

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**RESPUESTA A LA TERAPIA REGENERATIVA CON CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES ALOGÉNICAS, APLICADAS EN CASOS CLÍNICOS CON  
DEFECTOS ÓSEOS EN CANINOS**

por

**HEIKE AGNES DÍAZ HARMSEN**

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

MODALIDAD: Estudio de Caso

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2016**

## **Página de Aprobación**

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa

---

Dr. Pedro Martino

Segundo miembro (tutor)

---

Dra. Jacqueline Maisonnave

Tercer miembro

---

Dr. Martín Breijó

Cuarto miembro

---

Dr. Gabriel Semiglia

Quinto miembro

---

Dr. Kevin Yaneselli

Fecha:

24 de Febrero de 2016

Autor

---

Br. Heike Díaz

## **Agradecimientos**

Muchas gracias a los doctores Jacqueline, Kevin y Gabriel por aceptar y guiarme con paciencia en la elaboración del trabajo; por generarme un gran interés en el estudio y uso de las células madre y por enseñarme el manejo en laboratorio para obtener estas células.

No olvido a mis compañeras de laboratorio por ayudarme un montón durante mi trayecto por el laboratorio, así como los demás integrantes de la cátedra de Inmunología.

A mis compañeros de todos estos años, por los que pasamos penas, alegrías y algunos tropiezos.

A mi familia principalmente, por apoyarme en la decisión que tomé al elegir esta carrera y que tanto adoro desde el momento que comencé.

## Tabla de contenido

Página de Aprobación.....	2
Agradecimientos.....	3
Resumen.....	5
Summary.....	6
Introducción.....	7
Medicina ortopédica.....	7
Tejido óseo.....	7
Fracturas: concepto, clasificación, diagnóstico.....	8
Tratamiento convencional de las fracturas.....	10
Evaluación radiológica post-quirúrgica.....	13
Complicaciones frecuentes de las fracturas.....	14
Medicina Regenerativa.....	16
Clasificación de Células Madre.....	16
Características y propiedades Células Madre Mesenquimales (CMM).....	17
Aislamiento, cultivo y expansión de CMM.....	18
Aplicación de CMM.....	19
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
Materiales y Métodos.....	20
Terapia con CMM derivadas de tejido adiposo (TA).....	22
Evaluación post-implante de CMM-TA.....	23
Resultados.....	24
Discusión.....	27
Conclusiones.....	29
Referencias bibliográficas.....	29

## Resumen

Los defectos óseos graves en caninos pueden resultar en complicaciones como unión retardada o no-unión, frecuentemente en huesos largos. La terapia tradicional consta en reintervención quirúrgica y/o antibioticoterapia según el caso, pero obteniéndose generalmente pocos resultados alentadores. Existen opciones terapéuticas para combatir estas complicaciones como el uso de células madre mesenquimales (CMM). Las CMM presentan características atractivas para su uso terapéutico, como su capacidad de promover la angiogénesis, ser inmunomoduladoras y multipotentes. El objetivo general de este trabajo fue evaluar el tratamiento con CMM derivadas de tejido adiposo (CMM-TA) alogénicas, en dos casos clínicos caninos, con defectos óseos graves. Las CMM-TA alogénicas fueron aplicadas repetidas veces, por vía percutánea sobre la zona de lesión o sobre xenoinjerto de hueso en los casos clínicos tratados. En ambos pacientes fue realizado un seguimiento clínico y radiológico, hasta un año post tratamiento con CMM. Al finalizar la terapia, en ambos pacientes se observó una mejoría clínica y radiográfica luego de la aplicación de CMM-TA. No hubieron signos de rechazo de dichos implantes. La conclusión es que existió un retorno funcional de los miembros afectados en ambos casos y no se observaron efectos adversos a los aloinjertos, lo que nos indica que la terapia celular contribuyó a su recuperación y podría utilizarse como opción alternativa a las terapias tradicionales. Es necesaria la profundización del conocimiento sobre las CMM y su efecto terapéutico *in vivo*.

Palabras clave: células madre mesenquimales, terapia regenerativa, ortopedia, caninos.

## Summary

Severe bone defects in dogs may show often complications like delayed union or nonunion, in long bones. With these severe bone defects traditional treatment is often not sufficient. But there are new therapeutic approaches to combat these complications, as the use of mesenchymal stem cells (MSC). MSC have an attractive feature for therapeutic use, due to their ability to promote angiogenesis, be immunomodulatory and multipotent. The overall objective of this study was to evaluate treatment with allogeneic MSC adipose derived (AD-MSC) in two canine clinical cases, with severe bone defects. Allogenic AD-MSC were applied repeatedly percutaneously over the area of injury or the bone xenograft in clinical cases. In both patients it was performed a clinical and radiological follow up for one year. After the therapy, in both patients a significant clinical and radiographic improvement was observed rapidly during the application of AD-MSC implants. There were no signs of rejection of such implants. The conclusion is that there was a functional return of the affected leg in both cases and no adverse effects were observed after the allografts, which indicates that cell therapy contributed to the recovery and can be used as an alternative option to traditional therapies. More studies are necessary to increase the knowledge about the MSC and their *in vivo* therapeutic effect are necessary.

Key words: mesenchymal stem cells, regenerative therapy, orthopedics, canines.

## **Introducción.**

Las fracturas y sus complicaciones representan un número significativo de los casos en la clínica veterinaria en general. Las causas más habituales se relacionan con traumatismos, principalmente de huesos largos, y enfermedades articulares (Fossum y col, 2009).

Existen múltiples tratamientos utilizados en el presente para las diferentes afecciones óseas, pero muchas veces éstos no tienen un resultado efectivo a largo plazo debido a la naturaleza de la enfermedad, como ocurre frecuentemente con las no uniones óseas y las osteomielitis (Fossum y col, 2009). Esto motivó a estudiar terapias alternativas para tratar estas complicaciones ortopédicas, como la medicina regenerativa con células madre mesenquimales (CMM), la cual ha tenido resultados prometedores en medicina veterinaria (Guercio y col., 2012; Vilar y col, 2013; Marx y col., 2014).

## **Medicina ortopédica**

### Tejido óseo

Es el único tejido del organismo capaz de regenerarse completamente posterior a un trauma. Histológicamente, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, organizándose estructuralmente en laminillas de matriz osteoide calcificada. La forma de disposición de dichas laminillas es la que determinará el tipo de tejido óseo; esponjoso o cortical. El hueso cortical (o compacto) está compuesto por los llamados conductos de Havers, recubiertos por laminillas óseas de ubicación concéntrica; por el contrario, el hueso esponjoso está formado por laminillas dispuestas en forma de red, entre cuyos espacios se encuentra la médula ósea.

En las laminillas de ambos tipos de tejido se encuentran las células óseas, los osteocitos, osteoblastos y osteoclastos, matriz orgánica y minerales.

Las células óseas se encuentran tanto dentro de las laminillas como en el estroma de la médula ósea, en la que además se encuentran en gran cantidad células madre multipotenciales indiferenciadas. La función de los osteoblastos es sintetizar matriz orgánica y expresar la enzima fosfatasa alcalina que permite la mineralización de la matriz. También sintetizan colágeno y otras proteínas de la matriz, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz, median la reabsorción ósea (en la que

intervienen además los osteoclastos), y sintetizan factores de crecimiento. Una vez que los osteoblastos se rodean de matriz osificada, pasan a llamarse osteocitos. A diferencia de los osteoblastos y osteoclastos, estas son las únicas células del hueso que se encuentran dentro de las laminillas óseas, las anteriores se ubican en su periferia. Los osteocitos tienen como principal función la de controlar el remodelado óseo. Por último los osteoclastos son las células encargadas de la reabsorción de hueso, que para cumplir con su función deben adherirse a la superficie ósea diana (Fernández-Tresguerres y col, 2005).

### Fracturas

Se define fractura como la interrupción completa o incompleta de la continuidad del hueso y/o del cartílago (Piermattei D y col, 2007).

Se han establecido varios esquemas para clasificar los tipos de fractura que describen la integridad de los tejidos blandos regionales, la geometría y número de líneas de fractura, el grado de afectación fisario-metafisario-epifisario y las demás características pertinentes. El tipo de fractura puede influir en el plan terapéutico, la tasa de cicatrización, la apariencia del callo óseo y la posibilidad de complicaciones posquirúrgicas. La mayoría de las fracturas pueden clasificarse de la siguiente manera:

- 1) Integridad de los tejidos blandos: los defectos en la piel alrededor de la fractura pueden comunicar con la misma, dando lugar a contaminación de la herida. Según el grado de afección de piel, se clasifican en – fracturas abiertas, que tienen un defecto en la piel de la región de la misma, y – fracturas cerradas, las cuales no tienen alteración de dicho tejido.
- 2) Descripción de una fractura mediante geometría y el número de líneas de fractura: tenemos – fracturas completas, tienen una línea de fractura que se extiende en todo el hueso, pudiendo su dirección con respecto al eje longitudinal del hueso ser de tipo transversa, oblicua, en espiral, o longitudinal. – fracturas conminutas, que tienen múltiples líneas de fractura que comunican con un único plano o punto. – fracturas múltiples, son similares a las anteriores con la diferencia de que los fragmentos óseos no comunican con un punto común. – fracturas incompletas, afectan una sola cortical. Hay muchos tipos, dos de ellos más comunes son las fracturas en “tallo” o “vara verde” que se dan en animales jóvenes, y la fracturas por

estrés. – fracturas por impactación, se deben a fuerzas de compresión que acortan la longitud del hueso por aplastamiento. – fracturas por depresión, que se observan en el cráneo y senos. – fracturas por avulsión, las cuales suelen ser resultado de una excesiva tracción por un músculo, tendón, ligamento, o capsula articular. fracturas chip, son pequeños fragmentos que se deben por lo general a un traumatismo directo sobre el hueso o a hiperextensión. Fracturas supracondilares, condilares, y bicondilares, éstas indican que la línea de fractura se produjo en la metáfisis cerca del cóndilo o a través de la región condilar y supracondilar respectivamente. – fracturas-luxaciones, son luxaciones articulares asociadas a fractura de uno o ambos huesos que componen la articulación.

