



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMA DE GRADOS

**“IMPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES AUTÓLOGAS DERIVADAS DEL
TEJIDO ADIPOSO EN UNA FRACTURA ÓSEA INDUCIDA EN RATAS JU-
VENILES PARA OPTIMIZAR LA CICATRIZACIÓN”**

MARÍA CAROLINA SMOK SOTO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS. MENCIÓN MORFOLOGÍA

Director de tesis: Dra Mariana Rojas Rauco
Profesor patrocinante: Dr Manuel Meruane Naranjo

Santiago – Chile
2014

Dedicado a la memoria de mi madre, Ana María Soto Vidal, quien con todo el amor y esfuerzo logró darme la mejor educación, consiguiendo despertar en mí el gusto y encanto por el camino de la investigación.

RESUMEN

Las células troncales derivadas del tejido adiposo (ASCs) corresponden a un gran avance en lo que respecta a la medicina regenerativa ósea, ya que poseen la habilidad de autorenovación, estimulación paracrina y diferenciación hacia varios tipos de tejidos, incluyendo hueso y cartílago. La hipótesis del presente estudio considera que en fracturas tratadas con ASCs, disminuye el tiempo de regeneración ósea y aumenta la vascularización, teniendo como objetivo evaluar histológicamente la regeneración ósea y vascularización en estas fracturas. Para lograr esto, se utilizaron 24 ratas machos juveniles Sprague Dawley. Los ejemplares se dividieron en dos grupos: Grupo A (tratadas) y grupo B (control). En ambos grupos, las ratas se eutanasiaron a los 11 y 21 días post fractura. Se observó una diferencia estadística significativa en cuanto al número de trabéculas neoformadas y la densidad vascular en el grupo tratado en relación al grupo control, no así en el número de células osteógenas ni resortivas, concluyendo que las ratas tratadas con ASCs presentan un mayor tasa angiogénica y mejor regeneración ósea, ndada principalmente por la capacidad de síntesis de los componentes de la matriz extracelular de estas células, y por la producción de factores angiogénicos y de crecimiento.

ABSTRACT

Stem cells derived from adipose tissue (ASCs) are a breakthrough in relation to bone regenerative medicine, as they have the ability to self-renewal, differentiation and paracrine stimulation to various types of tissues including bone and cartilage. The hypothesis of this study considers that fractures treated with ASCs, reduces time and increases bone regeneration and vascularization, aiming histologically evaluate bone regeneration and vascularization in these fractures. To accomplish this, 24 young male Sprague Dawley rats were used. The specimens were divided into two groups: Group A (treated) and group B (control). In both groups, the rats were euthanized at 11 and 21 days post-fracture. A statistically significant difference was observed in the number of newly formed trabeculae and vascular density in the treated group compared to the control group, but not in the number of osteogenic cells and resorptive, concluding that ASCs treated rats have a higher angiogenic and improved bone regeneration, mainly due to the capability of synthesis of the components of the extracellular matrix of these cells, and by the production of angiogenic and growth factors.

INTRODUCCIÓN

Se denomina célula madre o troncal a una célula indiferenciada capaz de autoreplicarse por largos períodos de tiempo, y diferenciarse en un amplio rango de células especializadas dependiendo del medio que la rodea (citoquinas, factores de crecimiento, etc.) y su consecuente alteración de la expresión génica (Rehman *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2011; Rojas & Meruane, 2012). Existen células troncales embrionarias (ESCs) y adultas ó mesenquimales (MSCs). Se sabe actualmente que las MSCs pueden obtenerse a partir de casi todos los tejidos de un individuo, principalmente de origen mesodérmico, las cuales se encuentran presentes ahí con el fin de mantener y reparar (Young *et al.*, 1995). Sin embargo, con el tiempo se va restringiendo su potencial de diferenciación (Rojas & Meruane, 2012).

Las ESCs no se consideran por razones éticas. Dentro de las células mesenquimales adultas, las más estudiadas son las células obtenidas de la médula ósea (BMSCs), las del cordón umbilical (UCSCs) y las derivadas del tejido adiposo (ASCs) (Mizumo, 2009; Meruane & Rojas, 2010; Shoji *et al.*, 2010; Monaco *et al.*, 2011; Nakanishi *et al.*, 2011; Spencer *et al.*, 2011; Baer & Geiger, 2012; Chung *et al.*, 2012; Gaiba, 2012; Taghi *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Kim & Heo, 2014; Kou *et al.*, 2014; Marędziak *et al.*, 2014).

Dentro de las características funcionales de las MSCs que ayudan a mejorar la cicatrización son: i) su habilidad para migrar al sitio de la lesión (Badiavas *et al.*, 2003), ii) participar en la regeneración del tejido dañado, iii) estimular la proliferación y la angiogénesis (Lu *et al.*, 2008) al producir factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), de crecimiento hepatocítico (HGF) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), especialmente en respuesta a la hipoxia (Rehman *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), y iv) crear un ambiente inmunomodulador y antiinflamatorio al interactuar con un amplio rango de células inmunes (Puissant *et al.*, 2005).

Un hecho importante es el carácter de “inmunoprivilegiadas” de la mayoría de las MSCs, al carecer de HLA II, además tienen la habilidad de suprimir la reacción linfocítica mixta, en consecuencia se las puede injertar en forma alogénica (Puissant *et al.*, 2005; Uccelli *et al.*, 2007).

Las células madres mesenquimáticas derivadas de la médula ósea (BM-MSCs) son un tipo de célula adulta multipotente capaz de diferenciarse en todos los linajes mesodérmicos y son similares a las aisladas en otros órganos. Si bien han sido descritas en las últimas décadas (Bianco *et al.*, 2001), se atribuye a Friedenstein *et al.* (1974) su descubrimiento al describir estas células como precursores de fibroblastos presentes en la médula ósea. Posteriormente su estudio ha demostrado la potencialidad para diferenciarse en líneas celulares adipogénicas, osteogénicas, condrogénicas, miogénicas y neurogénicas *in vitro* (Pittenger *et al.*, 1999). En felinos se han aislado y caracterizado (Martin *et al.*, 2002). El problema que reviste la obtención desde la médula ósea es que es doloroso, requiere con frecuencia anestesia espinal y la concentración de MSCs obtenidas luego del proceso es baja, lo que necesita varios cultivos *in vitro* para obtener un número útil, con el riesgo de contaminación y pérdida (Bruder *et al.*, 1997; Pittenger *et al.*, 1999; Mueller & Glowacki, 2001; Giordano *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Chamberlain *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013)

Otra fuente de células madres es la sangre que fluye por el cordón umbilical. En un ml de sangre del cordón umbilical hay aproximadamente 8.000 progenitores de eritrocitos, entre 13 y 24 mil progenitores mieloides, y entre 1.000 y 10.000 células madres pluripotenciales. Se las considera células madres adultas "jóvenes", dentro de sus ventajas destaca que tienen telómeros más largos, alto potencial de proliferación, reducción del riesgo de contaminación viral y mejor tolerancia al antígeno de histocompatibilidad HLA (Gilmore *et al.*, 2000). En relación a los marcadores de superficie más frecuentes, hay discordancia entre autores. McGuckin *et al.* (2003) incluyen el CD7, CD34, CD38, CD90, y CD133, en cambio Shoji *et al.* (2010) manifiestan que estas células expresan marcadores como CD44, CD49b, CD105 y CD13, y son negativas para marcadores endoteliales como CD34 y CD31 (Rodríguez *et al.*, 2005).

Finalmente las células derivadas del tejido adiposo presentan la menor complejidad para su aislamiento, ya que permite obtener de forma fácil, con mínimo discomfort para el paciente un gran número de células que pueden proliferar en cultivo (Zuk *et al.*, 2001). El tejido adiposo posee la habilidad de cambiar de volumen durante la vida de un individuo, los cambios menores son por hipertrofia celular, pero los cambios mayores están representados por hiperplasia y aumento de la vascularización. Estos cambios están mediados por una población de célu-

las troncales multipotentes con propiedades similares a las obtenidas desde la médula ósea (Fraser *et al.*, 2006).

El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica del embrión, tiene desarrollo pre y post natal, y se forman durante el segundo trimestre de gestación (Ailhaud *et al.*, 1992). Probablemente el progenitor de los adipocitos ha venido desde la médula ósea a través de la circulación (Hausman & Hausman, 2006). Macroscópicamente se distinguen 5 tipos de tejido adiposo: i) de la médula ósea, ii) de la grasa parda, iii) de la grasa blanca, iv) el mamario y v) el de soporte mecánico. El de la médula ósea ocupa el espacio no necesario para la hematopoyesis. El tejido pardo es muy termogénico, rodea órganos mayores en el recién nacido para luego desaparecer en el adulto. El tejido adiposo mamario provee nutrientes y energía durante la lactancia y es regulado por hormonas del embarazo. El tejido adiposo de soporte mecánico se encuentra en la grasa orbitaria y en palma de mano, planta de pies, no presenta mayores cambios ante la influencia hormonal. Por último el tejido adiposo blanco provee energía y aislamiento, es reconocido actualmente como un órgano endocrino que secreta adiponectina, leptina y otras adipokinas con efectos fisiológicos y es el que presenta mayores cambios en volumen a lo largo de la vida (Gimble *et al.*, 2007).

