurológicos crónicos por lesiones vasculoencefálicas entre otras alteraciones. Ellos observaron revascularización de los miembros afectados reduciendo las amputaciones en un 73% de los afectados, disminución del tamaño

en las úlceras a la semana del implante, mejoría de la función ventricular y una evolución favorable de los signos clínicos en los que padecían patologías neurológicas.

Estudios recientes realizados en animales con necrosis de cabeza de fémur, han comprobado que la descompresión de la zona necrótica más implantación de CMN produce mejores resultados que la simple descompresión.

De todo lo antes presentado se desprende la potencialidad de este conjunto de CMA, el inconveniente es la escasa cantidad de bibliografía publicada al respecto (Hernández y col., 2011).

Si bien uno de los orígenes más estudiados para la obtención de **MSC** es la médula ósea, el tejido adiposo va adquiriendo cada vez más relevancia. Las CM provenientes de ambos tejidos se diferencian en osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Arevalo y col., 2007; Carrasco y col., 2010).

Las ventajas que presenta el tejido adiposo es su fácil obtención de varias zonas del cuerpo y la baja morbilidad que el proceso representa para los pacientes. Otra está relacionada con la cantidad de MSC, en un gramo de tejido adiposo humano existen 5×10^3 CM, 500 veces más que en un gramo de medula ósea (Planas y Coronel, 2011).

MSC autólogas vs. Alogénicas: se han realizado trabajos en humanos y animales en los que se ha comprobado que las MSC provenientes tanto de medula ósea como de tejido adiposo son inmunoprivilegiadas. Poseen baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) y no expresan el MHC II. Se comprobó gracias a Liu y col. (2013), que los osteoblastos derivados de MSC provenientes de tejido adiposo conservan esta propiedad, ocurre lo contrario con los osteoblastos que se encuentran en los tejidos adultos. Otra de las causas que las hacen inmunomoduladoras es que suprimen la proliferación de los linfocitos T y B. Esta interacción con el sistema inmune requiere mayor investigación debido al impacto que pueden tener este tipo de CM en el tratamiento de patologías inmunomediadas.

Liu y col. en el año 2013 implantaron MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo en un modelo canino con gran pérdida de hueso en el cráneo sin terapia inmunosupresora. Como resultado observaron que la regeneración ósea se da de la misma forma que la obtenida con CM autólogas y no observaron reacciones inflamatorias locales ni sistémicas. Estos mismos resultados fueron obtenidos por Liningston y col. diez años antes en un estudio similar realizado en caninos con la diferencia de haber utilizado medula ósea como fuente de CM. Ellos encontraron que las células permanecían viables ocho semanas después de ser implantadas.

En el año 2009 Granero-Moto y sus colaboradores realizaron una experiencia donde inyectaron de forma sistémica MSC alogénicas derivadas de MO en ratones con fractura de tibia. Encontraron que las células una vez que llegan al nicho expresan una proteína iniciadora de la reparación ósea llamada BMP-2 que es la encargada de dirigir la diferenciación de las MSC hacia osteoblastos. Ya que las células fueron implantadas de forma i/v, los científicos comprobaron que migran hacia la zona de la injuria gracias al receptor para quimiocina CXCR4 presente en la superficie celular que se une a su ligando, la quimiocina SDF-1 quien es liberada cuando el tejido óseo es dañado. Sin embargo hay discrepancias en cuanto a si las células madre realmente expresan el receptor CXCR4. Esto puede estar relacionado a los tiempos de cultivo y pasajes celulares, ya que a mayor cantidad de pasajes la expresión del receptor es cada vez menor y por lo tanto la habilidad de las MSC para llegar al sitio a reparar. La solución que vieron los autores fue utilizar cultivos sin haber sufrido pasaje alguno.

Se debe tener en cuenta que la cantidad de células madre a implantar también es importante, ya que la simple presencia de unas pocas células no garantiza la regeneración ósea. Aun no se ha llegado a determinar cuál es el número necesario ni con qué frecuencia deben ser aplicadas, tampoco la vía de administración más eficaz.

Yaneselli y col. (2013), realizaron cinco implantes, uno por semana en un canino con osteomielitis crónica y no unión del radio y cubito, cada uno contenía 2×10^6 células que fueron inyectadas en forma percutánea sobre la alteración.