3) Grado de afectación fisaria: es una clasificación especial para fracturas en los huesos en crecimiento, basado en el esquema Salter-Harris. Actualmente, existen 6 tipos (nombradas tipo 1 - 6) de acuerdo con el grado de afección metafisaria-fisaria-epifisaria. Las lesiones tipo 2 son las más comunes. Las complicaciones graves de las fracturas Salter incluyen trastornos del crecimiento que se evidencian clínicamente y anomalías articulares.

4) Fracturas patológicas: son las que aparecen espontáneamente sin historia de un traumatismo anterior, que se producen en huesos anormalmente debilitados por una lesión preexistente. Son ejemplos frecuentes las fracturas debidas a tumores óseos; el hiperparatiroidismo nutricional secundario puede generar múltiples fracturas en varios huesos a la vez, debido a la disminución de la densidad ósea generalizada (Thrall D, 2003; Fossum 2009).

Clínicamente, las fracturas se identifican con una cojera específica, generalmente. La palpación del foco problema para detectar el defecto es esencial, pero su facilidad de detección está dada por el grado de deslizamiento de la fractura. No hay que olvidar que la correcta anamnesis y la exploración ortopédica completa son infaltables (Fossum y col., 2009).

El diagnóstico confirmatorio de una fractura es mediante radiografía, en la cual pueden verse una o múltiples líneas de fractura radiolúcidas (de color oscuro), o existir una línea esclerótica (radiopaca, de color más blanco que el resto del hueso) o zona en la que se superpongan las radiodensidades de los fragmentos óseos (Thrall D, 2003).

Las fracturas expuestas de radio, cúbito y tibia (cubito-radio están menos irrigados que los demás huesos de los miembros) son las más frecuentes dentro de las fracturas expuestas de los huesos largos y representan un desafío terapéutico, dada la alta tasa de osteomielitis que se produce a causa de dichas fracturas, lo que lleva a una unión retardada o una no-unión del hueso afectado (Fossum y col., 2009; Slatter, 2006; Yaneselli 2012).

### Tratamiento convencional de las fracturas

Antes de la reparación de los tejidos dañados, está la preservación de la vida del paciente, por lo tanto se debe evaluar el individuo y tratar el posible shock, hemorragia y heridas graves de los tejidos blandos, si es que existen (Fossum y col., 2009).

Una vez evaluado clínicamente el paciente, se le indica la realización de por lo menos dos radiografías en planos de ángulos rectos del lugar a tratar, con el fin de realizar el correcto diagnóstico y selección del más apto procedimiento quirúrgico. El objetivo del tratamiento es la ambulancia temprana y el completo retorno de la función del miembro afectado. Los principios que se siguen para el máximo retorno de la función normal son la reducción anatómica de los fragmentos óseos, lograr una fijación estable, conservación del flujo sanguíneo de los fragmentos y movilización activa temprana sin dolor muscular y de las articulaciones cercanas a la fractura (Piermattei D y col, 2007).

La reducción de una fractura se define como el proceso mediante el cual se reconstruyen los fragmentos óseos hasta que se consigue que recuperen su estructura anatómica normal. Los métodos de reducción son dos: reducción abierta y cerrada. En el método abierto los fragmentos óseos son reducidos bajo visión directa; es de elección en fracturas muy inestables, en las que tienen muchos días de haberse generado, y en fijación interna. La reducción cerrada tiene la misma finalidad que la anterior pero con la diferencia de que los cabos óseos se alinean sin exposición quirúrgica de los mismos (Piermattei D y col, 2007; Fossum y col., 2009). En el cuadro I se observan los tiempos normales promedios de unión ósea según edad, al haber utilizado la fijación esquelética externa (FEE) y/o clavo intramedular (IM).

El uso de la fijación esquelética externa para la reducción de fracturas se remonta a principios del siglo XX y su aplicación en Medicina Veterinaria se ha incrementado

(Cavero F y Fernández V, 2005). Dicho procedimiento requiere de la inserción transcutánea de entre 2 y 4 clavos en cada uno de los fragmentos óseos proximal y distal de la fractura (Piermattei D y col, 2007), cuando se trata de huesos largos. Una vez que los clavos están fijos en los fragmentos óseos, se conectan por medio de una o más barras externas (Piermattei D y col, 2007), pero también se puede conectar por medio de acrílico dental. El metil metacrilato (mmc) es una resina acrílica utilizada en moldes para fabricar prótesis dentales, pero puede cumplir la función de barra estabilizadora-conectora en la reducción de fracturas. El mmc tiene la característica de adaptar la barra a cualquier forma, permitiendo la colocación de clavos en planos múltiples (Cavero F y Fernández V, 2005).

Un complemento de la fijación esquelética externa es la utilización de injertos óseos. Éstos se incorporaron en la práctica quirúrgica general a principios del siglo XX, manteniéndose los principios de su uso por mucho tiempo. Se trata de hueso congelado, liofilizado e irradiado que es mantenido en bancos de hueso (Piermattei D y col, 2007).

Los injertos pueden tener tres orígenes:

- autoinjerto o hueso autólogo, es el único material de injerto que posee actividad osteo-conductiva, osteoinductiva y osteoproliferativa, por lo que representa el material de elección en cirugía reconstructiva de defectos óseos maxilares. Una vez colocado el autoinjerto, en la primera fase tiene lugar la osteogénesis; los osteoblastos sobrevivientes del implante proliferan y depositan una matriz osteoide inmadura, lo que se define como actividad osteoproliferativa. Semanas después de haber colocado el injerto óseo y por un período que puede durar hasta dos años, tiene lugar por medio de los osteoclastos, un lento proceso de reabsorción de la matriz osteoide depositada a partir de los osteoblastos. Conjuntamente se desarrolla la actividad osteoinductiva, mediante la estimulación de células multipotenciales de origen mesenquimático para transformarse en osteoblastos. Esta estimulación se lleva a cabo a través de proteínas de alto peso molecular, siendo las más estudiadas las proteínas morfogenéticas (BMP: Bone Morphogenetic Proteins). Estas sustancias son secretadas por los osteoclastos.

La segunda fase se completa mediante la estimulación de células ya programadas para ser transformadas en osteoblastos por parte de sustancias osteopromotoras, proceso que se conoce con el nombre de osteoconducción, el cual requiere de oxigenación del lecho vascular y absoluta inmovilización del injerto.

- aloinjerto o hueso homólogo, es un tejido óseo tomado de la misma especie del receptor. El mismo se obtiene de cadáveres, es tratado y conservado bajo varias formas y dimensiones, en bancos de hueso. Existen tres tipos: congelado, congelado-liofilizado, y congelado-desmineralizado-liofilizado.

- xenoinjerto o hueso heterólogo, por lo general de origen bovino, está conformado por cristales de carbonato de apatita, exento de calcio y privado de componentes orgánicos mediante un delicado proceso de extracción. La introducción del nuevo hueso en la estructura del injerto viene favorecida por la red porosa interna de los cristales, ofreciendo una amplia superficie para ser colonizada por parte del hueso, dando lugar a un nuevo tejido de densidad mayor con relación a otros biomateriales y al hueso autólogo. El remodelado de este tipo de hueso se presenta en tres fases: en la fase inicial, las partículas se integran al hueso circundante; posteriormente ocurre la reabsorción del xenoinjerto por actividad osteoclástica, y por último, tiene lugar la neoformación ósea, donde los osteoblastos sustituyen las partículas del material con hueso laminar denso (Semiglia y col. 2006; Dinatale E y Guercio E, 2007).

Entre las indicaciones de los injertos óseos, se incluyen: mejorar la circulación en las uniones retardadas, no uniones, osteotomías y artrodesis de articulaciones al estimular tempranamente el callo óseo; para formar una conexión más firme entre los defectos graves de fracturas multifragmentarias al establecer una continuidad de los segmentos óseos (Semiglia y col. 2006); para reemplazar segmentos corticales enteros que fueron perdidos en el momento de la fractura y por último para llenar el espacio debido a la extirpación de quistes y/o neoplasias (Fossum y col., 2009). Dichas características estimularon el estudio y uso de hueso xenogénico desantigenizado en nuestro país, obteniéndose buenos resultados en su aplicación sobre roedores y pequeños animales en Facultad de Veterinaria, UdelaR (Zunino y col, 2004; Semiglia y col, 2006).