Microscópicamente, las células adiposas contienen un alto índice núcleo/citoplasma, abundante retículo endoplasmático, mitocondrias de localización perinuclear y presencia de vacuolas lipídicas (Gimble *et al.*, 2007). Dentro del tejido adiposo los precursores coexisten en conjunto con células adiposas maduras, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales indiferenciadas y pobremente diferenciadas (Ailhaud *et al.*, 1992).

La utilización de MSCs con fines regenerativos y en enfermedades inmunológicas va en aumento. Gimble *et al.* (2007) sugieren ciertas características que deben poseer las ASCs para hacerlas ideales en su utilización con fines médicos:

1. Pueden ser encontradas en cantidades muy abundantes (millones a billones de células).
2. Pueden ser aisladas con procedimientos mínimamente invasivos.
3. Se pueden diferenciar en múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible.
4. Pueden ser efectivamente transplantadas en forma autóloga o alogénica.
5. Pueden ser manipuladas de acuerdo a las actuales Guías de Buena Práctica.

Diversos estudios, utilizando ya sea BMSCs (Nakagawa *et al.*, 2005; Falanga *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2008), ó ASCs (Nambu *et al.*, 2007; Rigotti *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008) se han realizado tanto en humanos como en animales (Nakagawa *et al.*, 2005; Falanga *et al.*, 2007; Nambu *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008; Yoshikawa *et al.*, 2008).

Las injurias de huesos y cartílagos representan un serio problema en Medicina Veterinaria. Las lesiones degenerativas músculo-esqueléticas se caracterizan por una alta ocurrencia, y afecta tanto a grandes animales como a pequeños (Butt, 2002; Mohammed *et al.*, 2007; Marędziak *et al.*, 2014). Inyecciones con MSCs son ampliamente usados para tratar enfermedades locomotrices, mostrando resultando clínicos positivos (Lu *et al.*, 2002; Marycz *et al.*, 2012a; 2012b; Marędziak *et al.*, 2014). Este enfoque se considera seguro y no invasivo, y afecta directamente el tejido degenerado y sitio de la inflamación (Guest *et al.*, 2008; Tuglu *et al.*, 2010; Marędziak *et al.*, 2014). En equinos, grandes avances se han obtenido gracias a la técnica de las células madres derivadas de células adiposas (ASCs), en el tratamiento de lesiones ortopédicas, tales como desgarros de tendón, fracturas y degeneración de cartílago (Herther, 2001; Litzke *et al.*, 2004). Estos avances se deben a que estos animales tienen mucho valor y se pueden ver gravemente discapacitados con estas lesiones. En un estudio con 100 caballos de carrera de obstáculos, se encontró que casi un 80% de ellos podría volver a las carreras, en comparación con el 30% que lo hacían con las terapias tradicionales. Después de tres años, la tasa de repetición de la lesión era mucho más baja en los animales tratados con células madre (alrededor de un 23%), en comparación con los datos ya publicados y que reflejaban un 56% (Herther, 2001).

Las ASCs producen factores que promueven la regeneración de los tejidos mediante la estimulación de la angiogénesis, y la activación de las células madre residentes de una manera paracrina (Puissant *et al.*, 2005; Del Bue *et al.*, 2008; Marędziak *et al.*, 2014). Además, factores de crecimiento autocrinos solubles secretadas por las MSCs, aumentan su carácter multipotencial y son esenciales para regular la autorrenovación de la población (Zaragosi *et al.*, 2006; Rider *et al.*, 2008; Marędziak *et al.*, 2014). Se ha sugerido que las ASCs (y las MSCs en general), son una subpoblación de los pericitos (ó células madres precursoras vasculares) en diversas etapas de diferenciación situadas en la pared que rodea los vasos sanguíneos (Lin *et al.*, 2008; Baer & Geiger, 2012).

Los adelantos en estudios con ASCs en lesiones ortopédicas, son mayores en animales domésticos, tales como equinos (Herther, 2001; Litzke *et al.*, 2004), y caninos (Black *et al.*, 2007), debido a que la medicina veterinaria posee regulaciones menos severas a la hora de tratar a los animales con terapias experimentales. Con una sola inyección de células adiposas, algunos perros con claudicación muestran una mejoría durante varios meses a más de un año (Black *et al.*, 2007). Aunque las células madre embrionarias poseen mayor potencialidad de diferenciación, tienen algunas desventajas asociadas porque proceden de otro animal, por lo tanto se consideran material extraño y el cuerpo puede rechazarlas. Las células madre adultas, en cambio, tienen la ventaja de que son fáciles de obtener, y como vienen del mismo animal, no hay ninguna posibilidad de rechazo.

Mediante el uso de (ASCs) no es necesario realizar un cultivo tradicional, que generalmente toma una semana o más. Se puede utilizar directamente la fracción vascular estromal del centrifugado, la cual contiene al menos un 35% de ASCs, o se pueden sembrar estas células en un medio de transporte adherente obteniendo un aislamiento selectivo. Esto significa que una vez que el tejido adiposo se obtiene del paciente, el tiempo para poder tratarlo con sus propias células es 48 horas (Meruane & Rojas, 2010). Las células madre pueden aliviar la osteoartritis liberando factores tróficos, que estimulan las células de toda el área. También tienen propiedades anti-inflamatorias y pueden diferenciarse en otra célula para estimular la reparación de tejidos dañados (Black *et al.*, 2007).

El proceso que está involucrado con el uso de estas células para tratar la artritis en los perros es relativamente simple. El primer paso es la recolección de las células adiposas, este es un procedimiento quirúrgico estéril que requiere que el perro sea anestesiado. Las células adiposas se obtienen de la región inguinal, la región torácica, o la grasa falciforme, que es intra-abdominal. Se requiere sólo 15 gr de tejido adiposo. Luego se procesa el tejido en medios de cultivo en una incubadora y 48 horas después puede ser inyectado en las articulaciones afectadas. La inyección de las células se puede hacer con sólo sedación. Aunque las células se pueden inyectar en el torrente sanguíneo y tendrá un efecto en las articulaciones artríticas, se ha encontrado que es más eficaz si se inyecta directamente en las articulaciones afectadas. Los resultados toman alrededor de un mes para manifestarse plenamente y pueden durar varios meses a más de un año en algunos pacientes (Black *et al.*, 2007). Una serie de estudios en animales (Kon *et al.*, 2000; Herthel *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003; Black *et al.*,

2007) han demostrado que estas terapias con células madre son efectivas, permitiendo que cada vez más animales vuelvan a correr, reduciendo las tasas de repetición de lesiones, y acortando los tiempos de curación.

La regeneración ósea es la respuesta generada con el fin conseguir la restitución del tejido tras un trauma. Por otro lado, en la reparación el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original (Córdova, 2010). Según Davies & Hosseini (2000), el hueso, además del tejido embrionario, es el único tejido del organismo que presenta la capacidad de completa restitución tras una lesión. La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Tras un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina (Córdova, 2010). Las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, provocando la invasión al sitio de la lesión de células precursoras de osteoclastos, linfocitos, macrófagos y células mesenquimales multipotenciales (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil *et al.*, 2006), para formar nuevos vasos sanguíneos, fibroblastos, y otras células de soporte que forman tejido de granulación entre los bordes de la fractura. Junto con esto, macrófagos y otras células derivadas de este tejido actúan para remover el hematoma inicial. Luego los osteoclastos comienzan a reabsorber los bordes del hueso que se encuentran dañados y necróticos, y las células osteoprogenitoras de periostio proliferan (McKibbin, 1978; Frost, 1989; Einhorn, 1998; Day *et al.*, 2000). Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. En este proceso va a ser fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil *et al.*, 2006).

Dado que el aspecto histológico de la reparación del hueso es semejante al desarrollo en las distintas fases del tejido cartilaginoso y de un hueso normal, formándose en primera instancia hueso no laminillar debido a la velocidad de regeneración, que impide la deposición ordenada de las fibrillas de colágeno propias del hueso laminillar (Currey, 2003; Weatherholt *et al.*, 2013). Además de la semejanza de formación, la participación molecular también lo es, probablemente igual (Einhorn, 1998; Barnes *et al.*, 1999). Esta similitud ha sido descrita en varios reportes (Vortkamp *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 1999; Gerstenfeld *et al.*, 2003).