En el año 2009 Granero-Molto y su equipo inyectaron por única vez 1×10^6 células de forma sistémica en ratones con fractura de tibia.

En un trabajo con caninos que padecían osteoartritis de la articulación coxofemoral, Black y col. (2007) implantaron dentro de la misma 5×10^6 células en una única oportunidad.

Todos estos autores obtuvieron resultados positivos basados en el potencial regenerativo de las MSC.

Zachos y Smith (2009) describen una técnica de infiltración de MSC diferente a la utilizada en nuestro medio. Ellos deciden exponer la zona de hueso afectado para hacerle pequeñas perforaciones con la finalidad de que las CM del paciente tomen contacto directamente y con mayor velocidad con las que serán implantadas en forma intralesional.

Existe controversia con respecto a la generación de tumores por parte de las MSC, en el año 2010 Carrasco y col. señalaron que una vez implantadas pueden transformarse en tejidos atípicos como el carcinoma. Esto es apoyado por Ghannam y col. (2010) quienes agregan la posibilidad de formación de tejido ectópico, mientras que en Cuba Hernández y col. un año más tarde publicaron un trabajo donde informan que hasta esa fecha no han aparecido reportes de tumores generados luego de este tipo de terapia, aun en pacientes controlados durante más de 2 años.

En cuanto al uso de MSC para el tratamiento de las uniones retardadas, no uniones y osteomielitis hay muy poca información, de todas maneras la recabada sobre fracturas y otras patologías ortopédicas puede ser de utilidad para aplicarlas en estos casos.

Black y col. (2007) observaron que su implantación mejora la sintomatología de caninos con osteoartritis, incluso evito la eutanasia de aquellos cuyo dolor no había encontrado solución hasta ese momento, por su parte Gaynor en el año 2008, Granero-Molto con su equipo en el 2009 junto con Hernández y col. cuatro años después concluyeron que no solo mejoran el proceso de regeneración en las

fracturas, sino que evitan el surgimiento de complicaciones gracias al éxito en la consolidación ósea.

Arevalo Romero y col. (2007) y más tarde Socarras Ferrer y col. (2013) publicaron resultados satisfactorios observados en ratones y perros con pérdidas de tejido óseo en cráneo y huesos largos.

Si bien estos resultados son auspiciosos, la mayoría de los trabajos basan sus resultados en análisis post mortem, por lo tanto la evolución de los implantes a largo plazo no es conocida.

Los resultados obtenidos hasta el momento con cualquiera de estas formas de aplicación de Células Madre Adultas son alentadores, de todas maneras no se puede perder de vista que se está en etapas experimentales.

CONCLUSIÓN:

Actualmente el tratamiento para las fracturas y sus complicaciones es básicamente quirúrgico, en algunos casos se deben realizar varias cirugías, cuando estas últimas se dan, con los riesgos que esto implica. Desafortunadamente en otros la amputación del miembro afectado es lo indicado.

Las MSC son células madre adultas que forman parte del tejido óseo actuando en su mecanismo natural de regeneración mediante los procesos de proliferación, diferenciación, inmunomodulación y angiogenesis.

En determinadas ocasiones la capacidad regenerativa de estas células se ve superada razón por la cual el hueso por sí mismo no se puede recuperar. Por lo tanto resulta lógico pensar en suministrarle al tejido dañado un aporte externo de células para que cumplan con su función y lo reparen.

Gracias a los trabajos publicados hasta el momento, se puede afirmar que la terapia regenerativa en base a las MSC en ortopedia veterinaria tiene resultados positivos.