Cuadro I. Tiempos promedio de unión ósea.

Edad del animal	Con FEE, clavo i/medular	Placa de FEE
< 3 meses	2 – 3 semanas	4 semanas
3 – 6 meses	4 -6 semanas	6 -12 semanas
6 -12 meses	5 -8 semanas	12 -16 semanas
1 año	7 -12 semanas	16 -30 semanas

FEE: fijación esquelética externa

(Piermattei D y col, 2007)

### Evaluación radiográfica post-quirúrgica

Luego de toda intervención quirúrgica para corregir una fractura, se debe hacer un seguimiento de la misma para corroborar la alineación ósea, el hueso, cartílago (en articulaciones), dispositivo ortopédico y tejidos blandos.

La alineación se refiere a la evaluación de dicho carácter en los fragmentos óseos, con el fin de detectar cualquier cambio en la misma; el cambio en la alineación ósea es más frecuente en la utilización de clavo intramedular como único método de fijación, debido a la inestabilidad que ésta confiere a la fractura. El hueso debe valorarse por su progresión de la cicatrización ósea y la formación de callo. Todos los fragmentos de la fractura deben estar implicados en la cicatrización, sino puede provocar secuestro óseo (hueso muerto). También deben evaluarse la arquitectura ósea y su opacidad para detectar cambios degenerativos por complicaciones, como la osteomielitis o la atrofia por desuso. Se suele observar con frecuencia reacciones periósticas excesivas en el foco de fractura o más allá. En otros casos, no hay callo óseo en los plazos considerados normales, o existe pero es demorado o puede formarse un callo en plazos normales pero ser anómalo.

Es fundamental evaluar el cartílago de los espacios articulares cercanos a la fractura. El desarrollo de efusión articular, una reacción perióstica anormal y una lisis de hueso subcondral pueden indicar artritis séptica.

La colocación y la posición de los dispositivos ortopédicos deben compararse siempre con el de las radiografías anteriores. En Facultad de Veterinaria se utiliza principalmente la fijación esquelética externa, en ciertos casos en conjunto con clavo intramedular. La retirada de los clavos que penetran la cortical deja defectos en el hueso, observándose radiolúcido (oscuro) inmediatamente a la extracción. Aun así,

a pesar de que estas zonas se rellenan con hueso, el hueso nuevo es menos opaco por lo que el defecto puede observarse radiográficamente durante meses o años. Luego del acto quirúrgico, se produce tumefacción normal de los tejidos blandos correspondientes al área de fractura, pero ésta se reduce de forma significativa entre los 7-10 días posteriores (Fossum y col., 2009; Piermattei D y col, 2007).

#### Complicaciones frecuentes de una fractura sin tratar y post tratamiento quirúrgico

- 1) Secuestro óseo: se trata de una pieza de hueso muerto que se ha separado del hueso normal durante el proceso de necrosis y está rodeado por un área de exudado infectado o no. Debido a que el mismo no sufrió resorción ósea ni está vascularizado, su densidad radiográfica es alta, presentándose una pieza ósea muy blanca con bordes filosos y dentados, que pueden dañar gravemente los tejidos blandos subyacentes. El tratamiento a seguir cuando se visualiza un secuestro óseo es la re intervención quirúrgica para extirparlo.
- 2) Unión retardada: es aquella fractura que no ha reparado en los plazos previstos para el caso particular. La causa más común de unión retardada es la fijación inadecuada o interrumpida de los segmentos de la fractura. Al examen radiográfico la línea de fractura permanece evidente, tiene un aspecto lanoso, y no hay esclerosis de los extremos óseos. Hay evidencia mínima de callo óseo. El tratamiento de fracturas con el mencionado defecto puede hacerse según dos principales aspectos: si la reducción es satisfactoria, la fijación rígida ininterrumpida se debe asegurar y mantener por un tiempo más prolongado. Si la fijación esquelética actual se considera adecuada, implica una cooperación mayor por parte del dueño del paciente para ejercer una disminución de la actividad del animal. Se debe evitar el uso de férulas o yesos en fracturas de huesos largos. Si el dispositivo de fijación se considera inadecuado o inestable, se debe aumentar la estabilidad o reemplazar el dispositivo. El otro aspecto es si la fractura tiene buen contacto entre los extremos óseos pero con mala alineación, el hueso se debe enderezar y se aplica fijación rígida ininterrumpida. Ésta situación es común de observar como secuela de reducciones cerradas. Por lo general, el enderezamiento se logra por medio de una presión manual cuidadosa pero con fuerza, o aplicando presión sobre un punto de apoyo, todo ello preferible antes que la corrección quirúrgica abierta, debido a que se ahorran muchas semanas de

tiempo de curación. La fijación esquelética externa también es de elección en ésta oportunidad.

- 3) No unión: hay dos tipos básicos de fracturas con no unión según el grado de producción de callo, hipertróficas y atróficas. En las hipertróficas el callo óseo es abundante y no se ha unido debido al movimiento en el lugar de fractura. A la observación radiológica, se detecta deposición abundante de tejido óseo que no es capaz de formar un puente sobre la brecha de la fractura. En las atróficas los extremos de los cabos de la fractura sufren resorción y disminución del tamaño a consecuencia, con o sin osteoporosis por inactividad y cese completo de la actividad osteogénica. Es el más grave de los dos defectos de no unión. El tratamiento en una no unión hipertrófica trata de la compresión en el lugar de fractura usando por ejemplo una placa de compresión, eficaz mientras la reducción actual de la fractura sea satisfactoria. Los fijadores externos también son buenos para su corrección. El callo debe ser alterado lo mínimo posible en todos los casos. En una no unión atrófica, se realiza una reducción abierta para permitir el repliegue del periostio más grueso y el retiro del tejido fibroso entre los cabos óseos. Se retira además el hueso esclerótico de los extremos hasta que se observe sangrado de periostio y endostio. Luego se pueden utilizar dispositivos de fijación interna, externa o combinación de ambos (por ejemplo: clavo intra medular más fijación esquelética externa), así como el uso de hueso xenogénico bovino (Piermattei D y col, 2007; Semiglia y col, 2006).
- 4) Osteomielitis: se define como inflamación e infección del tejido óseo, muchas veces afecta la cavidad medular y al periostio (Fossum y col, 2009). Las causas más comunes son contaminación bacteriana de fracturas abiertas, (principalmente por *Stafilococcus intermedius* y *S. aureus*) debido a mordeduras, procedimientos quirúrgicos prolongados con exposición amplia (reducción abierta), excesivo daño tisular por el traumatismo primario o durante la cirugía y contacto con objetos extraños como suturas, gasas y hasta implantes contaminados. Otros orígenes menos comunes son la extensión directa de una infección desde el tejido blando adyacente; también desde la sangre por procesos como osteomielitis vertebral, discoespondilitis por *Brucella spp* o *Staphilococcus spp*, y endocarditis bacteriana. El diagnóstico de osteomielitis suele realizarse por la sospecha clínica antes de que se manifieste por rayos X (los hallazgos radiológicos son más tardíos que los signos clínicos). Los signos clínicos de osteomielitis aguda son fiebre, calor local,

tumefacción de tejidos blandos y dolor (Thrall D, 2003; Piermattei D y col, 2007). La infección crónica se caracteriza por uno o varios trayectos fistulosos, atrofia muscular, fibrosis y contractura, claudicación variable y cambios radiológicos evidentes. Dichos cambios pueden ser resorción y afinamiento cortical, osteoporosis, formación de hueso perióstico nuevo que varía ampliamente en aspecto, formación de secuestros óseos, esclerosis y tumefacción de tejidos blandos adyacentes. Se define secuestro a una pieza de hueso muerto (avascular) que se ha separado del hueso normal durante la fractura o proceso de necrosis ósea, y se rodea de exudado infectado. El tratamiento convencional consta de antibióticos sistémicos (por lo menos 4 semanas) según la sensibilidad del agente presente en la patología, desbridamiento de la herida, retiro de secuestros óseos y evaluación del dispositivo de fijación esquelética actual (Piermattei D y col, 2007; Fossum y col, 2009).

### **Medicina Regenerativa**

Es un campo de investigación emergente conocido también como “Ingeniería de Tejidos”. El objetivo de esta disciplina es obtener tejidos vivos que puedan reemplazar estructuras perdidas y contribuir al retorno funcional. Consiste en estimular o suministrar tejido vivo funcional mediante la utilización o no de un soporte (natural, sintético o mezclas de ambos), para ello se construyen modelos equivalentes a órganos o tejidos en los que es necesario que las células se organicen y se comporten como si formaran parte del tejido original y conseguir así la reconstrucción final deseada (Yuan y col., 1998).