Dentro de las proteínas estructurales podemos mencionar el colágeno tipo I para el hueso, y colágeno tipo II y X en cartílago; y dentro de las moléculas reguladores de quimiotaxis, mitosis y diferenciación se encuentra wnt, Indian hedgehog (ihh), genes que responden a hedgehog tales como Gli 1 y patched (Otc), también las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP2, BMP3, BMP4 y BMP7), Smads 1-8, el factor de transcripción core binding factor 1, también llamado Runx2 (cbfa1) que estimula la diferenciación de los osteoblastos, FGF1, FGF2, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF β , MMPs, y VEGF. Al comienzo del ciclo de reparación, las células inflamatorias secretan citocinas, entre las cuales se encuentran IL-1, IL-2, RANKL y TNF (Shapiro, 2008). Actualmente se sabe que la diferenciación desde las MSCs hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog (Ihh y Shh) (Yamaguchi *et al.*, 2000; Aubin, 2000), al factor de transcripción Cbfa1 (Heersche, 2002), cuyo máximo nivel se alcanza en las células osteógenas, y a las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), siendo estos últimos los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales multipotenciales (Yamaguchi *et al.*, 2000).

El presente estudio, evaluará la diferenciación celular de células multipotenciales obtenidas a partir de tejido adiposo hacia células osteógenas, junto con la regeneración de tejido óseo posterior a una fractura inducida.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El tiempo de regeneración ósea es menor y la vascularización es mayor en las fracturas tratadas con ASCs versus fracturas no tratadas con ASCs.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar histológicamente la regeneración ósea y vascularización en una fractura tratada con ASC autólogas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Desarrollar la técnica de obtención de ASCs en ratas
- 2.- Reconocer el tejido osteoide nuevo que se ha formado después de la transferencia de células adiposas mediante técnicas histoquímicas, y comparar el número de células osteoprogenitoras, osteoblastos y osteoclastos, mediante el método disector.
- 3.- Cualificar la neoformación de vasos sanguíneos en el área tratada utilizando marcadores moleculares, y cuantificar en ambos grupos la densidad por área de ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 24 ratas machos juveniles Sprague Dawley, clínicamente sanos, con un peso promedio de 270 gramos, obtenidos en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los ejemplares se dividieron en dos grupos: Grupo A y grupo B (control). En ambos grupos 6 ratas se eutanasiaron a los 11 días luego de la fractura inducida mediante intervención quirúrgica; y 6 a los 21 días después de la intervención quirúrgica (Tabla I). A cada rata se le induce una fractura ósea completa en el fémur izquierdo y posteriormente se le agrega 0,2 ml de medio de cultivo más ASCs autólogas (grupo A), y sin ASCs (grupo B). Todo el procedimiento es realizado según las normas bioéticas del ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, para la experimentación con animales de laboratorio (protocolo CBA #420 FMUCH, Mayo 2011).

	Grupo A (con ASC's)	Grupo B (control)
11 días	6	6
21 días	6	6

Tabla I: Representación y distribución de los animales en el diseño del estudio.

El procedimiento a seguir se divide en las siguientes fases:

Fase 1 prequirúrgica

En esta fase se obtuvo el tejido adiposo de cada rata. La antisepsia cutánea se realizó con solución de clorhexidina al 2%. Se suministró preoperatoriamente penicilina benzatina 40.000 U/kg IM (Penicilina G benzatina, Laboratorio Chile). La anestesia se administró en forma intraperitoneal y consiste en una solución compuesta de Ketamina 80 mg/kg (Ketamina 50, Holliday – Scott S.A.) y Xilacina 8 mg/kg (Xilazina 2%, Centrovét), permitiendo un tiempo de anestesia profunda entre 30 a 45 min. Se realizó una incisión de 2 cm con bisturí hoja N° 15 en la región inguinal derecha disecando el panículo adiposo subcutáneo, obteniendo una pieza con un peso promedio de 1,42 grs, la cual se corta en múltiples fragmentos. Se realiza hemostasia, y se sutura la incisión en 1 plano con seda 4.0 (Fig. 1).

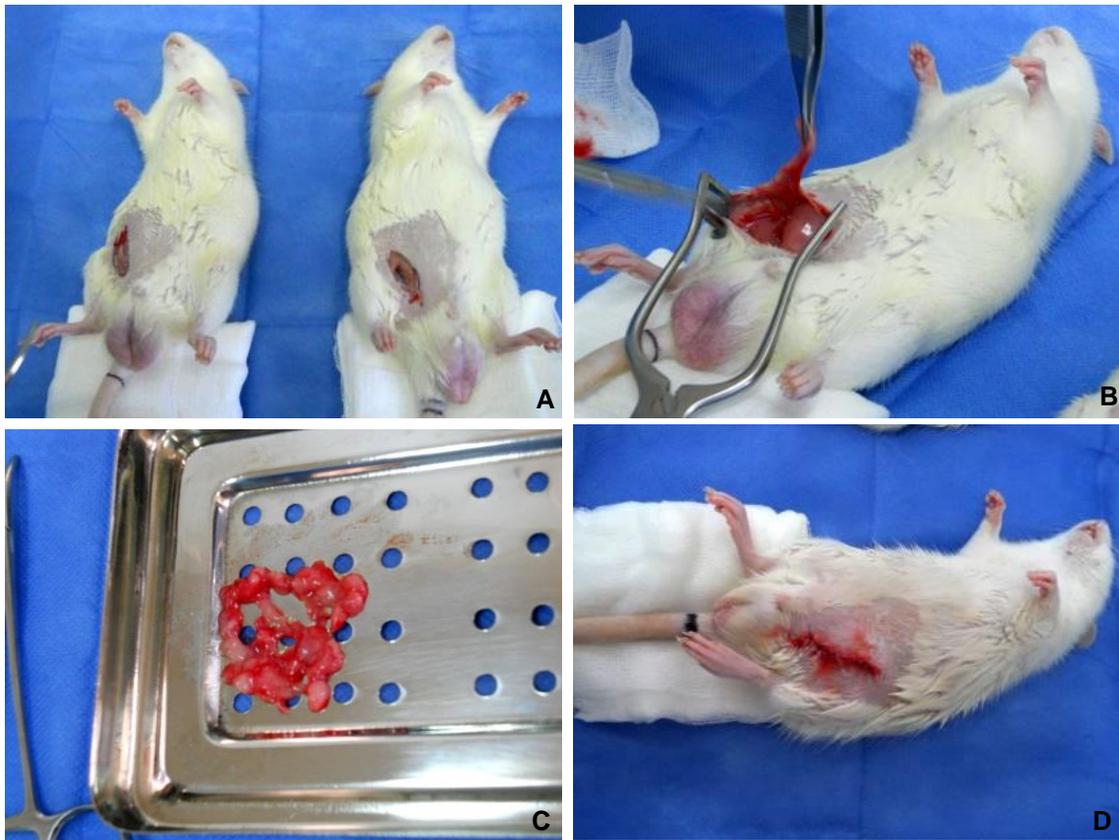


Figura 1: Obtención de tejido adiposo. (A) disección en la región inguinal; (B) extracción del panículo adiposo; (C) fragmentación de la muestra; (D) sutura de la herida.

Fase 2 laboratorio

La técnica empleada para la extracción de ASCs fue la descrita por Meruane & Rojas, (2010) (Fig. 2). El tejido adiposo fraccionado se lavó con solución buffer-fosfato 1x (PBS) y se procedió a la digestión de la matriz extracelular con 0,075% de colagenasa II a 37°C durante 1 hr. Posteriormente, para neutralizar e inactivar la enzima, se agregó un volumen equivalente de medio de cultivo, constituido por Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco®) con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibióticos. Las muestras se centrifugaron a 1200 g por 10 minutos, obteniéndose un precipitado de alta densidad. El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo.



Figura2: Obtención de ASC's. (A) digestión con colagenasa; (B) inactivación de la enzima; (C) pellet obtenido

La solución obtenida del pellet resuspendido fue sembrada en una placa de cultivo celular de 100 x 20 mm. Las placas son mantenidas en incubadora por 48 hrs a 37°C y 5% CO₂. A las 48 hrs. se pudo observar la adherencia de la ASCs a la superficie del plástico (Fig. 3). Con el fin de pasar al segundo pasaje, se procedió a la tripsinización de la muestra a 37°C por 5 minutos, luego se neutralizó, centrifugó y resuspendió dentro de una nueva placa, manteniéndose en condiciones de cultivo por 72 hrs.