Por lo anteriormente expuesto con respecto a su forma de obtención, propiedades regenerativas y por brindar la posibilidad de crear bancos celulares, se puede concluir que las MSC alogénicas derivadas del tejido adiposo son la mejor opción

Aun quedan interrogantes por resolver, tales como conocer su funcionamiento a largo plazo in vivo, que cantidad se deben inyectar en cada implante y frecuencia de aplicación, si actúan mejor aisladas o en conjunto ya sea con otras CMA o con factores de crecimiento, por lo que llevar la terapia regenerativa al consultorio veterinario requiere más investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Aceña, M., Liste, F., Gascón, F. (1992). Biopsia de médula ósea en perro: técnica y utilidad diagnóstica clínica. *Veterinaria de pequeños animales*. 12(2):107-116.
2. Aflatoonian, B., Moore, H. (2006). Focus on Stem Cells Germ cells from mouse and human embryonic stem cells. *Reproduction*. 132:699–707.
3. Anderson, A. (1998). Osteomyelitis. En: Coughlan, A., Miller, A. *Manual of small animal fracture repair and management*. Hampshire. British Small Animal Veterinary Association. p.317-327.
4. Arevalo Romero, J., Páez Guerrero, D., Rodríguez Pardo, V. (2007). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA*. 5(8):177-184.
5. Baskey, A. (2006). Tejido conjuntivo del sistema musculoesquelético. En: Slatter, D. *Tratado de cirugía en pequeños animales*. 3ª Ed. Buenos Aires. Intermédica. p.2031-2043.
6. Benedetti, L. (2013). Medicina Regenerativa-Rehabilitación de lesiones de tendones, ligamentos y osteoarticulares. 2º Congreso de Veterinaria Equina. Asociación Uruguaya de Estudiantes de Veterinaria Equina. Montevideo, Uruguay. p.13.
7. Bennett, D. (1998). Complications of fracture healing. En: Coughlan, A., Miller, A. *Manual of small animal fracture repair and management*. Hampshire. British Small Animal Veterinary Association. p.329-340.
8. Black, L.; Gaynor, J.; Gahring, D.; Adams, C. (2007). Effect of adipose-derived stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics*. 8 (4):271-284.
9. Brazzini, A., Cantella, R., De la Cruz, A., Yupanqui, J., León, C., Jorquiera, T., Brazzini, M., Ortega, M., Saenz, L.N. (2010). Intraarterial Autologous Implantation of Adult Stem Cells for Patients with Parkinson Disease. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 21(4):443–451.

10. Bubenik, L., Smith, M. (2006). Infecciones ortopédicas. En: Slatter, D. Tratado de cirugía en pequeños animales. 3ª Ed. Buenos Aires. Intermédica. p.2130-2146.
11. Callejas, J., Gonzalez, A. (1995). Conservación de médula ósea humana a 4°C. Disponible en: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=21364&id_seccion=661&id_ejemplar=2198&id_revista=66. Fecha de consulta: 18/02/2014.
12. Canapp, S. (2012). Current treatment options for elbow disease. Veterinary Orthopedic & Sports Medicine Group. Maryland, United States of America. Disponible en: <http://veterinarycalendar.dvm360.com/avhc/Medicine/Current-treatment-options-for-elbow-disease-Procee/ArticleStandard/Article/detail/771437>. Fecha de consulta: 12/10/2013.
13. Caplan, A. (1991). Mesenchymal Stem Cells. Journal of Orthopaedic Research. 9:641-650.
14. Carnot- Uría, J. (2012). Logros y perspectivas del trasplante de células hematopoyéticas en Cuba. Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 28(2):108-110.
15. Carrasco, A., Ríos, H., Castillo, J. (2010). Células Mesenquimales Estromales. Revista Horizonte Médico. 10(2):32-36.
16. Crovace, A., Staffieri, F., Rossi, G., Francioso, E. (2009). Implantation of autologous bone marrow mononuclear cells as a minimal invasive therapy of "Legg-Calve-Perthes" disease in the dog. 1st International meeting of the Veterinary Stem Cell Consortium. Leipzig, Germany. p.13.
17. Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., Ye, H., Shakibaei, M. (2007). Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. Histochemistry and Cell Biology. 128(6):507-520.
18. Di Fiore, M. (1996). Tejido óseo. En: Di Fiore, M. Atlas de histología normal. 7ª Ed. Buenos Aires. El Ateneo. p.26-29.