#### Clasificación de las células madre

Las células madre (CM) se pueden clasificar en dos grandes tipos; las CM embrionarias y las CM adultas. Dentro del tipo embrionario existen las CM totipotentes que dan origen a un individuo completo y las pluripotentes que dan origen a las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Las CM adultas son multipotentes, es decir que pueden diferenciarse a tipos celulares específicos de la capa germinal de la que provinieron, como por ejemplo las CM mesenquimales (CMM), que dan origen a osteocitos, condrocitos y adipocitos (De Schauwera y col, 2011).

Actualmente se conoce que las CMM están presentes en muchos tejidos durante toda la vida, sin embargo, su frecuencia y cantidad disminuye con la edad. Los tejidos que las albergan incluyen la sangre, el tejido adiposo, piel, hueso, hígado, pulmón (Undale A, y col., 2009), músculo (Rouger K. y col., 2011) e incluso células nerviosas (Jiang y col., 2002; Jung y col., 2009), pero los dos tejidos más usados para su obtención son médula ósea (CMM-MO) y tejido adiposo (CMM-TA), pero a diferencia de lo que sucede con CMM-MO, la grasa es de fácil acceso con técnicas mínimamente invasivas y representa una reserva abundante de CMM (Vieira y col., 2010; Zuk et al., 2001, 2002).

### Características y propiedades de las CMM

Las CMM poseen características prometedoras para ser utilizadas en medicina regenerativa ortopédica, las principales son: poder inmunomodulador, angiogénesis y poseer capacidad de diferenciarse en diversos linajes de origen mesodérmico, es decir ser multipotenciales (Arinzeh y col., 2003; Le Blanc y col., 2003). Dichas células se multiplican y diferencian en el tejido problema en caso de daño tisular (Zuk et al., 2001, 2002).

La multipotencialidad indica que las CMM pueden diferenciarse a células del linaje mesenquimal, por ejemplo a adipocitos, condrocitos y osteocitos (Jung y col., 2009; Riaño y Vera, 2014; Vieira y col., 2010), pero también pueden hacerlo a células que no pertenecen a ese linaje, como el neural y muscular (Jiang y col., 2002; Jung y col., 2009; Rouger K. y col., 2011). La propiedad inmunomoduladora evita el rechazo de implantes alogénicos (actividad inmunosupresora) debido a la secreción de citocinas específicas (Riaño y Vera, 2014). Se ha estudiado además el efecto de las CMM sobre la inflamación debida a sepsis en ratones como modelo para su estudio, resultando en disminución de la mortalidad y de la carga bacteriana en los casos tratados con CMM (Mei y col., 2010). Esta respuesta por parte de dichas células es especialmente importante en el caso de osteomielitis, ya que consta de infección e inflamación. El caso específico de daño de tejido óseo, gracias a la presencia de factores inflamatorios, las CMM migran al sitio de la injuria y van a contribuir con los procesos regenerativos por efectos paracrinos que promueven un microambiente celular favorable para recomponer la matriz ósea (Yamaguchi y col., 2000).

Se ha demostrado la capacidad angiogénica de las CMM en infarto de miocardio en ratas y en ratones con lesiones de piel, al estimular la formación de los capilares

sanguíneos y liberar factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor) entre otros factores; el VEGF juega un rol importante al estimular la proliferación, migración y organización de las células endoteliales (Imanishi y col., 2008; Wu y col., 2007). Sin embargo, sobre lesiones óseas son escasos los estudios de cómo puede afectar esta característica angiogénica sobre el proceso de reparación ósea, pero puede decirse que también se manifiesta la angiogénesis ya que la reparación ósea está ligada a buena vascularización.

Para identificar como tales a las CMM, la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) dictó recomendaciones, en donde debe constatarse la presencia de marcadores de superficie pertenecientes a células estromales mesenquimales y la tridiferenciación *in vitro* en los linajes: adiposo, cartilaginoso y óseo (Bourin 2013; Dominici 2006). Además las células deben poder ser aisladas y expandidas en medio de cultivo, ser adherentes al plástico, expresar ciertos antígenos de superficie (CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45 negativo, CD73, CD90, CD105 y CD117 en caninos). Las CMM deben tener la capacidad de autorrenovarse para mantener así su población con el fin de dejar disponible un stock de las mismas para ser utilizadas por el organismo, es decir una división asimétrica, renovación del pool de CMM o ser inducidas a comprometerse con un linaje adulto (Martinello y col., 2011; Vieira y col., 2010).

#### Aislamiento, cultivo y expansión de CMM

Para almacenar las células un largo periodo de tiempo, se utiliza criopreservación en nitrógeno líquido (-196°C) (Gonda y col., 2008). Las CMM provenientes de humanos y caninos luego de ser almacenadas por un largo período conservan sus características fenotípicas y el estado indiferenciado *in vitro* (Gonda y col., 2008; Liu y col., 2008; Martinello y col., 2011), por lo que es posible tener un banco de CMM indiferenciadas almacenadas indefinidamente, sin perder su multipotencialidad; esta característica se demostró en las CMM de origen animal (Dressler y col., 2005; Martinello y col., 2011; Yaneselli y col., 2011) y humano (Gonda y col., 2008; Liu y col., 2008; Yin y col., 2009).

Según un estudio realizado recientemente por Devitt y col (2015), las CMM-TA humanas que fueron descongeladas luego de 1 - 2 años criopreservadas en nitrógeno líquido, desarrollaron crecimiento normal en los respectivos cultivos, manteniendo las propiedades mencionadas anteriormente. Esto impulsa al uso de

un banco de CMM debido a su practicidad, por la rapidez en la instalación de la terapia y disminución de los intervalos del tratamiento, sin perder las propiedades que las hacen tan atractivas.

### Aplicación de CMM

Debido a las características de las CMM, multipotencialidad, fácil extracción del animal adulto y aislamiento, expansión y diferenciación en múltiples linajes de tejidos *in vitro*, las convierten en una opción prometedora para ser utilizadas como una alternativa a las terapias tradicionales en medicina regenerativa tanto en medicina humana como veterinaria (Jung y col., 2009; Mimeault y Batra, 2008; Pacini y col., 2007; Strauer y col., 2009). Existen varios trabajos de aplicación de CMM en humanos, como por ejemplo la expansión *in vitro* y aplicación de CMM en injurias tendinosas (Shenaq y col., 2010; Maumus y col., 2013), el tratamiento de fractura tibial con CMM-TA en conjunto con fijación esquelética interna (Fang y col., 2013), con resultados alentadores en todos ellos. Los reportes del uso de CMM en osteomielitis es escaso, pero sí existen trabajos varios de su uso en osteonecrosis. Una mujer de 71 años con osteonecrosis mandibular fue tratada, luego de múltiples intervenciones sin éxito, con CMM-MO autólogas en el lugar de lesión, y 6 meses después fue comprobada una satisfactoria regeneración ósea mediante tomografía computada (González y col, 2013). En otro estudio, realizado por Zhanghua y col. (2013), se utilizaron conejos con necrosis de cabeza femoral divididos en grupos control sin tratar y otros tratados con CMM-MO alogénicas vía intravenosa; obteniéndose finalmente en el grupo tratado una buena recuperación.

En cuanto a medicina veterinaria se han realizado investigaciones sobre los caninos y otros animales como modelos para aplicación de CMM en humanos con lesiones periodontales y maxilares (Pourebrahim y col, 2012; De Bakker y col., 2013; Requichia y col., 2014); en la reconstrucción facial (Liu y col., 2014); en osteoartritis y enfermedades musculoesqueléticas (Bashir y col., 2014; Chevrier y col., 2009; Zhanghua y col., 2013). En cuanto al estudio de dichos tratamientos en patologías caninas específicamente, se han aplicado CMM en osteoartritis de codo y de otras articulaciones (Black y col., 2008; Guercio y col., 2012; Vilar y col., 2013); en displasia de cadera (Marx y col., 2014) y en la distrofia muscular en perros (Rouger y col., 2011). Diversos autores han demostrado efectos terapéuticos beneficiosos en daño tisular en animales, con trasplantes de CMM autólogas (Carrade y col., 2010;

Jung y col., 2009), como también en los aloinjertos con CMM (Jung y col., 2009), lo que demuestra su gran potencial terapéutico.

Existen estudios sobre CMM de origen animal en el Uruguay, los cuales describen el comportamiento *in vitro* de CMM derivadas de TA como de MO, provenientes de las especies canina y equina (Semiglia y col., 2014; Yaneselli y col., 2011; Yaneselli y col., 2012). Además existen reportes de su aplicación terapéutica en caninos según Semiglia y col. (2014), donde usaron CMM-MO autólogas sobre una no-uni6n de f6mur de un canino, y otra terapia celular descrita por Yaneselli y col. (2013) utilizando CMM-TA alogénicas sobre una no-uni6n de radio y c6bito en un canino, con resultados muy alentadores en ambos casos.

### **Hip6tesis**

La hip6tesis de este trabajo es que la aplicaci6n de CMM-TA alogénicas en el sitio de lesi6n 6sea puede generar un microambiente propicio para la regeneraci6n 6sea, debido al efecto angiogénico, inmunomodulador antimicrobiano y osteoprogenitor de las CMM.

