

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**IMPLANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ALOGÉNICAS
EN UNA NO-UNIÓN DE RADIO EN UN CANINO**

por

Kevin Matías YANESELLI GONZALEZ

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: Estudio de Caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**

Página de aprobación:

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de la mesa

Dr. Gabriel Semiglia

Segundo miembro (tutora)

Dra. Jacqueline Maisonnave

Tercer miembro

Dr. Álvaro Hernández

Co-tutora

Dra. Andrea Filomeno

Fecha:

Autor:

Kevin Yaneselli

Agradecimientos

- Propietario Sr. Rodolfo Castro y familia por su colaboración activa con el tratamiento regenerativo.
- Dra. Maisonnave por aceptarme y guiarme en este trabajo de tesis de grado como tutora.
- Dra. Filomeno por aceptarme y guiarme en este trabajo de tesis de grado como co-tutora.
- A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología.
- A todo el equipo de cirugía del Departamento de Pequeños Animales.
- Familia y amigos.

Tabla de contenido

	Página
Página de Aprobación	2
Agradecimientos	3
Resumen	7
Summary	8
Introducción	9
Medicina ortopédica	9
Medicina regenerativa.....	9
Tejido óseo	9
Componentes celulares óseos.....	10
Componentes de matriz ósea.....	10
Estructura del hueso.....	10
Fracturas	12
Resolución de una fractura.....	12
Etapa de inflamación.....	13
Etapa de reparación.....	14
Etapa de remodelación.....	16
Complicaciones en la resolución de una fractura.....	16
Fracturas con unión demorada y no unión.....	16
Causas de unión demorada y no unión.....	17
Osteomielitis	18
Osteomielitis aguda.....	19
Osteomielitis crónica.....	20
Diagnóstico de osteomielitis.....	20
Tratamiento tradicional de osteomielitis.....	22
Tratamiento con células madre en medicina ortopédica	22
Células Madre Mesenquimales (MSC).....	22
Característica de pluripotencialidad.....	23
Característica de inmunomodulación.....	24
Característica de angiogénesis.....	25
Aplicación de células madre en medicina ortopédica.....	26
Caso clínico	27
Hipótesis	28

Objetivos	29
Material y Métodos	29
Paciente.....	29
Procesamiento de de MSC-TA.....	29
Tratamiento.....	30
Evaluación del paciente.....	31
Resultados	31
Terapia regenerativa.....	31
Evolución clínica.....	31
Evolución radiológica.....	32
Discusión	33
Conclusión	35
Referencias	36

Tabla de cuadros y figuras

Página

Cuadro 1: Efecto inmunosupresor de las MSC.....	25
Figura 1: Estudio clínico y radiológico pre-tratamiento.....	28
Figura 2: Aplicación de MSC.....	30
Figura 3: Evolución clínica post-tratamiento.....	31
Figura 4: Evolución radiológica post-tratamiento.....	32

Resumen

La ausencia de consolidación ósea (no-uni3n) se manifiesta frecuentemente con dolor local, limitaci3n funcional, atrofia muscular, deformidad de grado variable y presencia de fistulas en los casos que dicha no-uni3n sea producto de una osteomielitis. La hip3tesis del presente trabajo es que las C3lulas Madre Mesenquimales (MSC) trasplantadas sobre un defecto 3seo podr3a promover la regeneraci3n. El objetivo fue evaluar el tratamiento con MSC derivadas de tejido adiposo (MSC-TA) alog3nicas en un canino hembra, raza greyhound "galgo", 3 a3os de edad, con una no-uni3n de radio del miembro izquierdo, producto de una fractura expuesta, que deriv3 en una osteomielitis cr3nica. La terapia celular consisti3 en 5 inyecciones percut3neas sobre el defecto 3seo, con 2×10^6 MSC-TA por implante, una vez por semana. En 5 semanas se culmin3 el tratamiento regenerativo con un total de 10×10^6 MSC-TA alog3nicas. El paciente fue evaluado cl3nica y radiol3gicamente durante 16 semanas. Los resultados fueron mejor3a cl3nica con retorno a la funcionalidad del miembro, debido a la resoluci3n del proceso de osteomielitis con cese del dolor y ganancia de masa muscular. Radiol3gicamente desaparecieron los signos de osteomielitis. Se concluye que la terapia con MSC-TA alog3nicas sobre la no-uni3n contribuy3 al retorno funcional del miembro afectado y fue mitigado el proceso de osteomielitis con una terapia m3nimamente invasiva. Fue segura su utilizaci3n, porque no existi3 evidencia de rechazo a los aloimplantes. Creemos que la terapia celular para reparaci3n de defectos 3seos en peque3os animales es una alternativa futura muy prometedora.

Palabras clave: terapia regenerativa; c3lulas madre mesenquimales (MSC); canino.

Summary

The absence of osseous consolidation (nonunion) bone defects occur frequently with local pain, functional limitation, muscular atrophy and presence of fistulas due to osteomyelitis. The hypothesis is that Mesenchymal Stem Cells (MSC) implanted on the bone defect could improve the regeneration. The objective of the present study was to evaluate the treatment with adipose tissue derived allogeneic MSC (AT-MSC) in a 3 year old greyhound female, with a nonunion defect in its left radius, as a result of an exposed fracture, which resulted in chronic osteomyelitis. Cell therapy consisted in 5 weekly percutaneous injections of allogeneic 2×10^6 AT-MSC into the bone defect (a total of 10×10^6). The results were: clinical improvement with return to functionality of the forearm, because of the resolution of the osteomyelitis process also observed radiologically, with no pain and gain of muscular mass. The conclusion is that allogeneic MSC-AT, a minimal invasive therapy, helped to improve the functionality of the affected forearm, with mitigation of osteomyelitis. There is no evidence of rejection of the aloimplants, therefore it is safe to use allogeneic MSC. Cell therapy to repair bone defects in small animals is a very promising future alternative.

Keywords: regenerative therapy, mesenchymal stem cells (MSC), canine.

Introducción

Medicina ortopédica

Se refiere a las maniobras de reducción, clasificación de las fracturas y su consolidación, y los tipos de materiales utilizados como injertos. La cirugía ortopédica incluye varias técnicas como estabilizar los huesos fracturados, desbridar y estabilizar la articulación lesionada (Johnson, 2009).

Medicina regenerativa

Es un campo de investigación emergente conocido también como “Ingeniería de Tejidos” la cual implica el trabajo multidisciplinario en Medicina Veterinaria. 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 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).

Tejido óseo

Tejido conectivo especializado que en conjunto con el cartílago conforman el sistema esquelético. Tiene tres funciones principales: mecánica (soporta el cuerpo y es zona de unión de la musculatura); protectora (de los órganos vitales y la médula espinal); y metabólica (como reserva de iones, especialmente calcio y fosfato) (Jingushi y col., 2002). Una de las virtudes del el tejido óseo es que es el único tejido capaz de repararse a sí mismo de manera completa por medio de la reactivación de los procesos que tienen lugar durante la embriogénesis. De esta manera, cuando aparece una lesión ósea, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, cuando existen pérdidas masivas de masa tisular o procesos

infecciosos asociados puede ser necesario recurrir a nuevas terapias. Las nuevas terapias utilizan sustitutos óseos, aplicación de productos bioactivos o terapia con células madre para promover la regeneración ósea de defectos graves (Abarrategui, 2008, Johnson, 2009).

Componentes celulares óseos

Existen tres principales células en el hueso los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos, son células redondas y engrosadas con abundante retículo endoplasmático, generadoras de matriz ósea (ostioide). Esta célula se diferencia cuando está rodeada de matriz ósea y se transforma en osteocito. La última población celular son células multinucleadas con bordes encrespados que se encuentran en la matriz mineralizada llamados osteoclastos y son responsables de la remodelación ósea.

Componentes de matriz ósea

Todos los huesos largos, planos, intramembranosos, reticulados y compactos son formas especializadas de tejido conectivo. El mineral es el componente de matriz extracelular del hueso que la distingue de otras matrices de tejido conectivo y le permite realizar sus funciones únicas. El hueso está compuesto por una matriz ósea, que representa alrededor de un 98% del volumen, y células específicas, que representan el 2 % restante. Aproximadamente un 20 % de su volumen se encuentra constituido por agua y almacena casi el 99 % del calcio del organismo. El principal mineral es la hidroxiapatita que son cristales de pequeño tamaño. La matriz ósea está en constante remodelación y regeneración dirigida por las presiones mecánicas.