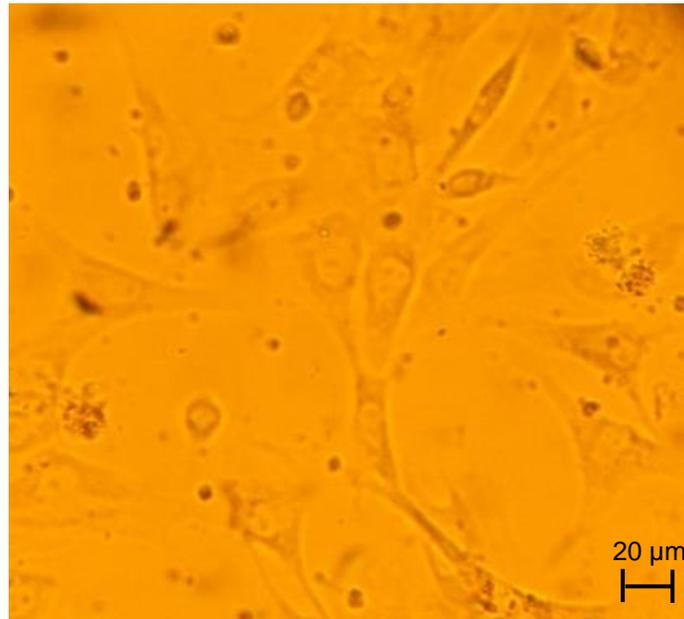


Figura 3. Células con prolongaciones citoplasmáticas adheridas al plástico luego del primer pasaje. 400X

Fase 3 quirúrgico

Finalizadas las 72 hrs. de incubación, se procedió a la tripsinización, neutralización y centrifugación de la muestra, obteniéndose un pellet (Fig.4) que fue resuspendido en 0,2 ml de medio de cultivo, conservándose en la incubadora mientras se realiza la cirugía.

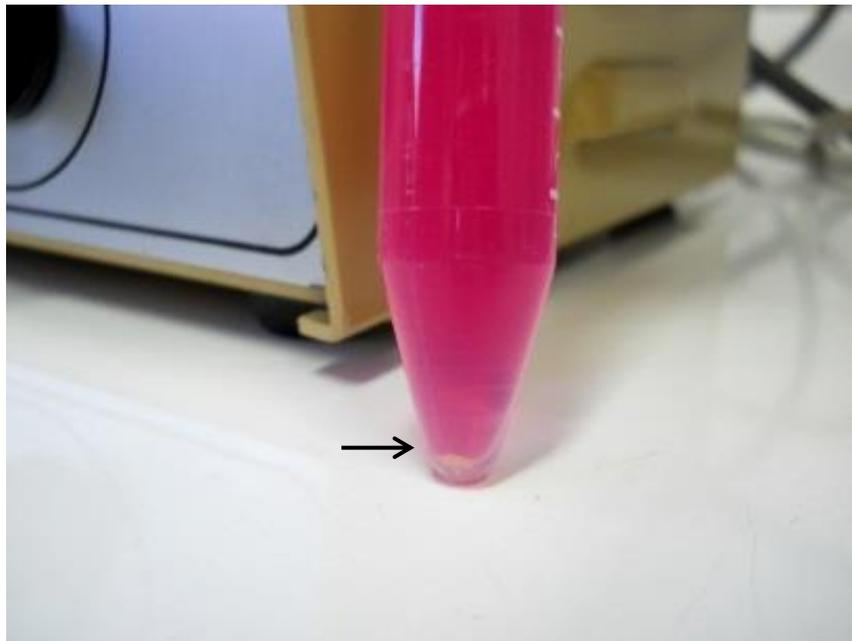


Figura 4. Pellet de ASC´s en el fondo del tubo (flecha)

Utilizando la misma técnica anestésica, se realizó la incisión en la región medial del muslo izquierdo para lograr una fractura completa a nivel de la diáfisis del fémur. Este proceso se efectuó mediante el uso de una gubia quirúrgica. Para acceder a este nivel, se procedió a realizar una disección de los músculos ubicados a nivel medial, hasta la visualización de la protuberancia del fémur, bajo el cual se realizó la fractura (Fig. 5). En este punto se implantó el medio de cultivo más ASC´s autólogas en las ratas del grupo A, y 0,2 ml de medio de cultivo sin células a las ratas del grupo B. Como medio de fijación y estabilización de la fractura, se utilizó (a modo de clavo medular) una aguja 25G estéril.



Figura 5: Procedimiento quirúrgico para el implante de ASC's. (A) zona de la incisión; (B) visualización del fémur; (C) introducción clavo medular

Fase 4 postoperatorio

Una vez realizado cada procedimiento quirúrgico, el animal fue puesto en una caja de cartón (durante 1 hr) antes de ser transportado a su jaula, verificando la frecuencia respiratoria y manteniendo especial preocupación por conservar su temperatura corporal, para lo cual se utilizó una lámpara de luz incandescente. Luego de ingresar a la jaula, cada rata se mantuvo con alimentación y agua *ad libitum*. Se suministró Metamizol Sódico (Dipirona, Laboratorio Chile) como analgesia intramuscular, en una dosis de 25 mg/kg.

Fase 5 Eutanasia y obtención del fémur con fractura.

La eutanasia se realizó con Tiopental Sódico (Tiopental sódico 1G, Richmond, División Veterinaria S.A.) vía intraperitoneal, en dosis de 90 mg/kg de peso corporal. Una vez comprobada la ausencia de signos vitales, se procedió a disecar la musculatura asociada al fémur, el cual fue fijado en formalina 10% tamponada para su posterior estudio histológico.

Fase 6 Técnica histológica

Las muestras fueron fijadas durante 2 hrs a temperatura ambiente y 22 hrs a 4 grados Celsius. Luego se procedió a: i) descalcificación con Ácido Nítrico 3% por 24 hrs, ii) Lavado en agua corriente por 2 hrs, iii) Deshidratación en batería de 3 alcoholes ascendentes hasta 95 grados 1 hora c/u y iv) batería de 3 xiloles por 1 h c/u. Las muestras fueron incluidas en parafina y cortadas sagitalmente a 5 micrones de espesor en forma seriada con un micrótomo (MICROM HM315). Los cortes fueron adheridos a los portaobjetos silanizados con kit de montaje (Protex®) sobre un baño de agua (Baño de parafina 1052, GFL). Estos cortes se

procesaron con técnicas histológicas: Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Mallory, y Tricómico de Masson; con técnicas histoquímicas Picrosirius de Junqueira; y con técnicas de inmunohistoquímicas utilizando el anticuerpo anti-factor VIII (Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor, Dako).

Las técnicas Tricrómicas sirven para una evaluación general de las trabéculas óseas, al ser un procedimiento para la tinción de fibras colágenas tipo I. Estos elementos poseen afinidad por los colorantes ácidos debido a su riqueza en grupos fuertemente catiónicos dependientes de los aminoácidos que componen la cadena polipeptídica. Las estructuras débilmente acidófilas se ven de color rojo o naranja y las fuertemente acidófilas como las fibras de colágeno se observan de color azul a verde.

La tinción rojo sirio de Junqueira sirve para evaluar la composición de las fibras colágenas en el tejido. Identifica de color rojo-amarillo las fibras de colágeno tipo I (colágeno maduro) y verdes las fibras de colágeno tipo III, a través del empleo de luz polarizada (Montes & Junqueira, 1991).

El anticuerpo anti-factor VIII se une al Factor de Von Willebrand (VWF) presente en el plasma sanguíneo. Este factor corresponde a una glicoproteína plasmática sintetizada por las células endoteliales y megacariocitos (Jaffe *et al.*, 1974; Sporn *et al.*, 1985; Tsai, 1996; Mendolicchio & Ruggeri, 2005; Franchini *et al.*, 2013), y se expresa en plaquetas, células endoteliales y componentes del subendotelio como el colágeno y glicosaminoglicanos heparin-like (Ruggeri & Zimmerman, 1987; Franchini & Lippi, 2007; Franchini *et al.*, 2013).

Fase 7 Estudio microscópico de la muestra (mm²).

El análisis mesoscópico y el microscópico se realizó en el Laboratorio de Embriología Comparada, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Se utilizó un microscopio óptico (Carl Zeiss) con cámara incorporada (Canon Power Shot A640). El análisis de las imágenes, la cuantificación de las células encargadas de la remodelación ósea (Fig. 6a), de las trabéculas óseas (Fig. 6b) y la densidad vascular (Fig. 6c), se efectuó con el programa informático para morfometría (STEPanizer final version 1, subver 0.22), utilizando el método disector. Para lograr una mayor agudez y precisión con los resultados de las muestras obtenidas, Mandarim-de-Lacerda (2003), establece 3 factores: adecuado tamaño de la muestra, aleatorización y un tejido isotrópico. Gundersen (1977),

demonstró la sobreestimación causada por el edge effect, para lo cual se consideró una zona prohibida constituida por las líneas que limitan el cuadro. Las estructuras que entran en contacto con la zona prohibida, no serán consideradas en el conteo de las células.