### **Objetivo**

El objetivo de este trabajo fue evaluar el tratamiento con CMM-TA alogénicas en dos casos clínicos caninos con defectos 6seos graves.

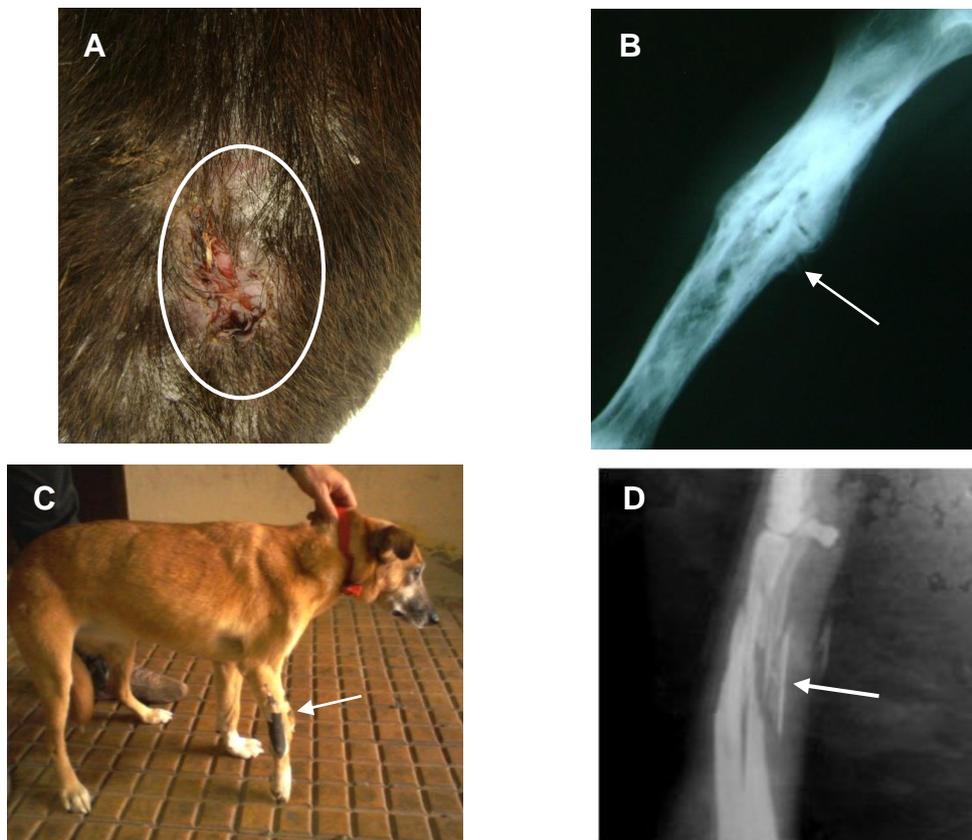
### **Materiales y métodos**

Se presentaron en el Hospital de Facultad de Veterinaria, Universidad de la Rep6blica, Montevideo:

Paciente 1: un canino macho, raza cruza, de 5 a6os. En Junio de 2012 se fractur6 la tibia y mediante cirugía se implant6 hueso xenogénico en el canal medular con fijaci6n esquelética externa. Se le indic6 Clindamicina (a dosis 5mg/kg oral) durante un mes. El canino se recuper6 posteriormente a la intervenci6n quir6rgica, pero en Enero de 2013, posterior a la finalizaci6n antibioticoterapia aparecieron fístulas en la

cara interna del miembro posterior izquierdo (MPI) (figura 1-A), resultado de la aparición de osteomielitis en el foco de la antigua fractura; sin embargo el paciente nunca claudicó debido a dichas fístulas. Clínicamente y en los controles radiológicos (figura 1-B) no se evidenció mejoría con el tratamiento convencional.

Paciente 2: se trata de un canino hembra, cruce, de 7 años, que vino a consulta por una fractura expuesta del antebrazo derecho (MAD), ocasionada por la mordida de otro de los perros de la dueña hacia cinco días (figura 1-C y 1-D). La misma se acondicionó (tricotomía, limpieza con desinfectantes en la zona y vendajes) para realizarle la cirugía y el implante de CMM el mismo día de la cirugía, además de recetarle un tratamiento previo con antibióticos (Cefalexina, dosis 30mg/kg vía oral).



**Figura 1:** **A.** caso con múltiples fístulas en cara interna de MPI. Se puede observar la aglomeración de los pelos debido a la excreción de pus (indicado con círculo). **B.** es la radiografía latero-lateral realizada en el día de consulta por las fístulas, observándose una región con reacción perióstica con pérdida de la definición de la corteza (flecha). **C.** caso de fractura de MAD, con el dispositivo de fijación esquelética externa (flecha). **D.** radiografía de radio-cúbito del primer día de consulta

por la fractura. Se trata de una fractura conminuta de ambos huesos, detectándose una esquirla ósea (flecha).

#### Terapia celular con CMM-TA alogénicas

El protocolo de expansión celular y aplicación de CMM fue adaptado de lo descrito por Yaneselli y col. (2013).

#### Fuente de CMM-TA

Las células caninas fueron obtenidas del banco de CMM de origen animal perteneciente al Área Inmunología, Facultad de Veterinaria, UdelaR, las cuales habían sido previamente caracterizadas mediante la inmunofenotipificación y la tridiferenciación *in vitro* en el trabajo de Yaneselli (2015). El protocolo de extracción de TA fue previamente autorizado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, UdelaR (CHEAFVET-PI-13/2012).

#### Expansión de CMM-TA alogénicas:

Las CMM fueron descongeladas rutinariamente mediante calor de fricción con las manos, después su resuspensión en medio esencial mínimo (MEM), centrifugación, descarte del sobrenadante y resuspensión del pellet de células con MEM, 10% suero fetal bovino y 2% antibiótico (penicilina-estreptomicina), para luego sembrarlas en botella de cultivo T25 y posteriormente expandirlas en botellas T75. Se controla su crecimiento a partir de las 24 hs, todos los días.

#### Procesamiento de CMM-TA alogénicas para ser implantadas:

Cuando las botellas de cultivo T75 llegan a un 80-90% de confluencia celular, se levantan con tripsina y se realiza un recuento de las mismas. Se resuspendieron las células en solución fisiológica estéril. Su implantación se hizo en un lapso no mayor de 1 hora tras su procesamiento.

### Protocolo quirúrgico de implante con CMM-TA alogénicas:

Protocolo autorizado previamente por la CHEA (111130-001527-14). Con el paciente N° 1 se procedió a realizar una sedación con acepromacina 1% (0,01 mg/kg), posteriormente se depiló y desinfectó con iodofón. La forma de aplicación de las CMM-TA fue percutánea en el área de lesión, aplicándose en total 4 implantes de  $6-9 \times 10^6$  CMM-TA en pases 4-5, resuspendidas en suero fisiológico estéril. Los implantes se realizaron cada 2 semanas.

En el paciente N°2, como premedicación se administró acepromacina 1% (0,01 mg/kg), midazolam 0,5% (0,25 mg/kg) y ketamina 5% (5 mg/kg), administrándolos en forma I/V; como analgesia se utilizó tramadol (2 mg/kg).

Se usó además de las drogas anteriores, propofol 4 mg/kg e isoflurano al 3% como anestésicos profundos por tratarse de una cirugía, y se aplicó en forma profiláctica penicilina-estreptomicina (30000 UI/kg, subcutáneo). Se rasuró el miembro afectado, en toda su extensión, luego se realizó la embrocación utilizando alcohol etílico al 70% y colocación de campos quirúrgicos aislando así la zona de la fractura. El primer implante se realizó mediante la aplicación de CMM-TA sobre hueso desantigenizado bovino, resuspendidas en suero fisiológico estéril, colocado en el momento de la reducción abierta. El 2º implante se realizó a las 17 semanas y el tercero a las 19 semanas de la cirugía, en forma percutánea previa desinfección con alcohol etílico 70%. En total consistieron en 3 implantes de entre  $2-5 \times 10^6$  CMM-TA en pase 2-6.

### Evaluación post-implante de CMM-TA

En ambos casos se evaluó y documentó el progreso clínico post-tratamiento con CMM-TA y el progreso de restauración ósea mediante radiografías. En el caso N°1 se realizó 1 radiografía el día de consulta, la segunda a las 7 semanas y la tercera al año del último implante. En el caso N°2 se realizaron 7 radiografías, separadas 2 semanas y la última a los 6 meses del último implante.

El examen clínico se realizó según el score de claudicaciones de Maitre y col. (2008), basado en el análisis de la marcha, se clasifica el grado de claudicación en severa (sin apoyo tanto en la marcha como en la estación), media (apoyo durante la estación, cojera durante la marcha) y ligera (buen apoyo en la estación pero aun claudica durante una marcha rápida).