Estructura del hueso

Las fuerzas que actúan sobre él modifican constantemente su forma, de tal manera que la presión condiciona su reabsorción y la tensión da lugar a la neoformación ósea (Liang y col., 2005). Desde un punto de vista anatómico, en el esqueleto se pueden distinguir dos tipos de hueso: los huesos planos (huesos craneales, escápula, mandíbula e ilion) y los huesos largos (tibia, fémur y húmero).

El esqueleto del individuo adulto está formado por hueso cortical o compacto y el hueso trabecular o esponjoso. El primer tipo de hueso es el principal responsable de la integridad mecánica (80% del volumen total del hueso) y el segundo tipo de hueso que es el responsable fundamental de las demandas metabólicas (20% del volumen total del hueso). El hueso cortical constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo (Martini y col., 2001; Pearce y col., 2007). Tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers que se extienden longitudinalmente. Los canales Haversianos están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkmann, que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay pequeños orificios o lagunas donde se encuentran los osteocitos. Estas células intercambian nutrientes con el líquido intersticial a través de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones celulares citoplasmáticas. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente, a los canales de Havers. El canal Haversiano junto con las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos recibe el nombre de osteona. Las restantes láminas entre osteonas se llaman láminas intersticiales. Existe el hueso lamelar que está formado por unidades concéntricas que se llaman lamelas, dejando unas cavidades en su centro, lagunas, donde se alojan los osteocitos, conectadas entre sí por los llamados canales de Volkmann y de Havers.

A diferencia del hueso compacto, el hueso trabecular no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de médula ósea roja.

Dentro de las trabéculas están los osteocitos que están en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos.

El hueso esponjoso es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de los huesos planos.

Las distintas cargas que actúan sobre los huesos del esqueleto se encuentran relacionadas con las diversas actividades del individuo, tanto compresivas, como de tracción. El hueso esponjoso soporta principalmente fuerzas de compresión, en cambio, el hueso cortical debe soportar fuerzas de compresión, tracción y cizalladura. En líneas generales, la fase mineral del hueso le confiere su resistencia a la compresión y cizalladura, mientras que el colágeno le proporciona su resistencia a la tracción (Boskey, 2006; Liang y col., 2005).

Fractura

Cuando un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica se origina una fractura, desencadenándose tras ella el proceso de consolidación o reparación ósea, que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas originales.

Es vital la resolución de una fractura para la sobrevivencia del individuo, ya que está comprometida su locomoción, después de una fractura, las características morfológicas del tejido reparador depende de varios factores; dos de ellos son entorno vascular y mecánico del sitio de fractura. Cuando se produce la curación de la fractura, mejoran los componentes principalmente vasculares, en el hueso tenemos arterias nutricias, metafisiarias y perióstica. También se provee sangre extraósea de los tejidos blandos subyacentes al hueso (Hulse y Hyman, 2006). Aunque el sistema vascular aferente normal regresa a su posición dominante según la estabilidad lo permita, la provisión de sangre extraósea es importante en etapas iniciales de la curación. Es importante la llegada temprana de nutrientes a las células pluripotentes en el sitio afectado.

Resolución de una fractura

En la etapa inicial el único tejido que puede sobrevivir a la gran movilidad que existe en la brecha de una fractura, es el tejido de granulación (soporta el 100% de deformación) que paulatinamente se transforma en tejido fibrosos (soporta un 10% de movilidad) dándole mayor estabilidad y reduciendo el movimiento entre los cabos. Es importante la estabilización de la brecha para permitir la sobrevivencia del tejido óseo (soporta un 2 % de movilidad).

La unión del hueso puede darse de dos maneras: curación directa (reconstrucción de la masa ósea) o curación indirecta (formación de callo intermedio) (Hulse y Hyman, 2006). La reconstrucción primaria se da con el alineamiento de los extremos de la fractura y estabilidad absoluta. Este tipo de resolución es la deseada por su rápida y fácil resolución. Existen dos tipos de reconstrucción primaria 1) curación de contacto y 2) curación de la brecha (Hulse y Hyman, 2006; Johnson, 2009).

- 1) La curación de contacto se da en las áreas de cercanía del hueso cortical y se caracteriza por una reconstrucción de masa ósea a través del plano de fractura. Existen procesos de reabsorción y remodelación ósea.
- 2) En la curación de la brecha no existe una aposición directa del hueso, inicialmente el espacio se llena de vasos sanguíneos y tejido conectivo laxo. Después de 2 semanas aproximadamente los osteoblastos inician la síntesis de hueso lamelar, pero existe poca adherencia entre hueso viejo y nuevo. Con el tiempo, el nuevo hueso lamelar se orienta longitudinalmente y restablece la integridad anatómica y mecánica de la corteza.

Para la remodelación del callo óseo existen diferentes técnicas de estabilización como la fijación externa e interna. En el caso de fracturas inestables acompañadas de compromiso vascular debido a la lesión, el tejido óseo se forma a partir de tejido fibroso o cartilaginoso (callo). Las etapas de curación indirecta se dividen en inflamación, callo blando, callo duro y remodelación.

Etapa de inflamación

Comienza inmediatamente después de la fractura y se mantiene hasta la iniciación de la formación de tejido fibroso o cartílago. Se rompen los vasos sanguíneos y en la zona se forma un hematoma. El proceso inflamatorio es importante en esta etapa inicial, las células inflamatorias y las citoquinas proinflamatorias interleucina 1 y 6, pueden ser importantes en la regulación temprana de la resolución de la fractura. Los componentes de las plaquetas son degranulados sobre el sitio, las moléculas bioactivas más importantes son

factor de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), participan en la modulación, proliferación y diferenciación de las células, además de favorecer los procesos osteoinductores y de revascularización (Reyes y col., 2002). Los mediadores inflamatorios, como los lípidos activos prostraglandinas E1 y E2, pueden estimular la angiogénesis, y además señalar donde está la lesión a los osteoclastos para promover la resorción ósea del tejido afectado y también atraer a las células madre mesenquimales. Pero este proceso inflamatorio sólo contribuye en etapas iniciales. Entre las células inflamatorias que migran al foco de fractura se encuentran leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. A medida que disminuye la reacción inflamatoria, el tejido necrótico y el exudado plasmático son reabsorbidos y los osteoblastos se encargan de producir una nueva matriz ósea (Abarrategui, 2008; Hulse y Hyman, 2006; Johnson, 2009).

Etapa de reparación

El proceso de consolidación es estimulado por factores quimiotácticos liberados en la fase previa y las proteínas de la matriz expuestas por la desorganización tisular. La organización del hematoma de fractura proporciona un soporte de fibrina que facilita la migración celular, proliferación y síntesis de matriz ósea. En este estado el microambiente a nivel del foco de fractura es ácido por falta de irrigación, pero en la medida que el proceso avanza el pH se va alcalinizando progresivamente (en etapas iniciales el pH es ácido debido al metabolismo celular en condiciones de hipoxia). Cuando los extremos de fractura se necrosan son reabsorbidos por los osteoclastos, lo que permite que los vasos periósticos aporten los brotes vasculares que inician la reparación. En este estadio la fosfatasa alcalina alcanza su nivel de actividad máximo, favoreciendo el inicio de la mineralización del callo óseo. Las células mesenquimales pluripotenciales del foco de fractura y del torrente sanguíneo son las responsables de la neoformación ósea (Abarrategui, 2008; Hulse y Hyman, 2006). En las etapas de reparación tenemos la formación de a) callo blando y luego b) callo duro.

- a) Callo blando constituido por tejido de granulación espaciando la solución de continuidad ósea para madurar en tejido fibroso o fibrocartilaginoso, dependiendo del “microambiente”. Se empieza a formar tejido fibroso en la periferia del callo blando, donde el suministro de sangre es abundante. Hacia el centro del callo el suministro de sangre es limitado y se forma fibrocartilago. La formación del callo duro va a depender de estabilidad de la fractura. La formación del callo depende directamente del grado de movimiento: a mayor inestabilidad, mayor diámetro del callo interno y externo. Ambos tejidos fibroso y fibrocartilaginoso tienen propiedades mecánicas suficientes como para tender un puente a la fractura pero no para disminuir la deformación local.