Para contar las células y las trabéculas se tomaron imágenes con un aumento de 400X. En este caso se utilizó el sistema de prueba con líneas cuadriculadas, y se consideraron todas las células y neotrabéculas que se ubican dentro de los 9 cuadrantes centrales. En cambio para medir la densidad vascular, el aumento de las imágenes fue de 100X, y se usó un sistema de prueba con líneas pares. En este caso se considera dos veces el número de intersecciones de los vasos sanguíneos con estas líneas, dividido por la longitud total de las líneas, expresando sus resultados en μm^{-1} .

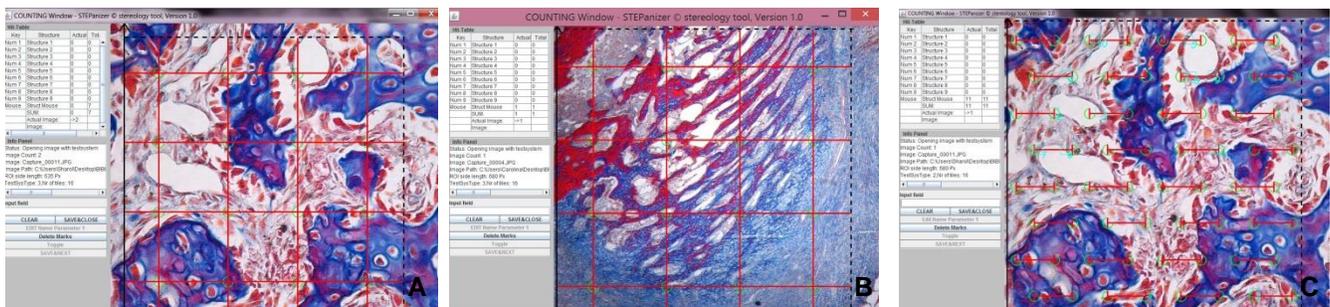


Figura 6. Programa STEPanizer para la cuantificación de células. A) Cuantificación de células encargadas de la remodelación ósea; B) Cuantificación de neotrabéculas ; C)Cuantificación de neovasos sanguíneos.

Se compararon las muestras seriadas correspondientes a los días 11 y 21 días. Cualitativamente, se evaluó la presencia de tejido óseo en neoformación, reconociendo el tejido osteoide nuevo que se ha formado después de la transferencia de células adiposas, y su posterior calcificación. Este procedimiento se realizó mediante el reconocimiento de elementos de la morfología ósea de la remodelación normal: i) células: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos; y ii) matriz: ósea madura, osteoídea y fibrilar.

En estas muestras se identificaron los siguientes parámetros: 1) Neoformación de trabéculas, 2) Caracterización de las trabéculas neoformadas “*in situ*”, 3) Características tintoriales de las trabéculas, 4) Presencia y características de las células osteoprogenitoras y de los osteoblastos (una o dos hileras), 5) Formación de lagunas óseas en los osteocitos, 7) Número de osteoclastos por campo, 8) Aparición de conductos de Havers y laminillas óseas, y 9) Formación de neovasos sanguíneos.

Fase 8 Estudio estadístico

Los resultados se expresan en promedios más desviación estandar. Se utilizó la prueba de t-student para muestras pareadas con el objeto de determinar diferencias estadísticas significativas. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1.-Desarrollar la técnica de obtención de ASCs en ratas

La técnica de extracción de tejido adiposo en ratas resultó en un 100%. El protocolo de bioética se efectuó con rigurosidad. Todas las ratas sobrevivieron en buenas condiciones de salud. Macroscópicamente no se observaron signos de infección ni inflamación excesiva en los sitios de intervención quirúrgica. Los ejemplares caminaron adecuadamente, no hubo baja de peso ni signos de deshidratación, y el pelaje no sufrió modificación alguna.

En el primer pasaje del cultivo, a los 2 días de su extracción, se observó la adhesión de las células al plástico. Su morfología variaba entre células poliédricas, y células con prolongaciones citoplasmáticas (Fig. 3). Para determinar la densidad de estas células, se utilizó la técnica de contaje celular a través de una cámara de Neubauer, obteniendo un promedio de $4,77 \times 10^5$ células/ml (Fig. 7a). Luego del segundo pasaje, a través de un microscopio invertido (Primo Vert, Carl Zeiss), las células adheridas mostraron una morfología similar a fibroblastos y células mesenquimáticas, presentando múltiples prolongaciones celulares. Además se evidencia la presencia de varias gotas lipídicas en su interior (Fig. 7b).

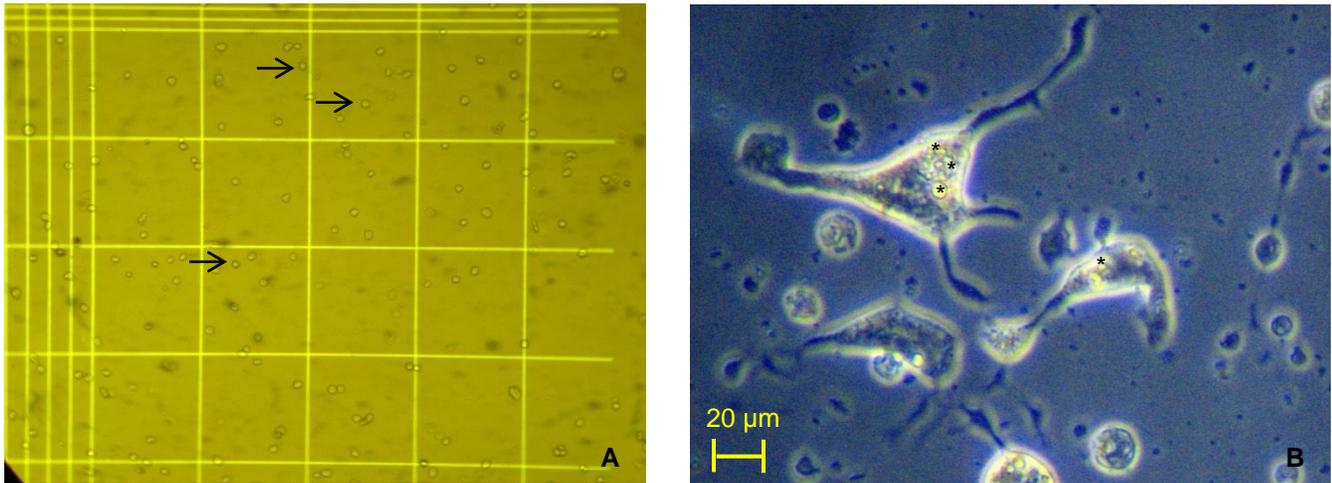


Figura 7: Células obtenidas del cultivo celular. A: Se observan células (flechas) dentro de los cuadrantes de una Cámara de Neubauer para su cuantificación, 40X; B: Células con múltiples prolongaciones celulares y gotas lipídicas en su interior (*), microscopio invertido, 400X.

2.- Reconocer el tejido osteoide nuevo que se ha formado después de la transferencia de células adiposas mediante técnicas histoquímicas, y comparar el número de células osteoprogenitoras, osteoblastos y osteoclastos mediante el método disector

Macro y mesoscópicamente, luego de la eutanasia, se evidenció la presencia del callo óseo regenerativo en el 100% de los fémures extraídos. El hematoma propio de la inflamación, a los 11 días se evidenció en los individuos de ambos grupos, mientras que a los 21 días en el grupo tratado había sido reemplazado casi en su totalidad por tejido de granulación, no así en el grupo control. Las diferencias entre grupos se encuentran resumidas en la Tabla II.

Característica morfológica	Tto ASCs		Control	
	11 días	21 días	11 días	21 días
Hematoma	++	+	+++	++
Cavidades con médula ósea	+++	+++	+++	+++
Fibrocartílago	+++	+++	+++	+++
Células migratorias fusiforme	+++	+++	++	++
Células migratorias estrelladas	+++	+++	---	---

Tabla II: Diferencias morfológicas entre los grupos tratados y control, a los 11 y 21 días.

Microscópicamente, el callo se encuentra constituido principalmente por tejido fibroso, muy vascularizado, y con gran cantidad de células con aspecto fusiforme y núcleo alargado en el sitio de la fractura. Éste se forma a partir del periostio, o directamente desde el hueso preformado, a un extremo del borde la fractura, desde el cual emergen columnas cartilagosas. En un inicio se conforma como callo blando, con variables focos de tejido cartilaginoso, el cual se distribuye en placas que se generan sin establecer un patrón espacial dentro del callo, para luego ser reemplazado por trabéculas óseas, sin embargo, al final del estudio aún no alcanza el desarrollo completo de un callo óseo (Fig. 8).