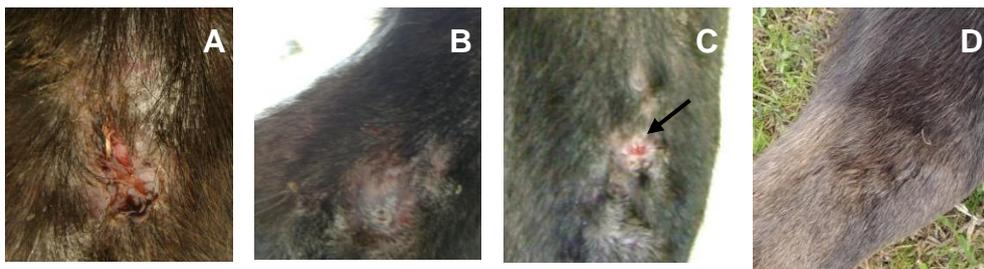
## Resultados

Las CMM-TA utilizadas presentaron morfología fibroblástica luego de ser descongeladas y expandidas *in vitro*.

En el paciente N°1 a las 2 semanas de la primera aplicación de CMM-TA se observó una disminución de las fístulas y de su secreción (fig. 3-B) en comparación al día de consulta; a las 4 semanas quedó solo una fístula (fig. 3-C), produciéndose el cierre completo a las 8 semanas (fig. 3-D). A nivel del hueso, se comienza a apreciar disminución de los procesos osteolíticos a las 7 semanas de comenzado el tratamiento (fig. 3-F) y a las 48 semanas (1 año después) los signos de daño óseo desaparecieron, observándose bordes óseos lisos (fig. 3-G).

El paciente N° 2, a las 5 semanas post primer implante de CMM-TA comienza apoyo del MAD, a las 12 semanas el canino comienza a apoyar manifestando una claudicación moderada-ligera, apoyando durante la estación; a las 16 semanas es ligera y a las 20 semanas (6 meses) post 1° implante hubo un retorno completo a la funcionalidad del miembro afectado. En cuanto al aspecto óseo, a las 2 semanas del primer implante se comienza a observar procesos osteogénicos en la radiografía, pero la esquirla ósea observada desde el principio sigue sin unirse (fig. 4-E). En la semana 11 post primera administración de las CMM-TA se verifica unión ósea retardada (fig. 4-F), y a las 24 semanas desde el comienzo de la terapia se observa unión completa de todos los cabos de fractura, incluida la esquirla ósea, detectándose buen callo y bordes óseos lisos (fig. 4-H).

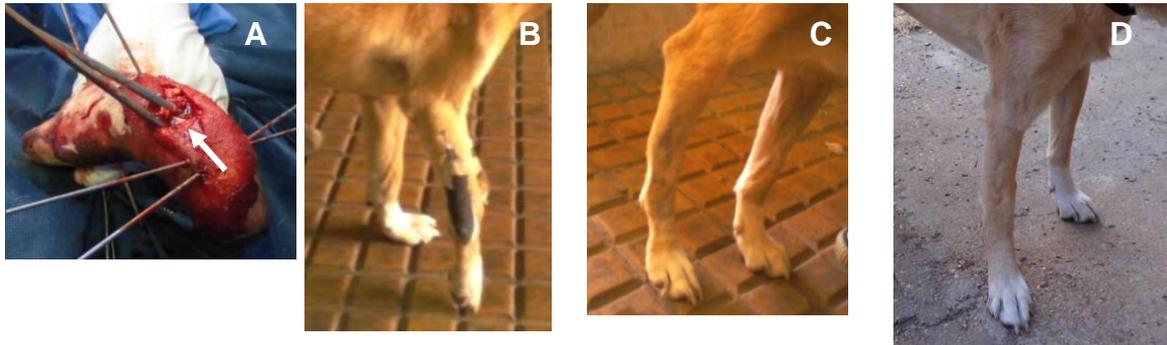
Posteriormente al comienzo del tratamiento regenerativo, no se observaron signos inflamatorios asociados a la implantación de CMM-TA, indicativos de rechazo, en ninguno de los casos.

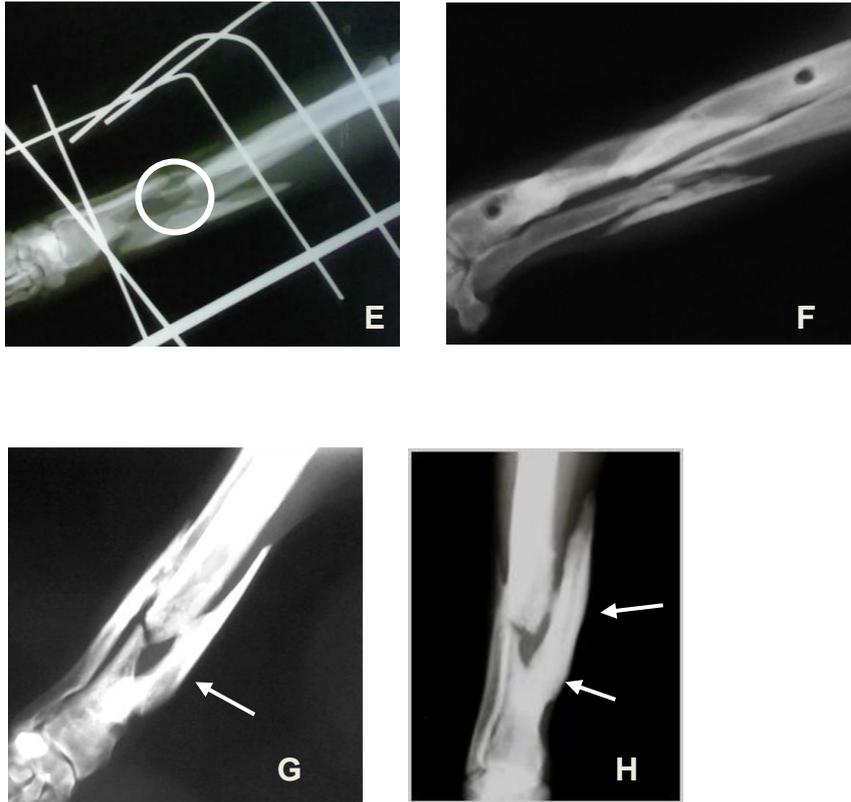




**Figura 3: Evolución del caso N°1, osteomielitis de tibia.**

**A.** Día 0 (antes de implantar la terapia), se observan varias fístulas (flechas) en la cara interna de MPI. **B.** 2 semanas post implante, se produce el cierre de la mayoría de las fístulas. **C.** 4 semanas, se visualiza crecimiento de pelo y presencia de 1 fístula (flecha). **D.** 8 semanas, las fístulas desaparecieron y el pelo volvió a cubrir la piel. **E.** Día 0, radiografía latero-lateral; reacción perióstica agresiva típica de osteomielitis (círculo). **F.** 7 semanas, la reacción perióstica se hace menos activa (círculo). **G.** 48 semanas, bordes lisos, periostio no reaccionante (flechas).





**Figura 4: Evolución del caso N° 2, fractura de radio-cúbito.**

**A.** cirugía de MAD; con implante de hueso xenogénico desantigenizado con CMM-TA en el lugar de fractura (flecha), con adición de fijación esquelética externa. **B.** 5 semanas post 1° implante **C.** 12 semanas. **D.** 20 semanas. **E.** 2 semanas post implante, se observan posición de los clavos y proceso osteogénico en el lugar del implante de hueso con CMM-TA (círculo). **F.** 5 semanas; la esquirola ósea sigue sin unirse pero radio y cubito comenzaron a unirse. **G.** 12 semanas, radio y cubito más unidos, se detecta proceso de unión de la esquirola al radio (flecha). **H.** 24 semanas, hay una mejora en la unión ósea de los cabos de fractura, incluida la esquirola ósea (flechas indicando unión de la esquirola).

## Discusión

En ambos casos clínicos del presente trabajo, la regeneración ósea fue satisfactoria. En el paciente N°1 los defectos óseos de osteomielitis desaparecieron a las 7 semanas de la primera aplicación de CMM-TA; al compararlo con el estudio en conejos realizado por Zhanghua y col. (2013) se observa un tiempo de mejora casi igual, en este último trabajo se vieron buenos resultados a las 6 semanas post-implante de CMM. Las diferencias en los tiempos puede deberse a que Zhanghua y col. (2013) utilizó CMM-MO en vez de TA, y utilizó para inocular las células la vía endovenosa; sin embargo hay que tener en cuenta que se trata de dos especies diferentes. Por otro lado, según un caso humano estudiado por González y col. (2013) la recuperación ósea monitoreada mediante tomografía fue más lenta, 6 meses, utilizando CMM-MO. La discrepancia en los tiempos de recuperación puede deberse a que se trata de dos especies diferentes; también a la edad de los pacientes en los que se utilizó CMM, ya que en el caso de González se implantó el tratamiento en una paciente longeva (71 años de edad) donde la rapidez para regenerar hueso es mucho más lenta. En el caso N° 1 del presente trabajo se aplicó la terapia en un canino de 5 años, tratándose de un adulto joven en donde la remodelación ósea es más rápida.