La composición del callo óseo se modifica a medida que progresa la consolidación, de tal forma que las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa que contiene colágeno tipo I y III, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Posteriormente el tejido fibroso se transforma en fibrocartilago, con un importante contenido de colágeno tipo II, proteoglicanos específicos y proteínas de unión (Abarategui, 2008; Hulse y Hyman, 2006; Johnson, 2009).

- b) El callo duro aumenta la rigidez de la fractura y empieza el proceso de mineralización, en el fibrocartilago comienza del exterior al centro de la brecha. En el caso del tejido fibroso comienza a mineralizarse entre las fibras de colágeno para convertirse en hueso fibroso. La mineralización del callo duro confiere resistencia y rigidez estructural para limitar la deformación del espacio para permitir la formación de tejido óseo. El fibrocartilago sufre la osificación endocondral donde el osteoide se deposita en el andamio cartilaginoso osificado y el hueso fibrosos. Estos tejidos mineralizados van siendo remplazados en forma paulatina por hueso esponjoso. La formación de un callo esponjoso brinda rigidez y resistencia estructural suficiente para la consolidación una vez que se ha tendido el puente por completo. El hueso curado tiene un diámetro mayor del normal y puede estar deformado. Finalmente, se produce la mineralización de la matriz ósea en paralelo a un aumento de la concentración de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y proteínas no colágenas, proceso que concluye con la

osificación de la masa fusiforme del callo que envuelve los extremos de la fractura y que contiene cantidades crecientes de hueso inmaduro (Abarrategui, 2008; Hulse y Hyman, 2006; Johnson, 2009).

Etapa de remodelación

El callo esponjoso no es permanente, con el pasar de remodelaciones óseas puede tornarse cortical, dicho proceso demanda meses o años. El hueso esponjoso puede cambiar a lamelar orientado en forma longitudinal, y el contorno del hueso restablecido. Corresponde a la última fase del proceso de reparación o consolidación en la que se sustituye el hueso inmaduro del callo óseo por hueso laminar. Una vez que se ha reemplazado todo el hueso neoformado, el proceso de remodelación continúa con la reabsorción de las trabeculas mal orientadas por parte de los osteoclastos y su sustitución por otras nuevas adaptadas a las líneas de fuerza. Cuando la remodelación del callo óseo concluye completamente, se recuperan las propiedades mecánicas originales del hueso comprometido (Abarrategui, 2008; Hulse y Hyman, 2006; Johnson, 2009).

Complicaciones en la resolución de una fractura

La curación de fractura procede por lo general en forma ordenada cuando se hallan presentes los componentes biológicos y mecánicos apropiados. Sin embargo pueden surgir complicaciones en la reparación que complican la curación de la fractura (Millis y Jackson, 2006).

Fracturas con unión demorada y no-unión

Una unión demorada es aquella de lenta cicatrización comparada con una fractura similar y método de fijación semejante. Pero esta definición es imprecisa y limitada ya que es muy variable el tiempo de resolución de una fractura, además dicha resolución es multifactorial (edad, raza, tejidos blandos afectados, ubicación y método de fijación) (Millis y Jackson, 2006; Johnson, 2009).

Una no unión, es una fractura en la que la progresión de la cicatrización aparentemente a cesado, hay movimiento en el sitio, y la curación es improbable sin intervención. La unión demorada precede a la no-unión. Existe la clasificación de la no-unión en viables o inviables (Millis y Jackson, 2006; Johnson, 2009).

- 1) No-unión viable: son aquellas que tienen evidencia de formación de callo y de reacción ósea. Existen tres subclases: a) no-unión hipertrófica b) no-unión moderadamente hipertrófica c) no-unión oligotrófica.

- 2) No-unión inviable: son poco comunes y tiene una interrupción vascular importante. Existen tres subclases a) no-unión distrófica uno de los bordes sin vascularización, no se llena completamente la brecha, bordes redondeados b) no-unión necrótica tiene fragmentos avasculares cerca, que permanecen en el sitio de la fractura como secuestros. Pueden aparecer en fracturas altamente conminutas con daño grave de tejido blando, interrupción de suministro sanguíneo e infección. Radiológicamente los fragmentos óseos son de bordes agudos y escleróticos. c) no-unión defectuosa d) no-unión atrófica generalmente una secuela de las otras no uniones inviables, se caracteriza por la pérdida de vascularización, resorción y remodelación de los extremos del fragmento, y osteoporosis. Con el tiempo puede causar una pseudoartrosis como el resultado del movimiento en el sitio de no-unión. Hay esclerosis en los extremos del hueso, formación de fibrocartílago y acumulo de suero en la zona de no unión.

Causas de la unión demorada o no-unión

Existen diversas causas como estabilidad inadecuada de la fractura, mala reducción o aposición de la fractura, inadecuada irrigación, infección o fragmento óseo faltante (Millis y Jackson, 2006; Schulz, 2009).

- 1) Inestabilidad: es uno de los principales factores, es importante que el método de fijación sea el adecuado y eficaz. Pero esta fijación no

debe ser muy rígida tampoco porque está comprobado que retrasa la unión ósea.

- 2) Suministro vascular: existen dos componentes vasculares que se encuentran en el endostio y periostio. El endostio es responsable de irrigar a 2/3 de la corteza interna, en cambio del último tercio externo el responsable es el periostio. Cuando se interrumpe la vascularización por una fractura, en dicha zona inicialmente la principal fuente de irrigación va a ser extraósea. Es importante tener cuidado con los tejidos blandos a la hora de “limpieza” despellejamiento, desbridación en la reconstrucción ósea.
- 3) Infección local: en tejidos blandos y/u óseos puede causar necrosis y retrasar la curación de la fractura. Es importante destacar que una fractura expuesta tiene mayor exposición a patógenos que una cerrada, lo que conlleva a una mayor incidencia de osteomielitis. Es importante destacar que la fractura se puede resolver igual en presencia de una infección. La infección bacteriana induce un proceso inflamatorio, proteólisis y altera el pH en la zona de fractura, existiendo una hipovascularización que inhibe la formación del callo y demora o detiene la curación de la fractura. También los dispositivos pueden afectar negativamente la vascularización.
- 4) Alteraciones metabólicas: hipoparatiroidismo secundario nutricional y renal, provocan un desequilibrio en el calcio y el fósforo y retarda la curación. También puede afectar la curación el hiperadrenocorticismos, tratamiento con corticoides y hepatopatía.

Osteomielitis

Tenemos dos fuentes de osteomielitis la hematógena y la exógena. La fuente hematógena afecta frecuentemente a animales neonatos o jóvenes. Tiene una baja frecuencia y en general está asociado a una afección sistémica, con gran deterioro del animal (Budenki y Smith, 2006; Schulz, 2009). En cambio, la osteomielitis de fuentes exógenas son las más frecuentes en perros y las infecciones tienen diversos orígenes, las más comunes son fracturas expuestas, penetración de cuerpo extraño y contaminación durante el

procedimiento quirúrgico. Se produce la osteomielitis cuando tenemos infecciones asociadas a daño de tejido blando, necrosis ósea, secuestros e implantes rechazados (Budenki y Smith, 2006; Schulz, 2009).

Etiología

Las infecciones de herida en cirugía ortopédica se producen por lo general por contaminación de fracturas expuesta o con la reparación de la misma, como resultado se produce osteomielitis e infección de tejidos blandos. La osteomielitis es la inflamación del hueso y sus contenidos medulares. La etiología de las infecciones generalmente son de origen bacteriano y existe también de origen micótico, y rara vez es de origen viral. (Brady y col., 2006; Carek y col., 2001). La osteomielitis crónica puede tener un origen aséptico por presencia de secuestros o séptico por contaminación (Budenki y Smith, 2006; Schulz, 2009). El principal agente causal de osteomielitis es bacteriano, se han encontrado diferentes géneros bacterianos aeróbicos (Elasri y col., 2002; Ghorashi y col., 2011; Zhang y col., 2011) y anaeróbicos (Backmeyer y col., 2008; Cimolai, 2011; Lee y col., 2012; Murray y Lieberman, 2002) en este tipo de patología ósea. Sin embargo, es importante conocer los agentes más comunes para poder optar por un tratamiento eficaz. Con mayor frecuencia podemos encontrar el estafilococo β -lactamasa positivo, estreptoco y bacterias aeróbicas gramnegativas (Brady y col., 2006; Budenki y Smith, 2006; Carek y col., 2001)

Osteomielitis aguda

Es una complicación habitual de la reparación de una fractura expuesta, los signos clínicos aparecen a los 5-7 días. Los animales están febriles y presentan leucocitosis. Las heridas quirúrgicas son edematosas, eritematosas y con calor local. Puede presentar alteraciones sistémicas dando letargia, y alteraciones hematológicas.