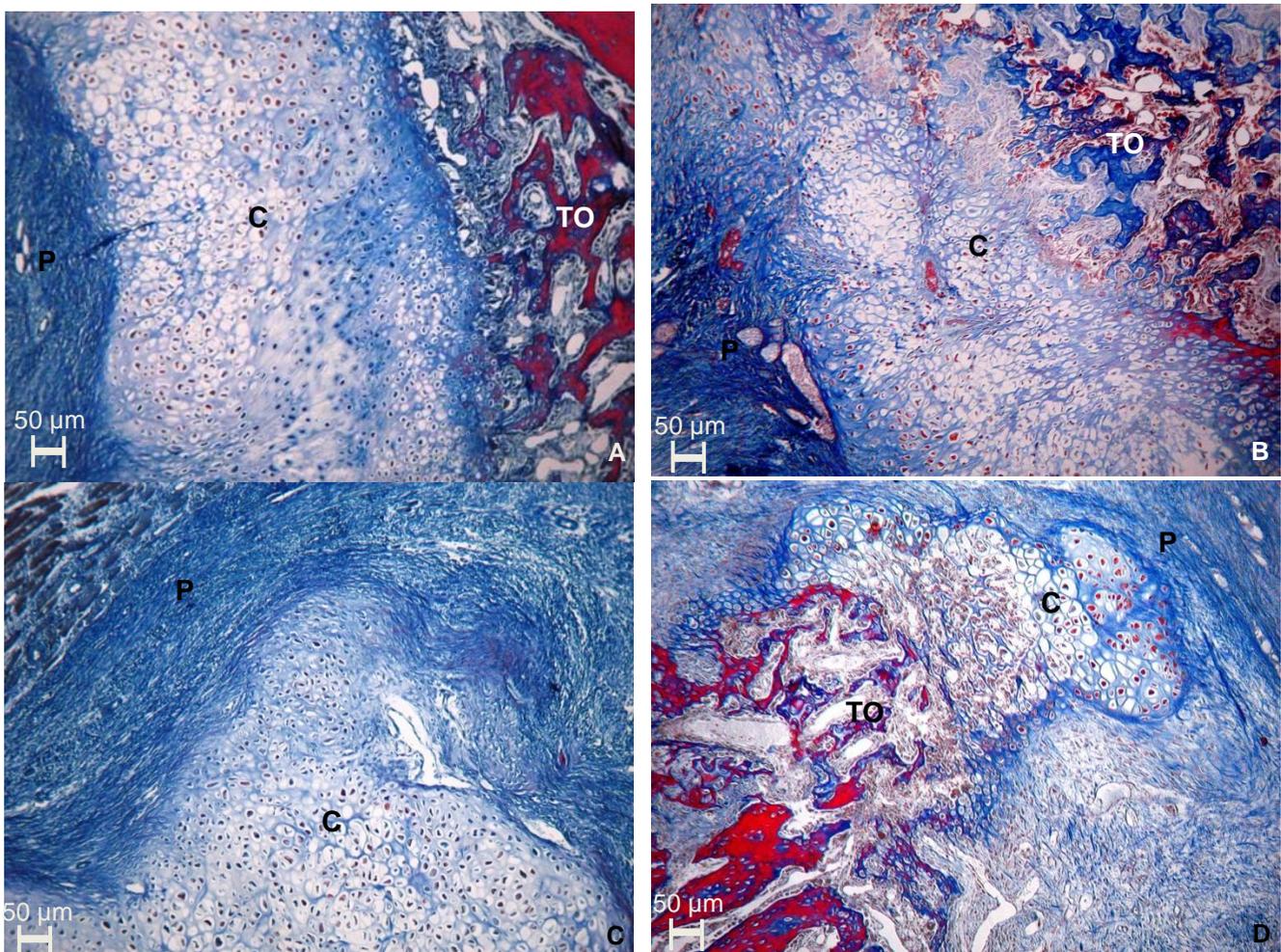


Figura 8: Callo perióstico. Se observa la presencia de pericondrio (P), y tejido cartilaginoso (C). En A, B y D se evidencia osificación endocondral y formación de trabéculas óseas (TO). A) Grupo tratado 11 días; B) Grupo tratado 21 días; C) Grupo control 11 días; D) Grupo control 21 días. Técnica Tricrómico de Mallory, 100X.

En las ratas de ambos grupos eutanasiadas a los 11 días, se evidencia un callo perióstico blando de composición heterógena, con cartílago fibroso y tejido óseo. Entre las placas cartilagosas hay tejido conectivo y de granulación. No se observa presencia de callo dentro de

la cavidad medular. Las trabéculas óseas se observan tanto al interior como al exterior del punto de fractura.

Los focos de neocartílago se encuentran rodeados de un pericondrio, que comprende dos capas: una interna con presencia de condroblastos, y una externa de tejido conectivo denso y células fusiformes. Las células que dan origen a la matriz cartilaginosa son los condrocitos, células condrógenas y fibroblastos, estos últimos ya se encuentran dentro de lagunas. Dentro de estas placas cartilaginosas, se observan diferentes grados de maduración en los condrocitos: reposo, hiperplasia, hipertrofia y en apoptosis. Estas células presentan un núcleo bien definido que contiene el ADN en forma de eucromatina o heterocromatina. Además presentan uno o dos nucléolos prominentes. El orden celular necesario para la osteogénesis no siempre se evidenció, mostrando una morfología desuniforme (Fig. 9).

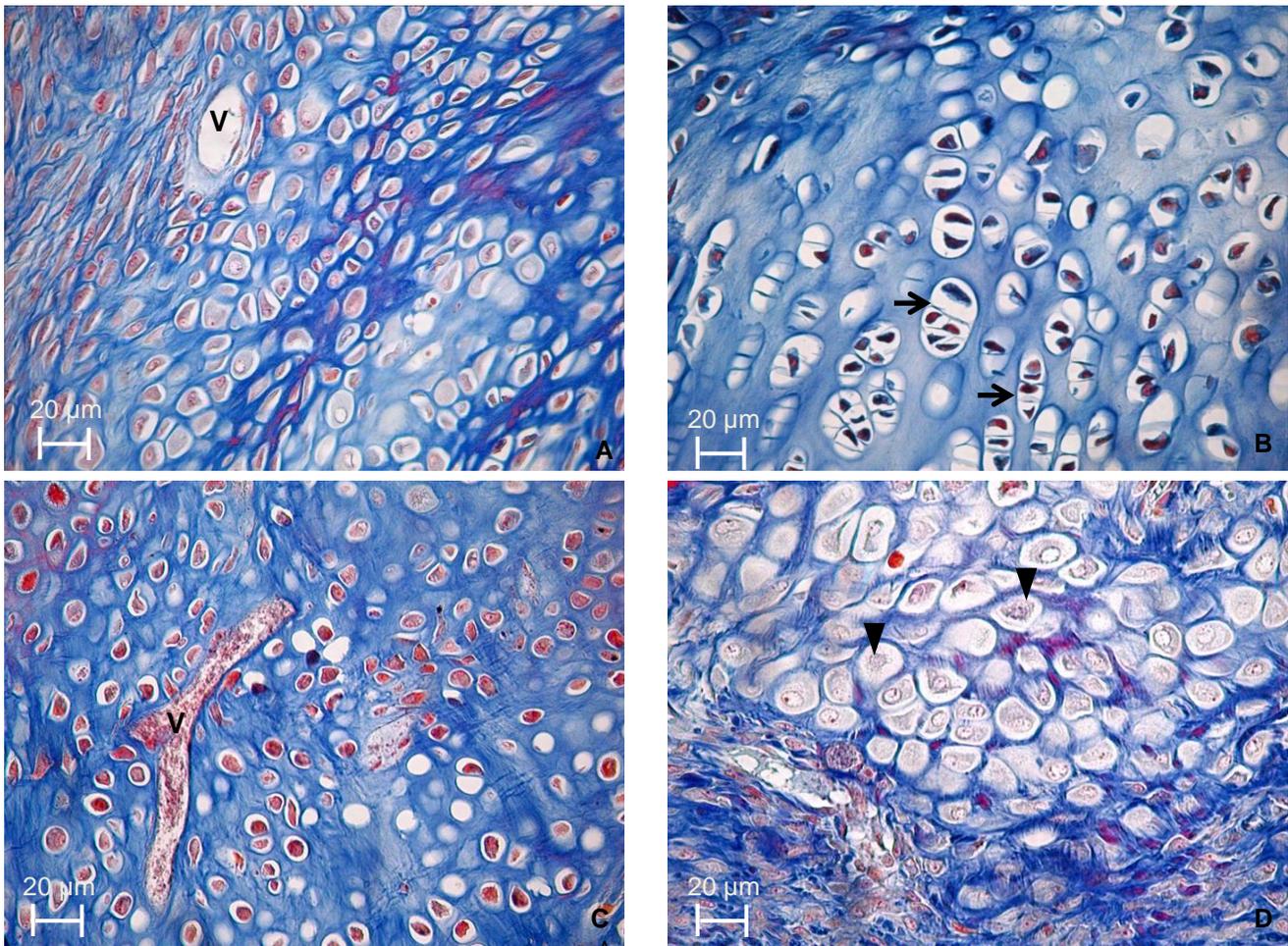


Figura 9: Foco de neocartílago dentro de un callo. En A y C se observa la presencia de un vaso sanguíneo (V). nótese la presencia de condrocitos hiperplásicos en B (flecha), e hipertrofiads en D (punta de flecha). A) Grupo tratado 11 días; B) Grupo tratado 21 días; C) Grupo control 11 días; D) Grupo control 21 días. Técnica Tricrómico de Mallory, 400X.