En el paciente N°2 se produjo la unión ósea efectiva (todos los cabos unidos) a las 24 semanas. Según el trabajo de Shuan-Hu y col. (2013), que trata de fracturas tibiales inducidas en ratas y tratadas mediante reducción cerrada con clavo intramedular asociado a la implantación de  $1 \times 10^6$  CMM-MO por única vez directamente sobre la fractura; el callo óseo se produjo a las 4 semanas, mientras que en nuestro caso de estudio se evidenció a las 4 semanas y 5 días. Se trata de fracturas diferentes, porque en las ratas la lesión fue provocada asépticamente en tibia y de forma que se produjera una sola línea de fractura, mientras que en el caso N°2 la fractura fue por mordedura y produjo fractura en varios fragmentos óseos, aun así en ambas especies se produjo un callo óseo en tiempos casi iguales.

Otro elemento utilizado en el 2° caso fue el hueso desantigenizado bovino, en el cual pudo observarse unión del implante con el resto del hueso a las 2 semanas. En los casos de fractura en caninos, tratados con hueso desantigenizado bovino por Semiglia y col. (2006), se observaron signos radiológicos de unión del hueso con el

implante a las 16 semanas; la diferencia en los tiempos probablemente radica en que en el caso de estudio se utilizó un implante óseo asociado a CMM-TA, las cuales, liberan factores osteoprotectores, angiogénicos y antimicrobianos y en el caso de Semiglia y col. (2006) se aplicó únicamente injerto de hueso desantigenizado como promotor de la regeneración ósea. Lee y col. (2009) expuso un caso de un canino de 4 años, raza cruzada, el cual presentó fractura de radio-cúbito con no-uni6n; se cultivaron CMM-TA aut6logas y se aplicaron  $3,2 \times 10^7$  CMM sobre andamio de hidroxiapatita y fibra de quitosano, el cual se coloc6 en el sitio de fractura previa eliminaci6n de los bordes necr6ticos de los huesos involucrados; 7 semanas despu6s de la cirugía se observ6 mediante radiografía un buen callo 6seo en el puente de la fractura. En el caso N°2 del presente trabajo se obtuvo un callo 6seo a las 5 semanas, en el cual se usaron CMM-TA alogénicas en menor cantidad ( $2-5 \times 10^6$  CMM-TA), aunque fueron 3 implantes. Lo que se pudo ver en estos trabajos es que el uso de andamios, naturales o sint6ticos, como complemento para la terapia con CMM no produjeron efectos adversos en el paciente y no alteraron las propiedades de las mismas.

Aunque se obtuvieron resultados exitosos en ambos casos clínicos, es necesaria la realizaci6n de estudios comparativos de aplicaci6n de CMM en pacientes con las mismas característicasy enfermedades presentados en el trabajo actual, y la realizaci6n de estadísticas que muestren los resultados en la terapia tradicional para poder afirmar una real diferencia de resultados entre aplicaci6n de CMM y tratamiento tradicional.

No existi6 evidencia de rechazo a los implantes de CMM-TA alogénicas, es decir que no hubo respuesta inflamatoria local o sistémica en los pacientes tratados, durante 12 meses de seguimiento post-tratamiento en el caso N°1 y 6 meses post-tratamiento en el paciente N°2; estos resultados concuerdan con los obtenidos en varios tratamientos con CMM tanto en caninos como en otras especies (Jung y col., 2009; Lee y col., 2009; Shuan-Hu y col., 2013; Zhanghua y col., 2013).

Para los casos del presente estudio fueron utilizadas CMM-TA alogénicas provenientes del Banco de Células Madre de Facultad de Veterinaria, Uruguay. Existen antecedentes nacionales como los trabajos de Yaneselli y col. (2013) y Semiglia y col. (2014), con resultado prometedores en medicina ortopédica en

caninos. La ventaja que existe sobre el uso de CMM autólogas, es la mayor velocidad en instaurar la terapia celular, resultando en una recuperación más rápida del paciente. Está demostrado por varios autores la conservación de las propiedades morfológicas y fisiológicas de estas células (Renzi y col. 2012; Devitt y col., 2015), además de que es seguro su uso al no existir rechazo en el organismo en el que se implantan las células (Martinello y col., 2011).

## **Conclusiones**

Los tratamientos de terapia celular aplicados a los dos casos promovieron su osificación y no presentaron recidivas posteriores a 6 meses y un año de seguimiento post tratamiento. Nuestros resultados indican que las CMM potencialmente podrían colaborar con el proceso fisiológico de la reparación ósea por sus propiedades terapéuticas y sin producir efectos adversos. La aplicación de CMM alogénicas es segura como terapia regenerativa en caninos, pero es necesario realizar mayor cantidad de ensayos y compararlos con controles de tratamientos tradicionales para demostrar objetivamente el efecto beneficioso de las CMM.

## **Referencias Bibliográficas**

1. Arévalo J, Páez D, Rodríguez V (2007). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. NOVA 5(8):177-184.
2. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault, MP, 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. J Bone Joint Surg (American) 85:1927-1935.
3. Barry FP, Murphy JM (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 36:568–584.
4. Bashir J, Sherman A, Lee H, Kaplan L, Hare JM (2014). Mesenchymal stem cell therapies in the treatment of musculoskeletal diseases. PM & R; 6(1):61-9.
5. Behrens F (1988). General theory and principles of external fixation. Clin Orthop Relat Res; 241: 15-23.
6. Black LL, Gaynor J, Adams C, Dhupa S, Sams AE, Taylor R, Harman S, Gingerich DA, Harman R (2008). Effect of intraarticular injection of autologous

- adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Vet Ther*; 9(3):192-200.
7. Bostrom M, Lane J, Tomin E (1996). Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop Relat Res*, 327: 272–282.
  8. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*; 15(6):641-8.
  9. Brady R, Leid J, Costerton J, Shirliff M (2006). Osteomyelitis: Clinical Overview and Mechanisms of Infection Persistence. *Clin Microbiol Newsletter* 28:65-72.
  10. Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL (2010). Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy*, 13:419-430.
  11. Carek PJ, Dickerson LM, Sack JL (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician*, 63:2413-2420.
  12. Cavero F, Fernández V (2005). Utilización del acrílico dental (metil metacrilato) como barra estabilizadora-conectora para reducciones cerradas en fracturas de tibia/peroné o radio/cúbito en caninos. *Rev Inv Vet Perú*, 16:17-23.
  13. De Bakker E, Van Ryssen B, De Schauwer C, Meyer E (2013). Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. *Vet Q.*; 33(4):225-33.
  14. De Mattos Carvalho A, Alves AL, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, de Oliveira PG, Deffune E. (2009). Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol*, 132:303-306.
  15. Devitt S, Carter C, Dierov R, Weiss S, Gersch R, Percec I (2015). Successful isolation of viable adipose-derived stem cells from human adipose tissue subject to long-term cryopreservation: positive implications for adult stem cell-based therapeutics in patients of advanced age. *Stem Cells International*, ID 146421, 11 p.
  16. De Schauwera C, Meyerb E, Van de Wallec G, Van Soom A (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 75:1431–1443.
  17. Dinatale E y Guercio E. (2007). Regeneración ósea guiada (GRB). *Acta Odont Venezolana*, 46(4):1-10.
  18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.
  19. Dressler MR, Butler DL, Boivin GP. (2005). Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *J Orthop Res* 23:287-293.
  20. Fang G, Liu X, Lv T, H Shu, Shao H (2013). A new choice for the treatment of segmental tibial bone defects: Intramedullary nail internal fixation combined adipose-derived stem cells technique. *Med Hypoth*; 80: 422–424.

21. Fernández-Tresguerres I, Alobera M, Pingarrón M, Blanco L (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea. *Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 11:E47-51.
22. Fossum, T, Hedlund, C, Jhonson, A, Schulz, K, Seim, H, Willard, R, Bahr, A, Carroll, G (2009). *Cirugía en pequeños animales*. 3ª ed. Barcelona, Elsevier, 1610 p.
23. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Sato K, Murase S, Koshima I, Yoshimura K (2008). Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* 121:401-410.
24. González-García M, Rodríguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodríguez-González MA, Oñate-Sánchez R, Blanquer M, Moraleda JM (2014). Cell therapy in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg.*; 24(3):226-8.
25. Guercio A, Di Marco P, Casella S, Cannella V, Russotto L, Purpari G, Di Bella S, Piccione G (2012). Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int.*; 36(2):189-94.
26. Hallén LG. (1965). Heterologous transplantation with Kiel Bone: An experimental and clinical study. *Acta Orthop*, 37(1): 1-19.
27. Hancox NH, Owen R y Singleton A (1961). Cross-species grafts of deproteinised bone. *J Bone Joint Surg.*, 43 B (1): 152-161.
28. Imanishi Y, Saito A, Komoda H, Sakakida S, Miyagawa S, Kondoh H, Ichikawa H, Sawa Y (2008). Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardio* 44: 662–671.
29. Jack GS, Almeida FG, Zhang R, Alfonso ZC, Zuk PA, Rodriguez L.V. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: Implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol*. 2005; 174:2041-5.
30. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418:41-49.
31. Johnson A, Kneller S, Weigel R (1989). Radial and tibial fracture repair with external skeletal fixation: effects of fracture type, reduction, and complications on healing. *Vet Surg*, 18(5): 367–372.
32. Jung DI, Ha J, Kang BT, Kim JW, Quan FS, Lee JH, Woo EJ, Park HM. (2009). A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J Neurol Sci* 285:67-77.
33. Katsuda T, Oki K, Ochiya T (2015). Potential application of axtracellular vesicles of human adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells in Alzheimer's disease therapeutics. *Methods Mol Biol* 1212:171-181.
34. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31:890-896.
35. Lee H, Chung Y, Heo S, Kim N (2009). Augmentation of bone healing of nonunion fracture using stem cell based tissue engineering in a dog: a case report. *Veterinari Med*; 54(4): 198–203.