Fisiopatología

En el desarrollo de las infecciones óseas existen tres factores importantes a) integridad de los tejidos blandos, b) virulencia del agente contaminante y c) capacidad del huésped de montar una respuesta inmune. El suministro

sanguíneo juega un papel clave, es esencial para distribuir nutrientes, oxígeno, componentes celulares y humorales del sistema inmune y antibióticos (ATB). El daño inicial y la reparación quirúrgica disminuyen el flujo sanguíneo, y la fijación interna suprimen aun más la irrigación. Lo que se traduce en una disminución de la capacidad para eliminar contaminantes por parte del paciente. La colonización de las bacterias ocurre en hematomas, tejidos desvitalizados y el hueso avascular. Las bacterias tienen subproductos perjudiciales, sumado a la acción del proceso inflamatorio que debilitan la matriz ósea (Budenki y Smith, 2006).

Osteomielitis crónica

El proceso de osteomielitis aguda evoluciona en el tiempo y se transforma en un proceso crónico. Como consecuencia encontramos atrofia moderada a grave del miembro afectado (por desuso), usualmente varias vías de drenaje (fistulas múltiples), además existe una respuesta a los ATB buena porque cierran las fistulas, pero al finalizar la antibioticoterapia regresan las fistulas. Pueden acompañarse de episodios sistémicos con probable septicemia (Brady y col., 2006; Budenki y Smith, 2006; Carek y col., 2001).

Fisiopatología

La respuesta inmune aísla el hueso necrótico con tejido de granulación y/o fibroso, evitando la formación ósea y favoreciendo la formación de los sequestros. La presencia de infección es agravada por la presencia de implantes metálicos que proporcionan un nicho para las bacterias donde se adhieren con su matriz extracelular (cápsula) y evaden las defensas del organismo (Brady y col., 2006; Budenki y Smith, 2006; Carek y col., 2001).

Diagnóstico de osteomielitis

La osteomielitis crónica se presenta clínicamente con dolor al tacto del sitio de fractura, claudicación, atrofia muscular, rango de movimiento articular reducido por encima y debajo de la fractura, en algunos casos puede detectarse inestabilidad. En presencia de infección puede existir fistulas múltiples

cercanas al sitio afectado (Brady y col., 2006; Budenki y Smith, 2006; Carek y col., 2001; Schulz, 2009). Dentro de los estudios paraclínicos se destaca el estudio radiológico, en la osteomielitis los patrones radiológicos son zonas de neoformación ósea (osteogénesis), zonas de lisis (osteólisis) y presencia de secuestros óseos. Existen otros estudios complementarios de imagenología como tomografía computada, resonancia magnética, ecografía y gammagrafía ósea pero son utilizados con menos frecuencia para el diagnóstico de osteomielitis. Es recomendable realizar un análisis microbiológico, la muestra debe ser recogida directamente del tejido óseo afectado. La toma de muestras proveniente de las fistulas puede contener otros microorganismo como los ambientales que falsean los resultados del real agente etiológico. Cuando es aislado el agente y se poseen los resultados del antibiograma, se puede escoger un ATB específico (Brady y col., 2006; Budenki y Smith, 2006; Carek y col., 2001).

Diagnóstico diferencial

Los trastornos neurológicos pueden confundirse con las enfermedades ortopédicas o pueden producirse a la vez. Todas las exploraciones ortopédicas deben incluir varias maniobras de exploración neurológica para descartar los trastornos neurológicos (Budenki y Smith, 2006; Schulz, 2009). Otra patología que debe tomarse en cuenta son las afecciones infecciosas de tejidos blandos, que solo afectan los tejidos blandos y no al óseo. Para descartarlo se deben utilizar técnicas de imagenología, las cuales, confirman la necrosis ósea, formación de secuestros óseos y/o zonas de osteólisis y osteogénesis en la zona de la injuria ósea (Budenki y Smith, 2006; Schulz, 2009).

Diagnóstico definitivo

Son importantes los estudios clínicos y radiológicos, en términos generales vamos a encontrar un animal con diferentes signos clínicos que indican un proceso crónico de injuria. Aparece atrofia muscular del miembro afectado por desuso, presencia de fistulas múltiples que es típico de osteomielitis crónica. Radiológicamente aparecen zonas de osteogénesis y osteólisis debido a la infección del hueso. Cuando tenemos una no-unión asociada a una

osteomielitis usualmente se presentan con atrofia muscular persistente, y algún grado de deformidad del miembro. Generalmente existe una ausencia de consolidación fracturaría (no-uni3n) por un periodo de 3 meses.

Tratamiento tradicional de osteomielitis

Existen tres objetivos independientemente al m3todo empleado, los cuales son fomentar la cicatrizaci3n, recuperar la funcionalidad del hueso y del tejido blando circundante, y conseguir unos resultados est3ticamente aceptables. (Budenki y Smith, 2006; Schulz, 2009). En la uni3n demorada asociada a osteomielitis, existe un proceso infeccioso adicionado a la fractura. Es conveniente iniciar la aplicaci3n de ATB de amplio espectro r3pidamente y posteriormente si es necesario cambiarlo en funci3n del agente etiol3gico. La osteomielitis se trata quir3rgicamente si hay un secuestro. Se debe remover el secuestro y desbridar la herida. Si el tejido necr3tico no puede ser removido debidamente, se puede solucionar con un drenaje abierto y permitir el cierre de forma secundaria. En el caso de persistir el proceso patol3gico se transforma en una no-uni3n asociado a osteomielitis. La infecci3n contribuye a la interrupci3n vascular local. Se debe quitar todo material de fijaci3n (clavo) cercano al proceso infecciosos, fragmento 3seo avascular (secuestro), tejido blando infectado. Es importante limpiar la zona pero no debemos desbridar demasiado, podr3a ocasionar una p3rdida del suministro sangu3neo y menor llegada del antibi3tico. Antes de los resultados de microbiolog3a se suministra antibi3ticos de amplio espectro. Cuando se cuenta con resultados definitivos se puede iniciar antibioticoterapia espec3fica para el pat3geno. Los clavos de fijaci3n deben colocarse lejos de la no-uni3n, ya que cerca podr3an favorecer que la infecci3n perdure por la formaci3n de capsula microbiana sobre los clavos.

Tratamiento con c3lulas madre en medicina ortop3dica

C3lulas Madre Mesenquimales (MSC)

Las MSC fueron descubiertas por Friedenstein en la d3cada del 70 (Gregory y col., 2005). Tienen caracter3sticas importantes como pluripotencialidad, por lo

que son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares dentro del mismo linaje germinal de origen (Enzmann y col., 2009; Jiang y col., 2002). La mayoría de los tejidos de un individuo adulto, posee una población propia pequeña de células madre que permiten en caso de daño tisular, a causa de traumatismos o enfermedades, su regeneración. Esta particularidad permite obtener MSC de animales adultos, mediante la extracción de médula ósea (MSC-MO) y tejido adiposo (MSC-TA). Está descrito por varios autores el aislamiento y la expansión *in vitro* de MSC-TA de origen animal (de Mattos Carvalho y col., 2009; Kisiday y col., 2008; Martinello y col., 2010). La expansión puede realizarse manteniéndolas indiferenciadas y posteriormente ser almacenadas. Para almacenar las células un largo periodo de tiempo, se utiliza la criopreservación en nitrógeno líquido (- 196 °C) (Gonda y col. 2008). Las MSC provenientes de humanos y caninos luego de ser almacenadas por un largo período conservan las características fenotípicas y el estado indiferenciado *in vitro* (Gonda y col., 2008; Liu y col., 2008; Martinello y col., 2010). Entonces es posible tener un banco de MSC indiferenciadas almacenadas indefinidamente, y no pierden su pluripotencialidad, esta característica se demostró en las MSC de origen animal (Dressler y col., 2005; Martinello y col., 2010; Yaneselli y col., 2011) y humano (Gonda y col., 2008; Liu y col., 2008; Yin y col., 2009). Debido a sus características de pluripotencialidad, fácil extracción del animal adulto y fácil 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 veterinaria (Jung y col., 2009; Mimeault y Batra, 2008; Pacini y col., 2007; Strauer y col., 2009) .