En algunos ejemplares de ambos grupos eutanasiados a los 11 días, se observa un centro fibroso dentro del foco cartilaginoso, dándole un aspecto no homogéneo a la matriz que rodea las células debido a las fibras presentes. Este tejido se ve invadido por células migratorias y por vasos sanguíneos, los cuales provienen del periostio y ya están presentes en los individuos de ambos grupos eutanasiados a los 11 días.

El tejido óseo que se forma inicialmente es de tipo no laminillar. Se observó que la osificación dentro del callo es de forma directa e indirecta. La osificación directa puede ocurrir de dos formas: i) intramembranosa, donde se observan trabéculas óseas formadas por células migratorias que provienen directamente de la médula ósea, del endostio, del periostio y de los vasos sanguíneos existentes dentro de éste (Fig. 10), y ii) por calcificación directa alrededor de los condrocitos hipertrofiados, entre medio de los cuales se forman cavidades conteniendo médula ósea inmadura. El comienzo de la osificación indirecta dentro del callo ocurre principalmente a partir de la matriz calcificada alrededor de los condrocitos hipertrofiados, donde los osteoblastos sintetizan matriz osteoide. Independiente de la modalidad de osificación experimentada, la formación de las trabéculas óseas ya se observa a partir de los 11 días en ambos grupos de ratas.

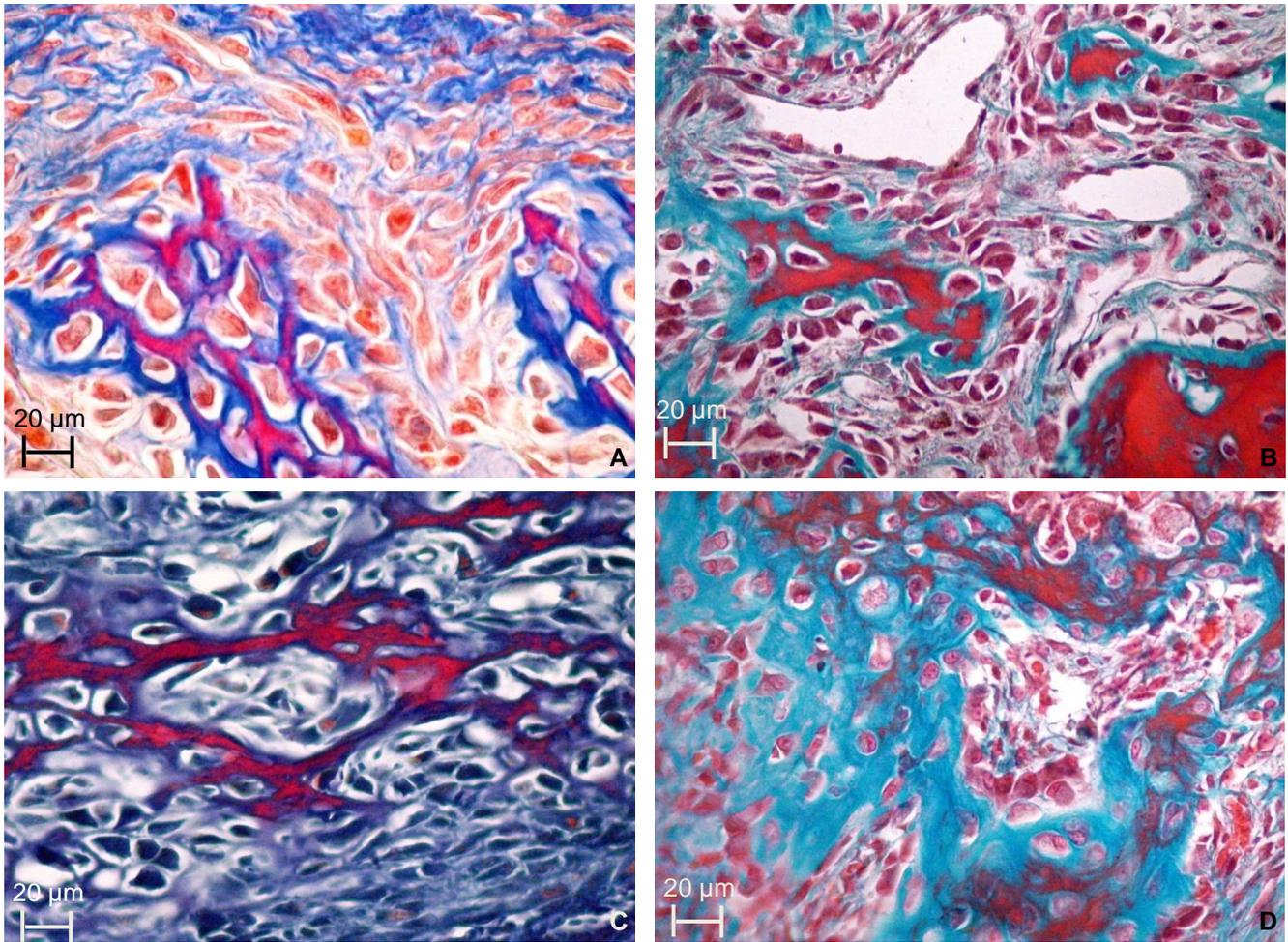


Figura 10: Osificación directa. Se observa la formación de trabéculas óseas a partir de células migratorias y su posterior calcificación. A) Grupo tratado 11 días; B) Grupo tratado 21 días; C) Grupo control 11 días; D) Grupo control 21 días. A y C Técnica Tricrómico de Mallory; B y D Técnica Tricrómico de Masson. 400X.

El tejido conectivo circundante a la zona de fractura se continúa con el periostio fibroso. Se observa la presencia de un gran número de vasos sanguíneos de considerable calibre dentro de los focos de cartílago, y en algunos casos, la presencia de células de aspecto fibroblástico con prolongaciones celulares en su interior. Además de las células vasculares, hay migración de células perivasculares hacia el tejido cartilaginoso que se encuentra en proceso de osificación. Durante esta migración, en el grupo tratado con ASC se evidenció células con múltiples prolongaciones celulares dentro del tejido circundante (Fig. 11a y 11b), sin embargo células con morfología de fibroblastos se encuentran en ambos grupos (Fig. 11). Estas células diferencian a osteoprogenitoras y a osteoblastos, y se movilizan para generar nuevos vasos sanguíneos dentro del foco de reparación.