36. Liu G, Shu C, Cui L, Liu W, Cao Y. (2008). Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cryobiology* 56:209-215.
37. Liu N, Lyu X, Fan H, Shi J, Hu J, Luo E (2014). Animal models for craniofacial reconstruction by stem/stromal cells. *Curr Stem Cell Res Ther*; 9(3):174-86.
38. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F, Decaminada M, Patrino M. (2011). Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci* 91:18-24.
39. Maitre P, Lequang T, Fau D, Genevois JP, Viguier E. (2008). Hip dysplasia in dog: correlation between clinical lameness score, radiographic findings and walkway gait analysis. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 11: 153-154.
40. Maumus M, Manferdini C, Toupet K, Peyrafitte JA, Ferreira R, Facchini A, Gabusi E, Bourin P, Jorgensen C, Lisignoli G, Noël D (2013). Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res.*; 11(2):834-44.
41. Marx C, Silveira MD, Selbach I, da Silva AS, Braga LM, Camassola M, Nardi NB (2014). Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. *Stem Cells Int.*; 2014:391274.
42. Mei S, Haitsma J, Dos Santos C, Deng Y, Lai P, Slutsky A, Liles W, Stewart D (2010). Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*; 182: 1047–1057.
43. Mimeault M, Batra SK (2008). Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev* 4:27-49.
44. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimbert, S, Dini F, Carlucci F, Petrini M (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.*, 13:2949-2955.
45. Piermattei D, Flo G, DeCamp C (2007). *Ortopedia y reparación de fracturas en pequeños animales*. 4° ed. Buenos Aires, Intermédica, 835 p.
46. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak (1999). DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
47. Pourebrahim N, Hashemibeni B, Shahnaseri S, Torabinia N, Mousavi B, Adibi S, Heidari F, Alavi MJ (2012). A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.*; 42(5):562-8.
48. Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S (2012). Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. *Vet Res Commun.*; 36(2):139-48.
49. Renzi S, Lombardo T, Dotti S, Dessi S, De Blasio P, Ferrari M (2012). Mesenchymal Stromal Cell Cryopreservation. *Biopreserv Biobank*; 10(3): 276-281.
50. Requichia JF, Viegas CA, Muñoz F, Azevedo JM, Leonor IB, Reis RL, Gomes ME (2014). A tissue engineering approach for periodontal regeneration based on a biodegradable double-layer scaffold and adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.*; 20(17-18):2483-92.

51. Riaño N, Vera V (2014). Aislamiento, caracterización y potencial de diferenciación de células madre mesenquimales caninas, derivadas de tejido adiposo. *Revista FMVZ (Colombia)*; 61 (2):115-133.
52. Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps J, Guiner C, Jouvion G, Delorme B, Lieubeau B, Carlus M, Fornasari B, Theret M, Orlando P, Ledevin M, Zuber C, Leroux I, Deleau S, Guigand L, Testault I, Le Rumeur E, Fiszman M, Chérel Y (2011). Systemic Delivery of Allogenic Muscle Stem Cells Induces Long-Term Muscle Repair and Clinical Efficacy in Duchenne Muscular Dystrophy Dogs. *Am J Pathol*; 179(5): 2501-2518.
53. Semiglia G, Izquierdo D, Zunino JH (2006). Reparación quirúrgica de defectos esqueléticos en pequeños animales mediante implantes óseos xenogénicos desantigenizados: resultados preliminares. *Veterinaria (Montevideo)*; 41:161-162.
54. Semiglia G, Yaneselli K, Mirazo J, Filomeno A, Benech A, Benavides U, Maisonnave J (2011). Terapia Regenerativa: Comportamiento celular in vitro de células madre mesenquimales de origen animal. 7º Jornadas Técnicas Veterinarias, Montevideo, Uruguay, p. 62 - 63.
55. Semiglia, G; Filomeno, A; Yaneselli, K; Diaz, H; Zunino, J; Benavides, U; Maisonnave, J (2014) Primera aplicación terapéutica de células estromales mesenquimales en un canino con noción ósea femoral, en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*; 50 (193-196):156-164.
56. Schulz K (2009). Fundamento de la cirugía ortopédica y manejo de las fracturas. En: Fossum, T., Hedlund, C., Johnson, A., Schulz, K., Seim, H., Willard, R., Bahr, A., Carroll, G. *Cirugía en pequeños animales*. 3a. ed. Barcelona, Elsevier; pp. 1333-1356.
57. Shenaq D, Rastegar F, Petkovic D, Zhang B, He B, Chen L, Zuo G, Luo Q, Shi Q, Wagner E, Huang E, Gao Y, Gao J, Kim S, Yang K, Bi Y, Su Y, Zhu G, Luo J, Luo X, Qin J, Reid R, Luu H, Haydon R, He T (2010). Mesenchymal Progenitor Cells and Their Orthopedic Applications: Forging a Path towards Clinical Trials. *Stem Cells International*; ID 519028: 14 p.
58. Shuan-Hu L, Li G, Hai-Yuan Y, Da-Cheng Z, Cheng-Jun Z, Wen-Jia D, Liang-Zeng H, Jing W, Yue-Xiu D, Jing-Sheng L, Jun-Long H, Yu-Liang W (2013). Marrow Stromal Stem Cell Autologous Transplantation in Denervated Fracture Healing: an Experimental Study in Rats. *Orthop Surg*; 5(4): 280-288.
59. Slatter D, (2006). *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales*. 3ª ed. Bs As. Inter-Médica; 4 v.
60. Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M (2009). Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Minerva Cardioangiol.*; 57:249-267.
61. Thrall D (2003). *Manual de Diagnóstico radiológico Veterinario*. 4ª ed. Madrid, Elsevier.; 758 p.
62. Undale A, MBBS, PhD; Westendorf J, PhD; Yaszemski M, MD, PhD; Khosla S, MD (2009). Mesenchymal Stem Cells for Bone Repair and metabolic Bone Diseases. *Mayo Clin Proc.*; 84(10):893-902.
63. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M (2010). Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.*; 19:279-289.
64. Vilar JM, Morales M, Santana A, Spinella G, Rubio M, Cuervo B, Cugat R, Carrillo JM (2013). Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Vet Res.*; 9:131.

65. Wu Y, Chen L, Scott P, Tredget E (2007). Mesenchymal Stem Cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*; 25:2648–2659.
66. Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*; 21:393-411.
67. Yaneselli K, Mirazo J, Semiglia G, Filomeno A, Benech A, Benavides U, Maisonnave J (2011). Terapia Regenerativa: Comportamiento celular in vitro de células madre mesenquimales de origen animal. 7º Jornadas Técnicas Veterinarias, Montevideo, Uruguay; pp. 62-63.
68. Yaneselli K, Filomeno A, Mirazo J, Semiglia G, Maisonnave J (2012). Comportamiento in vitro de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo canino y equino (resultados preliminares). Simposio Latinoamericano de Tecnología de Cultivos Celulares, Santa Fe, Argentina; pp. 48.
69. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Maisonnave J (2012). Medicina Regenerativa: implante de células madre mesenquimales alogénicas en un defecto óseo en un canino. XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Piriápolis, Uruguay; pp. 39.
70. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Arce C, Rial A, Muñoz N, Moreno M, Erickson K, Maisonnave J (2013). Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. *Vet Med Res Reports*; 4: 39-44.
71. Yaneselli K (2015). Caracterización de las células madre mesenquimales caninas derivadas de tejido adiposo (CMM-TA) extraídas de dos sitios anatómicos diferentes. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
72. Yin H, Cui L, Liu G, Cen L, Cao Y (2009). Vitreous cryopreservation of tissue engineered bone composed of bone marrow mesenchymal stem cells and partially demineralized bone matrix. *Cryobiology*; 59:180-187.
73. Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. (1998). Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J. Mater. Sci Mater Med* 9:723-726.
74. Zhanghua L, Wen L, Qiang Z, Ming L, Wei X, Yi Y, Ningsheng S (2013). Angiogenesis and bone regeneration by allogeneic mesenchymal stem cell intravenous transplantation in rabbit model of avascular necrotic femoral head. *J Surg Res*; 183 (1): 193–203.
75. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*; 7: 211–228.
76. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*; 13: 4279–4295.
77. Zunino, J.H., Bengochea, M., Johnston, J., Deneo, H., Hernández, S (2004). Immunologic and osteogenic properties of xenogeneic and allogeneic demineralized bone transplants. *Cell and Tissue banking*; 5:141-148.