Característica de pluripotencialidad

Potencialmente las MSC pueden diferenciarse en células del linaje mesenquimal como adipocitos, condrocitos y osteocitos (Jung y col., 2009; Violini y col., 2009), y también en células de linaje no mesenquimal como miocitos, hepatocitos e incluso células tipo neuronales (Jung y col., 2009; Strem y col., 2005). La pluripotencialidad es la característica en que se han centrado la mayoría de los estudios, demostrando que las MSC son capaces

de diferenciarse hacia el linaje mesenquimal, es decir, en adipocitos, condrocitos y osteocitos. También son capaces de diferenciarse en células de linaje no mesenquimal como tendocitos y miocitos (Bi y col., 2007; Krampera y col., 2006) Para demostrar su pluripotencialidad *in vitro* se debe proporcionar a las MSC indiferenciadas un microambiente determinado que conduzca su diferenciación hacia diversos linajes, previamente descrito (de Mattos Carvalho y col. 2009; Ranera y col. 2011; Martinello y col., 2010). Las MSC tiene capacidad de diferenciarse en una línea osteoprogenitora pero para eso necesitan un determinado microambiente, este mecanismo es ampliamente conocido, incluso antes de demostrar *in vitro* su pluripotencialidad, ya existían estudios en perros según Huggins, (1931) que células del uroepitelio trasplantadas al tejido de la fascia rectal, fascia lata o los músculos de la pared abdominal, daban origen a la formación de hueso *in situ*. Posteriormente se confirmó en roedores la pluripotencialidad de las MSC-MO cuando son injertadas en un microambiente adecuado *in vivo*, por su capacidad osteoprogenitora (Burwell, 1964; Friedenstein y col., 1966). Se profundizaron los estudios de cómo las MSC se diferenciaban en células osteoprogenitoras y se demostró que un conjunto de estímulos extracelulares llevaban a la diferenciación, el principal estímulo es la presencia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Urist, 1965; Wang y col., 1988; Wozney y col., 1988). Esta describe la ruta de activación y diferenciación de las células inducida por BMPs, principalmente las BMP 2, BMP 4 y BMP 6, cuando interactúan con las MSC inducen la vía de señalización celular citoplasmática mediada por la familia de los Smads, que inducen la expresión del factor de transcripción Cbfa1, que finaliza con la diferenciación en osteoblasto capaz de producir matriz mineralizada ósea (Yamaguchi y col., 2000).

Característica de inmunomodulación

Tienen propiedades antiinflamatorias, pudiendo inhibir la respuesta inmunológica del huésped o receptor en casos de aloinjertos. El que las MSC alogénicas (células provenientes de individuos diferentes pero de la misma especie) no sean rechazadas se debe a la liberación de citoquinas propias y ausencia de varios antígenos de superficie inmunológicamente importantes en el reconocimiento por parte de linfocitos B y T (Le Blanc y col., 2003).

Existen estudios *in vitro* que demuestran el efecto inmunosupresor de las MSC sobre linfocitos y células de la inmunidad innata. Existen diferentes moléculas bioactivas a las cuales se les atribuye el poder inmunosupresor pero existen 4 principales moléculas (cuadro 1): indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), antígeno leucocitario humano isoforma G (HLA-g), interleucina 10 (IL 10), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Jone y MacTaggart, 2008).

Esta propiedad se ha demostrado *in vivo* utilizando injertos de MSC alogénicas en modelos de caninos, en los cuales, no existió rechazo (no hubo respuesta inflamatoria local o sistémica) (Arinzeh y col., 2003; Wan y col., 2006). A pesar de existir extensos estudios de esta propiedad de inmunomodulación no está totalmente dilucidada como son las rutas y estímulos que utilizan las MSC. Sin embargo, en ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha logrado inhibir la alo o xenorespuesta. (Niemeyer y col. 2009; Rasmusson y col., 2003).

Cuadro 1 Efecto inmunosupresor de las moléculas liberadas por las MSC

Molécula	Efecto biológico	Autores
IDO	Decrece la proliferación de células T y activa a su vez a los Linfocito T reguladores.	(Jone y MacTaggart 2008)
HLA-G	Inmunosupresor: inhibe proliferación de linf. T pero a su vez estimula la expansión de T reguladores	(Jone y MacTaggart 2008)
IL-10	Anti-inflamatorio efecto sobre células del inmunidad innata y linfocitos T.	(Jone y MacTaggart 2008) (Rasmusson y col. 2005)
TGF-B	Suprime la proliferación de los Linfocitos T	(Jone y MacTaggart 2008) (Rasmusson y col. 2005)

Característica de angiogénesis

Las MSC son capaces de liberar moléculas bioactivas que estimulan la angiogénesis. La mayoría de los trabajos sobre infartos de miocardio estudian esta característica *in vivo* de promoción vascular y mejorar la regeneración del miocardio. De las moléculas que liberan las MSC se destaca el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) que promueven la vascularización

local (Imanishi y col., 2008; Vandervelde y col., 2005). Sin embargo, sobre lesiones ortopédicas son escaso los estudios de cómo puede afectar esta característica angiogénica sobre el proceso de reparación ósea, pero se puede especular que es positivo, ya que fisiológicamente en la etapas inflamatorias y de regeneración es importante la vascularización para su correcta consolidación (Brady y col., 2006; Budenki y Smith 2006; Carek y col., 2001; Schulz 2009).

Aplicación de células madre en medicina ortopédica

En la ingeniería de tejidos se ha estudiado la reparación ósea, que es, un proceso que generalmente se da de manera natural. Sin embargo, en los casos de defectos óseos graves o proceso de osteomielitis, el hueso no se regenera adecuadamente, para contribuir con dicho proceso, se puede utilizar terapia celular con MSC y/o sustitutos óseos o injertos. La incorporación de los injertos es un proceso dinámico simultáneo de reabsorción de hueso necrótico y la osteogénesis. La integración de los injertos óseos se puede definir como el proceso de interdigitación y englobamiento del hueso del donante por el nuevo tejido óseo que forma el receptor, y tiene muchas semejanzas con la reparación o consolidación de las fracturas. Tradicionalmente los defectos óseos se han tratado implantando tejido óseo autólogo o heterólogo (allogénico o xenogénico). Pero surgieron nuevas terapias para aplicar sobre defectos óseos, que consisten en el injerto de MSC autólogas o hetétologas (allogénicas o xenogénicas), en todos los reportes, en mayor o menor grado, se notó una osteogénesis en la zona afectada. Los estudios radiográficos demuestran una mayor osificación en el segmento del defecto óseo, en los animales implantados con MSC, comparados con sus respectivos controles (Bruder y col., 1998; Jung y col., 2009; Niemeyer y col., 2010). Cuando hablamos de implante MSC allogénicas nos referimos a células de un donante de la misma especie y cuando nos referimos a implante MSC xenogénicas son células de un donante de diferente especie.

Esta descrito por Arinzhe y col., (2003) un modelo canino de defecto óseo inducido a nivel del fémur en 20 perros adultos, en un grupo de estos animales fue aplicado una terapia celular con MSC-MO allogénicas sobre la sitio del defecto. Los resultados fueron que no existió rechazo al aloimplante y luego de

16 semanas existió una mayor cantidad de matriz ósea en la brecha del defecto en los animales tratados. Entonces, fue demostrado *in vivo* el poder osteoprogenitor de las MSC. Como antecedente de terapia celular en Uruguay existen resultados preliminares según Semiglia y col., (2011) sobre una no-unión de fémur en un canino, en el cual se implantaron MSC-MO autólogas. Como resultado el paciente volvió utilizar el miembro afectado y radiológicamente evidencio la resolución de la no-unión y no hubo rechazo.