19. Di Sevo Mallo, V. (2013). Utilización de hueso xenogénico como elemento de osteosíntesis en medicina veterinaria. Tesis. Universidad de la Republica. Facultad de Veterinaria. 67 p.
20. Dyce, K., Sack, W., Wensing, C. (1999). Algunos conceptos y hechos básicos. En: Dyce, K., Sack, W., Wensing, C. Anatomía veterinaria. 2ª Ed. Mexico D.F. McGraw-Hill Interamericana. p.1-32.
21. Erickson, K. (2008). Células Madres, fuentes, procedimientos de reparación, uso en medicina veterinaria. Conferencia de la Asociación Mundial de Veterinaria Equina. Asociación Uruguaya de Veterinaria Equina. Montevideo, Uruguay. 20 p.
22. Escario, A. (2008). Medicina Regenerativa: Células Madre como nueva terapia biológica aplicada en el transporte endocondral. Tesis. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 262 p.
23. Evans, M.J., Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature.292:154-156.
24. Fawcett, D. (1995). Las células del hueso. En: Fawcett, D. Tratado de histología. 12ª Ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. p.228-236.
25. Fossum, T. (2009). Fundamentos de la cirugía ortopédica y manejo de las fracturas. En: Fossum, T. Cirugía en pequeños animales. 3ª Ed. Missouri. Elsevier Mosby. p.999-1014.
26. Fossum, T. (2002). Otras enfermedades de los huesos y articulaciones. En: Fossum, T. Cirugía en pequeños animales. 2ª Ed. Missouri. Elsevier. p.1250-1275.
27. Fujimoto, Y., Abematsu, M., Falk, A., Tsujimura, K., Sanosaka, T., Juliandi, B., Semi, K., Namihira, M., Komiya, S., Smith, A., Nakashima, K. (2012). Treatment of a Mouse Model of Spinal Cord Injury by Transplantation of Human iPS Cell-derived Long-term Self-renewing Neuroepithelial-like Stem Cells. Stem Cells. 30(6):1163-1173.
28. Gardel, L., Frias, C., Afonso, M., Serra, L., Rada, T., Gomes, M., Reis, R. (2009). Autologous stem cell therapy for the treatment of bone fractures in cat:

a case report. 1st International meeting of the Veterinary Stem Cell Consortium. Leipzig, Germany. p.17.

29. Garrido, C. (2003). Estado actual de la investigación con células madre. *Anales de Pediatría* 59(6):552-558.
30. Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomas, E.D., Thomson, J., Wilmunt, I. (2009). *Essentials of stem cell biology*. 2^a Ed. California. Elsevier. 650p.
31. Ghannam, S.; Bouffi, C.; Djouad, F.; Jorgensen, C.; Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy* 1(2): 1-7.
32. Granero-Molto, F., Weis, J., Miga, M., Landis, B., Myers, T., O'rear, L., Longobardi, L., Jansen, E., Mortlock, D., Spagnoli, A. (2009). Regenerative effects of transplanted Mesenchymal Stem Cells in fracture healing. *Stem*. 27:1887–1898.
33. Goodship, A. (2009). Developmente of cell-based strategies in the management of orthopedic conditions: needs in humans and animals. Leipzig. 1st International meeting of the Veterinary Stem Cell Consortium. Leipzig, Germany. p.18.
34. Hernández, P., Forrellat-Barríos, M. (2013). Ventajas de la terapia celular con células mononucleares derivadas de la médula ósea, aplicadas en su conjunto. (Comunicación breve) *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 29 (4). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/127/93>. Fecha de consulta: 24/10/13.
35. Hernández, P., Alfonso-Simón, A., Aparicio-Suárez, J., Artaza-Sanz, H., Baganet-Cobas, A., Blanco-Díaz, A., Cabrera-Zamora, M., Cruz-Tamayo, F., Díaz-Díaz, A., Díaz-Ramírez, F., Dorticós-Balea, E., Fernández-Águila, J., García-Ibarra, R., Goicoechea-Díaz, P., González-Suárez, T., González-Iglesias, A., Hernández-Cañero, A., Lam-Díaz, R., Amado, L., Macías-Abraham, C., Macías-González, R., Martínez-de Pinillos, M., Obregón-Santos,