Caso clínico

Ingresó al Centro Hospital Veterinario (Montevideo), Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Un canino, raza greyhound “galgo”, hembra, 3 años aproximadamente, número de registro 0249/12. El motivo de consulta fue “se fracturó la mano izquierda”. En cuanto a la anamnesis podemos destacar que el propietario no sabía nada del evento anterior a la afección, debido a que la recogió de la calle aproximadamente un mes antes y ya tenía problemas en el miembro anterior izquierdo (MAI) con presencia de fistulas múltiples.

Al examen clínico se determinó que existía dolor al tacto en el sitio de fractura, claudicación, atrofia muscular, disminución del rango de movimiento articular por encima y debajo de la fractura. Existían descargas de material purulento (fistulas múltiples) cerca del sitio de fractura lo que indica un proceso infeccioso asociado (figura 1 A y B). En las radiografías del MAI en la zona del radio y cúbito se encontró una no-unión con focos de osteogénesis, osteólisis y la presencia de osteomielitis (figura 1 C y D).

El diagnóstico diferencial fue realizado en primer lugar con una afección de tejido blando que fuera el origen de las fistulas, pero fue descartado en este caso con las evidencias radiográficas que mostraron zonas de osteólisis típico de un proceso inflamatorio, causando la osteonecrosis y producción de fistulas. El segundo diferencial es por el motivo de la claudicación, se debe verificar que no sea asociado a afecciones neurológicas, pero fue descartado porque presentaba una propiocepción normal en el MAI. Entonces, el diagnóstico definitivo fue no-unión del miembro anterior izquierdo asociado a un proceso de osteomielitis.



Figura 1. Fotografía del paciente A) de cubito lateral derecho, presenta un estado general malo y rechaza el apoyo del MAI B) presencia de fistulas (flecha verde) en MAI en la cara lateral. Imágenes radiológicas del MAI C) imagen de perfil se observan fragmentos óseos separados del radio (flecha azul) y la zona de no-uni6n del radio y cúbito (flecha roja) D) imagen de frente se observan zona de osteog6nesis y oste6lisis (flecha azul) y la zona de no-uni6n (flecha roja).

Hip6tesis

La hip6tesis del presente trabajo es que la aplicaci6n de MSC-TA alog6nicas en el sitio de no-uni6n asociado a un proceso de osteomielitis, puede generar un microambiente adecuado para la regeneraci6n 6sea, por su efecto angiog6nico, inmunomodulador y osteoprogenitor.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el tratamiento con MSC-TA alogénicas en un caso clínico de no-unión de radio y cúbito asociado a osteomielitis en un canino.

Objetivos particulares

1. Descongelar, expandir MSC-TA alogénicas (donante) hasta llegar a un número adecuado para realizar la terapia celular.
2. Realizar cinco implantes de MSC-TA alogénicas sobre la no-unión ósea.

Material y Métodos

Paciente

Canino hembra, raza greyhound “galgo” de 3 años de edad aproximadamente, con una no-unión del radio y cúbito del MAI asociado a una osteomielitis crónica (figuras 3 A, 4 A y E).

Procesamiento de MSC-TA (aislamiento, expansión y criopreservación)

El donante de MSC-TA alogénicas fue un canino hembra cruce de 10 años de edad, sometida a una ovariectomía, a la cual, le fue extraído el tejido adiposo. La extracción fue autorizada previamente (PI N° 13/12) por CHEA. El cultivo primario de MSC-TA fue realizado según lo descrito por Martinello y col. (2011) brevemente: la grasa recolectada fue trozada y sometida a una digestión enzimática con colagensa tipo I, 1 mg/ml (Invitrogen). Posteriormente se centrifugó a 300 g durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido en medio esencial mínimo (MEM) con 10% suero fetal bovino (SFB) y 2 % penicilina-estreptomicina. Las células fueron sembradas en botellas de cultivo celular e incubadas a 37 °C con 5% de CO₂. Diariamente fueron observadas y cada 48 horas es cambiado el medio de cultivo. Cuando llegaron al 80 % de confluencia, fueron tripsinadas, y expandidas con una siembra de 4 - 2 x10⁴ células/cm² (Yaneselli y col., 2012). Las MSC-TA cuando llegaron al 80% de confluencia fueron criopreservadas en diferentes pasajes, con el protocolo

descrito por Martinello y col. (2011) y almacenadas en nitrógeno líquido a -196 °C.

Tratamiento

Terapia Regenerativa

El protocolo de la terapia celular fue autorizado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Fueron realizados cinco implantes percutáneos con intervalos de una semana sobre la no-unión ósea del radio y cúbito. Cada implante consistió de 2×10^6 MSC-TA alogénicas resuspendidas en solución buffer (PBS) Fueron aplicadas un total de 10×10^6 células, en un plazo de 5 semanas. El protocolo quirúrgico consistió en una sedación con una mezcla de acepromacina 1% (0,01 mg/kg), midazolam 0,5% (0,25 mg/kg) y ketamina 5% (5 mg/kg), administrando la mezcla en forma intravenosa (I/V). Como analgesia fue utilizado el tramadol (2 mg/kg) (I/V). Se realizó tricotomía de la zona (desde el humero al carpo), limpieza y posteriormente embrocado utilizando alcohol etílico 70°. Fue colocado el campo quirúrgico para aislar la zona a inyectar. El implante de MSC-TA alogénicas fue realizado por palpación del sitio de no-unión e inyectadas en forma percutánea con una aguja hipodérmica de 23 Gauge (figura 2 B).

Para la antibioticoterapia fue utilizado un ATB de amplio espectro de uso habitual en casos de osteomielitis, en este caso fue escogida la Clindamicina con una dosis de 11 mg/Kg, vía oral cada 12 horas, durante 4 semanas.



Figura 2. A) MSC-TA con un 80 % de confluencia P_2 , se puede observar morfología fusiforme característica de este tipo celular (x 100).
B) Implante percutáneo de MSC-TA resuspendidas en PBS en el sitio de no-unión.

Evaluación del paciente

Fue hecha con exámenes clínicos y radiológicos, durante 16 semanas. El examen clínico fue adaptado al score de claudicaciones de Maitre y col. (2008) brevemente: está basada en el análisis de la marcha, se clasifica el grado de claudicación en severa, media y ligera. La evaluación del paciente fue supervisada por la cirujana Dra. Andrea Filomeno, Centro Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Resultados

Terapia regenerativa

Fue aplicado un total de 10×10^6 MSC-TA alogénicas sobre la no-uni3n en un per3odo de 5 semanas. Fueron aplicados 5 aloimplantes (1 vez por semana) de manera percut3nea, tanto durante el tratamiento como post-tratamiento no se observaron signos de rechazo al implante, ausencia de respuesta inflamatoria durante 16 semanas de observaci3n (figura 3).

Evoluci3n cl3nica

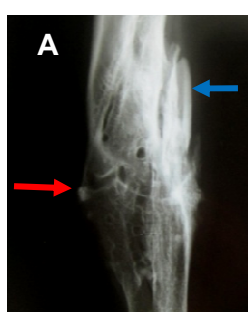
Evoluci3n del paciente fue **semana 0**: claudicaci3n severa, presencia de fistulas (figura 3, A), **semana 4**: claudicaci3n media y libre de fistulas (figura 3, B); **semana 8**: claudicaci3n media, libre de fistulas una vez cesada la antibioticoterapia; **semana 16**: claudicaci3n ligera, libre de fistulas (figura 3, C)



Figura 3. Evoluci3n cl3nica A) MAI con presencia de fistulas m3ltiples e inflamaci3n (semanas 0). B) MAI sin presencia de fistulas y ausencia de proceso inflamatorio (semana 4 post-tratamiento). C) MAI sin presencia de fistulas y ausencia de proceso inflamatorio (semana 16 post-tratamiento).D) Retorno funcional del miembro (semana 16 post-tratamiento).

Evolución radiológica

En la semana 0 podemos observar zonas de ostogénesis, osteólisis y el espacio de no-uni6n (figura 4 A y E). En la imagen correspondiente a la semana 16 post-tratamiento se puede observar que se iniciaron los procesos de reabsorci6n, regeneraci6n y remodelaci6n 6sea correspondiente a las l6neas de tensi6n a causa del retorno funcional del MAI. Existe una consolidaci6n de la fractura parcial a las 16 semanas post-tratamiento (figura 4 D y H).