- A., Peix-González, A., Pérez-Borrego, A., Pol-Marró, N., Socarrás-Ferrer, B., Suárez-Monteagudo, C., Valle-Pérez, L., Wilford-de León, M. (2011). Experiencia cubana con el uso terapéutico de células madre adultas. *Revista Cubana de Hematología Inmunología y Hemoterapia*. 27(1): 139-163.
- 36.** Hernández, P. (2009). Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional*. 25(1): 1-15.
- 37.** Hernández, P.; Dórticos Balea, E. (2004). Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 20(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000300001&lng=es&nrm=iso. Fecha de consulta: 13/08/2011
- 38.** Hernández-Hernández, A., Anillo-Badias, R., Castro-Gutiérrez, Y., León Valdés, E., Baganet-Cobas, A., Fernández-Delgado, N. (2013). La medicina regenerativa y sus vínculos con la medicina del deporte. *Revista Cubana de Hematología Inmunología y Hemoterapia*. 29 (2): 134-142. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892013000200004&lng=es. Fecha de consulta: 22/10/2013.
- 39.** Hulse, D., Hyman, B. (2006). Biología y biomecánica de la fractura. En: Slatter, D. *Tratado de cirugía en pequeños animales*. 3ª Ed. Buenos Aires. Intermédica. p.2044-2053.
- 40.** International Society for Stem Cell Research. Frequently Asked Questions. *Understanding Stem Cells*. Disponible en: <http://www.isscr.org/FAQ1.htm> Fecha de consulta: 10/09/11.
- 41.** International Society for Stem Cell Research. Stem Cell Facts. Disponible en: http://www.isscr.org/AM/Template.cfm?Section=Stem_Cell_Facts&Template=/CM/ContentDisplay.cfm&ContentID=3247. Fecha de consulta: 10/09/11
- 42.** Jackson, L., Jones, D.R., Scotting, P., Sottile, V. (2007). Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *Journal of Postgraduate Medicine* 53(2):121-127.
- 43.** James, S., Gaynor, J. (2008). Stem cell therapy for osteoarthritis. *North*

- American Veterinary Conference. Florida, United States of America. p.1016.
- 44.**Kelly, E (2007).Stem cells. Westport, Greenwood, 204p.
- 45.**Kowaleski, M; Saunders, W. (2013). Cell-based therapies in orthopedic surgery: examining the evidence. Small Animal and Exotics Proceedings. North American Veterinary Conference. Florida, United States of America. p.19.
- 46.**Kraus, K., Kinker-Head, C. (2006). Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. *Veterinary Surgery*. 35: 232-242.
- 47.**Lamana Luzuriaga, M. (1996). Trasplante Autólogo de Médula Osea: efecto sobre el injerto de la manipulación de las células hematopoyéticas y de las variables clínicas. Tesis. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina. 179 p.
- 48.**Liu, G., Zhang, Y., Liu, B., Sun, J., Li, W.,Cui, L. (2013). Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials* 34:2655-2664.
- 49.**Livingston, T., Peter, S., Archambault, M., van den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A., Kadiyala, S. (2003). Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Regenerate Bone in a Critical-Sized Canine Segmental Defect. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 85:1927-1935.
- 50.**McSherry, L. (2007). Técnicas de aspirado y biopsia de la médula ósea. En: Ettinger, S., Feldman, E. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del perro y el gato*. 6ª Ed. Madrid. Elsevier. p.285-286.
- 51.**Millis, D., Jackson, A. (2006). Uniones demoradas, no uniones y mal uniones. En: Slatter, D. *Tratado de cirugía en pequeños animales*. 3ª Ed. Buenos Aires. Intermédica. p.2116-2130.
- 52.**Mukhopadhyay, C.S., Tokas, J., Mathur, P.D. (2011). Prospects and Ethical Concerns of Embryonic Stem Cells Research-A Review. *Veterinary World* 4(6): 281-286.

- 53.** National Institutes of Health (2012). Clinical Trials.org. Disponible en: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01321333?cond=%22Spinal+Cord+Injuries%22&rank=1>. Fecha de consulta: 19/06/2012.
- 54.** National Institutes of Health (2012). United States Department of Health and Human Services. Clinical Trials.org. Disponible en: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01393977?cond=%22Spinal+Cord+Injuries%22&rank=15>. Fecha de consulta: 19/06/2012.
- 55.** National Institutes of Health United States Department of Health and Human Services. (2001). Stem cells: scientific progress and future research directions. Disponible en: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/fullrptstem.pdf>. Fecha de consulta: 29/09/11.
- 56.** National Institutes of Health. United States Department of Health and Human Services. {201-?}. Regenerative Medicine. Disponible en: http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf. Fecha de consulta: 28/09/11.
- 57.** National Institutes of Health U.S. Department of Health and Human Services. Stem Cell Basics. Disponible en: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf> Fecha de consulta: 05/09/11.
- 58.** Piermattei, D., Flo, G. (1999a). Fracturas: clasificación, diagnóstico y tratamiento. En: Piermattei, D., Flo, G. Manual de ortopedia y reparación de fracturas de pequeños animales. 3ª Ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. p.25-148.
- 59.** Piermattei, D., Flo, G. (1999b). Tratamiento de infecciones óseas agudas y crónicas. En: Piermattei, D., Flo, G. Manual de ortopedia y reparación de fracturas de pequeños animales. 3ª Ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. p.165-172.
- 60.** Piermattei, D., Flo, G. (1999c). Unión retrasada y no unión. En: Piermattei, D., Flo, G. Manual de ortopedia y reparación de fracturas de pequeños animales. 3ª Ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. p.156- 164.

- 61.** Planas Ribo, J., Coronel Gagliardi, R. (2011). Obtención y criopreservación de células madre del tejido graso mediante liposucción. *Cirugía plástica Ibero-Latinoamericana*. 37(4):319-324.
- 62.** Pineda Molina, C., Londoño Pelaez, C. (2009). Obtención de Células Madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. *Revista Ingeniería Biomédica*. 3(5): 58-65.
- 63.** Reich, C., Raabe, O., Wenisch, S., Bridger, P., Kramer, M., Arnhold, S. (2009). Comparison of canine adipose & bone marrow-derived mesenchymal stem cells. 1st International meeting of the Veterinary Stem Cell Consortium. Leipzig, Germany. p.33.
- 64.** Roe, S. (1998). Biomechanical basis of bone fracture and fracture repair. En: Coughlan, A., Miller, A. *Manual of small animal fracture repair and management*. Hampshire. British Small Animal Veterinary Association. p.17-28.
- 65.** Rozman, C., Carreras, E., Sierra, J., Urbano, A., Conde, E. (1995). Trasplante de médula ósea. En: Ferreras, P., Rozman, C. *Medicina Interna*. 13^a Ed. Madrid, Mosby/Doyma Libros. p.1566.
- 66.** Skerry, T. (1998). Fracture healing. En: Coughlan, A., Miller, A. *Manual of small animal fracture repair and management*. Hampshire. British Small Animal Veterinary Association. p.29-34.
- 67.** Socarrás-Ferrer, B., del Valle-Pérez, L., de la Cuétara-Bernal, K., Marsán-Suárez, V., Sánchez Segura, M., Macías-Abraham, C. (2013). Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica en la medicina regenerativa. *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 29 (1):16-23.
- 68.** Spencer, N., Chun, R., Vidal, M., Gimble, J., Lopez, M. (2012). In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *The Veterinary Journal*. 191:231–239.
- 69.** Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from

Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell 126:663–676.

- 70.** Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282:1145-1147.
- 71.** Welch, U. (2010). Células de la sangre. En: Welch,U. Histología. 2ª Ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. p.207-234.
- 72.** Yaneselli, K.(2012). Implante de Células Madre Mesenquimales Alogénicas en una no unión de radio en un canino. Tesis. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. 39 p.
- 73.** Yaneselli, K., Filomeno, A., Semiglia, G., Arce, C., Rial, A., Muñoz, N., Moreno, M., Erickson, K., Maisonnave, J. (2013). Allogenic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. Veterinary Medicine: Research and Reports. 4:39-44.
- 74.** Yi, T., Song, S. (2012). Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. Archives of Pharmacal Research 35(2): 213-221.
- 75.** Zachos, T., Smith, T. (2009). What is Stem Cell therapy and how does it help orthopedic patients? North American Veterinary Conference, Orlando. Florida, United States of America. p.1104-1106.
- 76.** Zapatan, N., Garcia, F. (2011). Preguntas y Respuestas sobre Medicina Regenerativa. Revista Ingeniería Biomédica. 5(10):23-30.