Semana 0



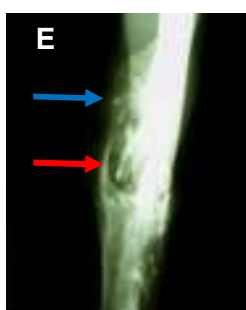
Semana 4



Semanas 8



Semana 16



Semana 0



Semana 4



Semana 8



Semana 16

Figura 4. Evaluaci6n Radiol6gica perfil (A, B, C y D) y frente (E, F, G y H) del tercio medio del radio y c6bito. A y E (flecha roja) sitio de no-uni6n, (flecha azul) fragmentos 6seos separados y zonas de ostogénesis y osteólisis. D y H (flecha violeta) zona donde se iniciaron los procesos de reabsorci6n y regeneraci6n 6sea.

Discusión

El tratamiento tradicional de osteomielitis consiste en una antibioticoterapia de amplio espectro acompañado de un procedimiento quirúrgico de desbridación del sitio afectado, lo que significa, que se debe reavivar el sitio de fractura, remover el tejido necrótico y lacerar el tejido perióstico cercano, aumentando la vascularización en dicho sitio, que está comprometida por la infección bacteriana e injuria de los tejidos. Se debe tener cuidado con este tipo de maniobras cruentas, ya que si se remueve demasiado tejido puede llegar a ser contraproducente para los procesos de regeneración ósea (Brady y col., 2006; Budenki y Smith 2006; Carek y col., 2001; Schulz 2009). En cambio la terapia celular realizada requirió un procedimiento menos cruento (inyección percutánea) y además solo una leve sedación, comparado con la desbridación para la cual se debe utilizar anestesia general. La gran ventaja con este nuevo tratamiento es omitir el procedimiento quirúrgico de desbridación.

Fue aplicado un total de 10×10^6 MSC-TA alogénicas sobre el sitio de no-unión en el MAI (figura 2). La cantidad de MSC aplicada varía según el tipo y tamaño de lesión, en un modelo canino de defecto óseo inducido de 21 mm de longitud en el fémur a 20 animales adultos descrito por Arinzhe y col., (2003) aplicaron 37×10^6 de MSC-MO alogénicas sobre la fractura. En otro modelo canino descrito por Jung y col., (2009) aplicaron 10×10^6 de MSC-MO alogénicas sobre una lesión neuronal situada en la médula espinal. Sin embargo, en un caso clínico canino con una no-unión de fémur se aplicaron 1×10^6 MSC-MO autólogas (Semiglia y col., 2011) y existió una buena recuperación del paciente. Por lo tanto, no existe un consenso en cuanto a la cantidad de MSC que deben ser aplicadas.

Los reportes del uso de MSC en patologías de osteonecrosis con curso crónico es escaso y lo descrito es sobre patologías diferentes a la estudiada en este trabajo. La aplicación de MSC en la osteonecrosis de mandíbula como tratamiento en un modelo animal, fueron aplicadas MSC-MO alogénicas de forma sistémica (I/V) y como resultado se detuvo el proceso de osteonecrosis. Estos buenos resultados se atribuyen a que las células utilizadas poseen las características de inmunomodulación, angiogénesis y

osteoprogenitoras. (Handschel y Meyer 2011; Kikuri y col., 2010). No es comparable con la terapia realizada en el presente estudio debido a que las células fueron aplicadas de forma percutánea y la patología era causada por un proceso infeccioso, pero igual se obtuvieron buenos resultados con retorno a la utilización del miembro afectado. Otra patología ósea crónica fue tratada con éxito con MSC-MO sobre osteonecrosis de la cabeza del fémur en humanos (Gangji y col., 2011; Zhao y col., 2012). Por lo descrito por Zhao y col., (2012) fueron aplicadas 2×10^6 MSC-MO autólogas localmente sobre el sitio necrosado (cabeza de fémur), coincide con la metodología empleada en el presente trabajo. En estos estudios los resultados obtenidos fueron reducción en los síntomas, reversión de la osteonecrosis y además de ser segura la aplicación de MSC. Estos tratamientos coinciden con los resultados de la aplicación de MSC-TA alogénicas sobre la no-uni6n, donde hubo una evoluci6n cl6nica positiva del paciente y reversi6n de la necrosis 6sea. A pesar de las diferencias de tratamiento en cuanto a la aplicaci6n, cantidad de c6lulas y el tipo de patolog6as de osteonecrosis tratadas, existe un punto de convergencia entre las hip6tesis de los distintos trabajos planteados donde el efecto de las MSC promueve la recuperaci6n del paciente y lo comprueban con sus resultados cl6nicos y radiol6gicos. Esto coincide con la hip6tesis y resultados del presente trabajo que existi6 una recuperaci6n del paciente favorable.

No existi6 evidencia de rechazo (no hubo respuesta inflamatoria local o sist6mica) en el paciente tratado con aloinjertos de MSC-TA, en un per6odo de 16 semanas post-tratamiento (figura 3 y 4). Coincidiendo con los resultados de diversos autores que utilizaron implantes de MSC alog6nicos en caninos (Arinzeh y col., 2003; Jung y col., 2009). Por lo tanto, la aplicaci6n de c6lulas alog6nicas es segura como terapia regenerativa en caninos.

Existi6 una evoluci6n positiva del paciente con evidencias radiol6gicas, si comparamos las im6genes correspondientes a la semana 0 (figura 4 A y E) a las de la semana 16 post-tratamiento (figura 4 D y H), donde existe un retorno del proceso regenerativo 6seo. En estudios similares los resultados significativos se ven entre las semanas 8 y 16 post-tratamiento, en fracturas tratadas con MSC asociadas a un andamio de cer6mica que tiene propiedades osteoconductoras (su composici6n es en su mayor6a de calcio) (Arinzhe y col.,

2003; Bruder y col., 1998). A diferencia, en el presente estudio no se utilizó andamio en el sitio de no-uni3n, la raz3n fue porque en el paciente existía un proceso patol3gico cr3nico y seguramente la brecha de la fractura estaba ocupada por el callo fibroso o fibrocartilaginoso que no se detecta en la radiografía hasta que comience su mineralizaci3n.

Para el tratamiento fueron utilizadas MSC alogénicas provenientes del Banco de Células Madre. La gran ventaja que existe comparándolo con el uso de MSC autólogas, es la mayor velocidad en instaurar la terapia celular y como consecuencia una recuperaci3n más rápida del paciente, además de que es seguro su uso al no existir rechazo (Martinello y col., 2011).

Conclusiones

La utilizaci3n de MSC-TA alogénicas son seguras en caninos porque no existi3o rechazo a los repetidos aloimplantes. La terapia celular sobre la no-uni3n contribuy3 notablemente a la mejoría del paciente, que volvi3 a utilizar el miembro afectado. No se puede asegurar que el implante de MSC alogénicas fue determinante en la recuperaci3n del presente caso clínico, debido a la ausencia de controles.

Nuevas investigaciones deben ser llevadas a cabo para evidenciar la participaci3n de MSC en la regeneraci3n ósea en casos de osteomielitis.

10. Referencias bibliográficas

- 1) Abarrategui A. (2008). Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhbmp-2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo. Doctor en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid, España.
- 2) Arinze 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 Am* 85:1927-1935.
- 3) Backmeyer C, Lionnet F, Gibeault M, Damsin JP. (2008). Chronic multifocal osteomyelitis due to *Clostridium difficile* in an adolescent with sickle cell anemia. *Pediatr Infect Dis J* 27:951-952.
- 4) Bi Y, Ehrchiou D, Kilts T, Inkson C, Embree M, Sonoyama W, Li L, Leet, A, Seo B, Zhang L, Shi S, Young M. (2007). Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine* 13:1219-1227.
- 5) Boskey AL. (2006). Tejido conectivo del sistema musculoesquelético. En: Slatter D. *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales* 3. ed. Buenos Aires, Inter-Médica pp.2031-2043.
- 6) Brady R, Leid J, Costerton J, Shirliff M. (2006). Osteomyelitis: Clinical Overview and Mechanisms of Infection Persistence. 3a. 28:66-72.
- 7) Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80:985-996.
- 8) Budenki LJ, Smith MM. (2006) 3a. Infecciones ortopédicas. En: Slatter D. *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales* 3. ed. Buenos Aires, Inter-Médica pp.2130-2145.
- 9) Burwell RG. (1964). Studies in the Transplantation of Bone. VII. The Fresh Composite Homograft-Autograft of Cancellous Bone; an Analysis of Factors Leading to Osteogenesis in Marrow Transplants and in Marrow-Containing Bone Grafts. *J Bone Joint Surg Br* 46:110-140.
- 10) Carek PJ, Dickerson LM, Sack JL. (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am. Fam. Physician* 63:2413-2420.
- 11) Cimolai N. (2011) Chronic multifocal osteomyelitis: Is infectious causation a moot point? *J Infect Public Health* 4:157-168.
- 12) 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.
- 13) Donald K, Nelms MD, Armond S, Goldman MD, Alice A, O'Donnell MD, Marion J, Henry MD. (1968). *Serratia marcescens* osteomyelitis in an infant. *Acta Med Port* 24:449-452.
- 14) 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.
- 15) Elasri MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL, Smelter MS. (2002). Staphylococcus aureus collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone* 30:275-280.
- 16) Enzmann V, Yolcu E, Kaplan HJ, Ildstad ST. (2009). Stem cells as tools in regenerative therapy for retinal degeneration. *Arch Ophthalmol* 127:563-571.
- 17) Frank D, Montskó G, Juricskay I, Borsiczky B, Cseh G, Kocsis B, Nagy T, Nagy ÁK, Kovács GL, Miseta A. (2011). Clindamycin release determined by high performance liquid chromatography from a novel low-cost local drug delivery system: a new potential treatment option for chronic osteomyelitis. *J Chemother* 23:282-284.
- 18) Friedenstien AJ, Piatetzky S, Petrakova KV. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16:381-390.
- 19) Gangji V, De Maertelaer V, Hauzeur J. (2011). Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone* 49:1005-1009.
- 20) Ghorashi Z, Nezami N, Hoseinpour-Feizi H, Ghorashi S, Tabrizi JS. (2011). Arthritis, osteomyelitis, septicemia and meningitis caused by *Klebsiella* in a low-birth-weight newborn: a case report. *J Med Case Rep* 27 (5): 241.
- 21) 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.
- 22) Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 306:330-335.
 - 23) Handschel J, Meyer U. (2011). Infection, vascularization, remodelling - are stem cells the answers for bone diseases of the jaws? *Head Face Med* 7:5.
 - 24) Huggins CB. (1931). The phosphatase activity of transplants of the epithelium of the urinary bladder to the abdominal wall producing heterotopic ossification. *Biochem J* 25:728-732.
 - 25) Hulse D, Hyman B. (2006). *Biología y Biomecánica de las fracturas*. En: Slatter D. *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales* 3a. ed. Buenos Aires, Inter-Médica pp.2044-2052.
 - 26) 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.
 - 27) Isla A, Canut A, Rodríguez-Gascón A, Labora A, Ardanza-Trevijano B, Solinís MA, Pedraz JL. (2005). [Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of antibiotic therapy in dentistry and stomatology]. *Enf Infecc Microbiol Clin* 23:116-21.
 - 28) Isla A, Canut A, Rodríguez-Gascón A, Planells P, Beltrí-Orta P, Salmerón-Escobar JI, Labora A, Pedraz JL. (2008). [Antibiotic therapy in odontogenic infections in children and adolescents: pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis]. *Enf Infecc Microbiol Clin* 26:621-628.
 - 29) 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.
 - 30) Johnson AL. (2009). *Fundamento de la cirugía ortopédica y manejo de las fracturas*. En: Fossum, T., Hedlund, C., Jhonson, A., Schulz, K., Seim, H., Willard, R., Bahr, A., Carroll, G. *Cirugía en pequeños animales*. 3a. ed. Barcelona, Elseiver pp. 930-1014.
 - 31) Jones B, McTaggart S. (2008). Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: From culture to clinic. *Exp Hematol* 36:733–741.
 - 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) Jingushi S, Urabe K, Okazaki K, Hirata G, Sakai A, Ikenoue T, Iwamoto Y. (2002). Intramuscular bone induction by human bone morphogenetic protein-2 with beta-tricalcium phosphate as a carrier: in vivo bone banking for muscle-pedicle autograft. *J. Orthop. Sci.* 7:490-494.
 - 34) Kikuiiri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, Chen C, Chen W, Wang S, Le AD, Shi S. (2010). Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 25:1668-1679.
 - 35) Kisiday JD, Kopesky PW, Evans CH, Grodzinsky AJ, Mcllwraith CW, Frisbie DD. (2008). Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J Orthop Res* 26:322-331.
 - 36) Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, MF. (2006). Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 39:678–683.
 - 37) 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.
 - 38) Lee MJ, Ha YE, Park HY, Lee JH, Lee YJ, Sung KS, Kang CI, Chung DR, Song JH, Peck KR. (2012). Osteomyelitis of a long bone due to *Fusobacterium nucleatum* and *Actinomyces meyeri* in an immunocompetent adult: A case report and literature review. *BMC Infect Dis.* 20:161.
 - 39) Liang G, Yang Y, Oh S, Ong JL, Zheng C, Ran J, Yin G, Zhou D. (2005). Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous beta-tricalcium phosphate in mice. *Biomaterials* 26:4265-4271.
 - 40) 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.
 - 41) 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. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 11: 153-154.

- 42) Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F, Decaminada M, Patruno M. (2011). Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci* 91:18-24.
- 43) Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. (2001) Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 4:292-9.
- 44) Millis DL, Jackson AM. (2006). Uniones demoradas, no uniones y maluniones. En: Slatter D. *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales* 3a. ed. Buenos Aires, Inter-Médica pp.2116-2129.
- 45) Mimeault M, Batra SK. (2008). Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev* 4:27-49.
- 46) Murray SJ, Lieberman JM. (2002). Fusobacterium osteomyelitis in a child with sickle cell disease. *Pediatr Infect Dis J* 21:979-981.
- 47) Niemeyer P, Szalay K, Luginbuhl R, Sudkamp NP, Kasten P. (2010). Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomater* 6:900-908.
- 48) Pääkkönen M, Peltola H. (2011). Simplifying the treatment of acute bacterial bone and joint infections in children. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9:1125-1131.
- 49) 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.
- 50) Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. (2007). Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13:1-10.
- 51) Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vazquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martin-Burriel I. (2011). Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 144:147-154.
- 52) Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76:1208-1213.
- 53) Reyes M, Montero S, Cifuentes J, Zarzar E. (2002). Extraction Technique and Surgical Use of the Plasma Rich in Growth Factors (P.R.G.F.) Update. *Revista Dental de Chile* 93:25-28.
- 54) Schulz K. (2009). Fundamento de la cirugía ortopédica y manejo de las fracturas. En Fossum, T., Hedlund, C., Jhonson, A., Schulz, K., Seim, H., Willard, R., Bahr, A., Carroll, G. *Cirugía en pequeños animales*. 3a. ed. Barcelona, Elseiver pp. 1333-1356.
- 55) Semiglia G, Filomeno A, Zunino J, Yaneselli K, Benavides B, Gordon-Firing R, Maisonnave J. (2011) Use of autologous mesenchymal bone marrow derived cells on a canine non-union femoral fracture (preliminary results). 2ND Annual North American Veterinary Regenerative medicine Association Conference, Kentucky, USA. Disponible en <http://www.navrma.org> fecha de consulta: 12/08/2011.
- 56) Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M. (2009). Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Minerva Cardioangiol* 57:249-267.
- 57) Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132-141.
- 58) Urist MR. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899.
- 59) Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC. (2005). Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 39:363-76.
- 60) Vidailac C, Parra-Ruiz J, Winterfield P, Rybak MJ. (2011). In vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic activity of NXL103 versus clindamycin and linezolid against clinical *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 38:301-306.
- 61) Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani, P. (2009). Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol* 10:29-33.
- 62) Wan C, He Q, Li G. (2006). Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model. *J Orthop Res* 24:610-618.
- 63) Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. (1988). Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9484-9488.

- 64) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534.
- 65) Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. (2004). Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 10:955-964.
- 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. 7mas 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) 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.
- 70) 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.
- 71) Zhang J, Lee BH, Chen C. (2011). Gram-negative neonatal osteomyelitis: two case reports. *Neonatal Netw.* 2:81-7.
- 72) Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, Liu B, Yu X. (2012). Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone* 50 325-330.