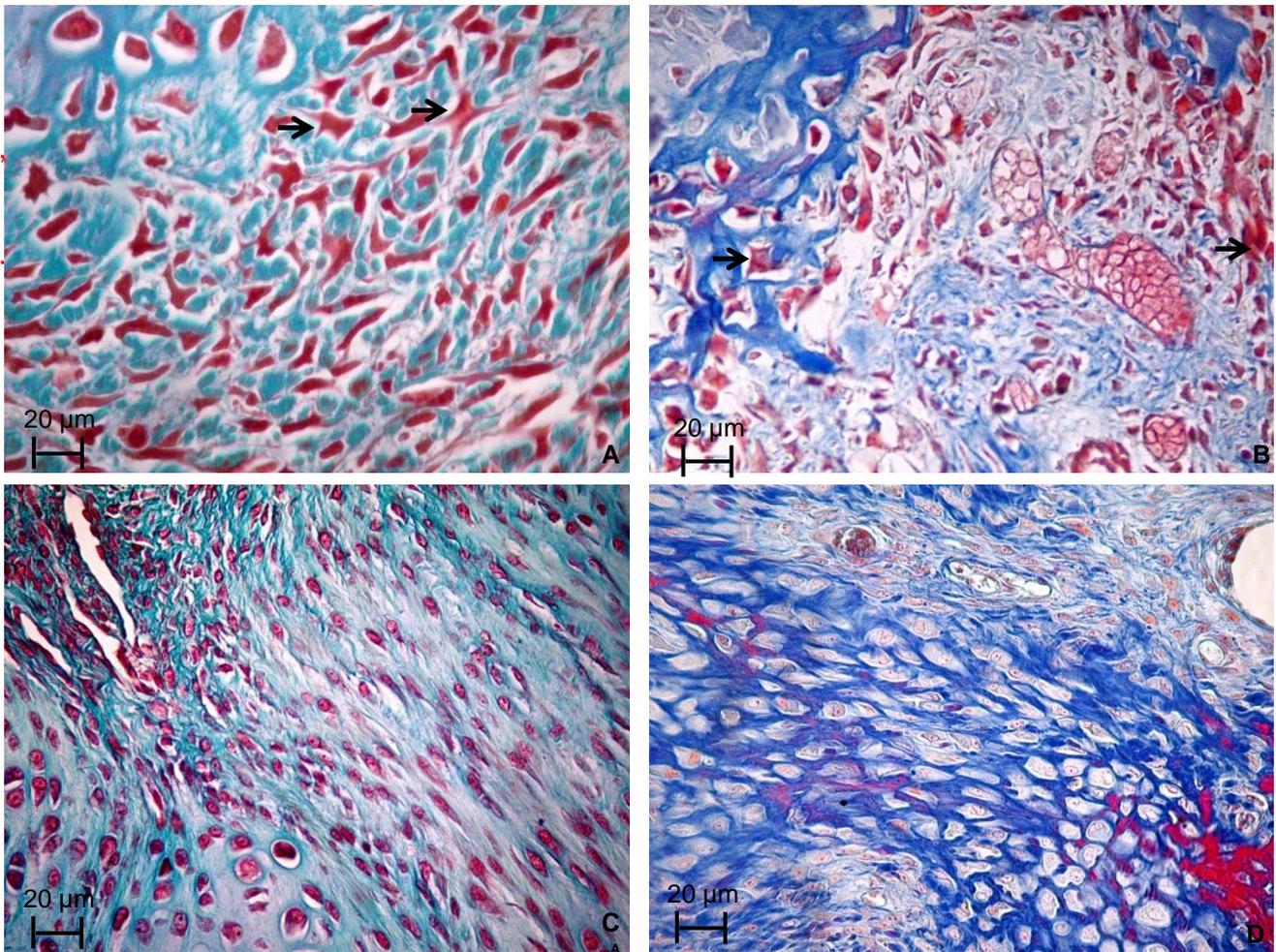


Figura 11: Células migratorias hacia el sitio de la lesión. Se observan células de aspecto fusiforme en todos los grupos. Nótese las células de aspecto estrellado de A y C (flechas). A) Grupo tratado 11 días; B) Grupo tratado 21 días; C) Grupo control 11 días; D) Grupo control 21 días. A y C Técnica Tricrómico de Masson; B y D Técnica Tricrómico de Mallory. 400X.

Las células osteoprogenitoras se ubican unas al lado de otras formando una fila que rodea las trabéculas en neoformación. En el caso de los individuos del grupo control se evidenció hasta dos filas de estas células. Morfológicamente son células planas, y en algunas de ellas se observa la presencia de dos nucléolos. En relación a los osteoblastos, son células cúbicas a cilíndricas con núcleo prominente. En ambos grupos se evidenció hasta 3 filas de estas células rodeando las trabéculas y conformando la capa interna del periostio.

Los osteoclastos se observan en los bordes del callo, principalmente donde el cartílago mineralizado está experimentando la resorción y a nivel de médula ósea durante la osificación directa, rodeando las trabéculas neoformadas, en las cuales es común encontrar lagunas de

resorción. Estas células presentan una morfología variable, se observan además en el tejido conectivo fibroso circundante, y en algunos casos, entremezcladas con fibras de la musculatura esquelética. Estos osteoclastos derivan de los monocitos sanguíneos y de la médula ósea, los cuales se fusionan y migran hacia el tejido afectado (Fig. 12).

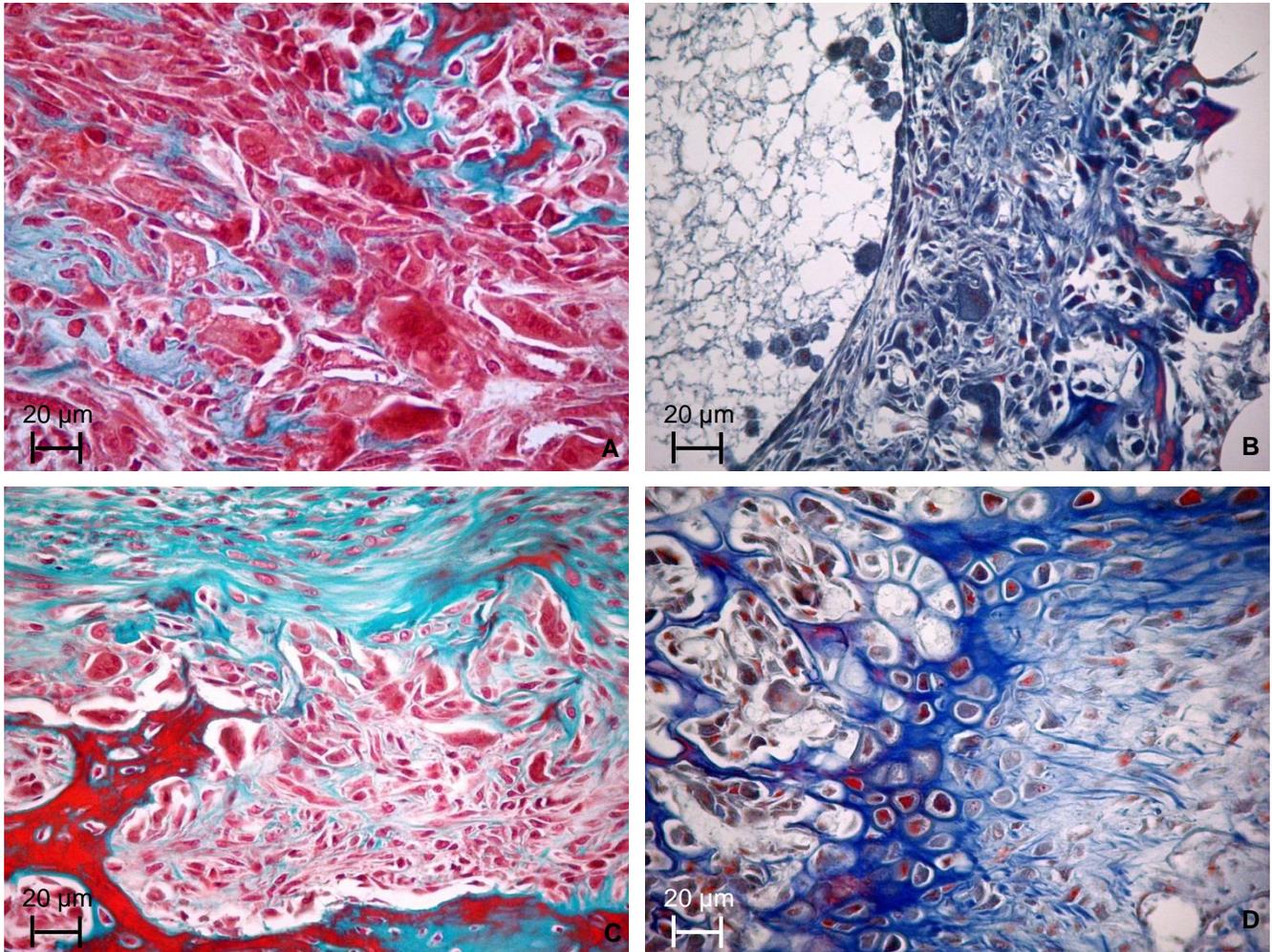


Figura 12: Osteoclastos dentro del foco de regeneración. A) Grupo tratado 11 días; B) Grupo tratado 21 días; C) Grupo control 11 días; D) Grupo control 21 días. A y C Técnica Tricrómico de Masson; B y D Técnica Tricrómico de Mallory. 400X.

Al evaluar la síntesis y distribución de colágeno dentro del foco cartilaginoso y del tejido óseo, se evidenció mediante la técnica Picosirius de Junqueira que la descomposición en colores en rojo-amarillo (colágeno I) difiere cualitativamente entre individuos tratados en relación con el grupo control. Los resultados nos indican que en ambos grupos el cartílago neoformado está compuesto por colágeno I y II, sin embargo en el sitio intervenido con ASCs las fibras presentan una distribución de apariencia más homogénea, a diferencia del grupo control donde no existe un patrón espacial de distribución (Fig. 13).

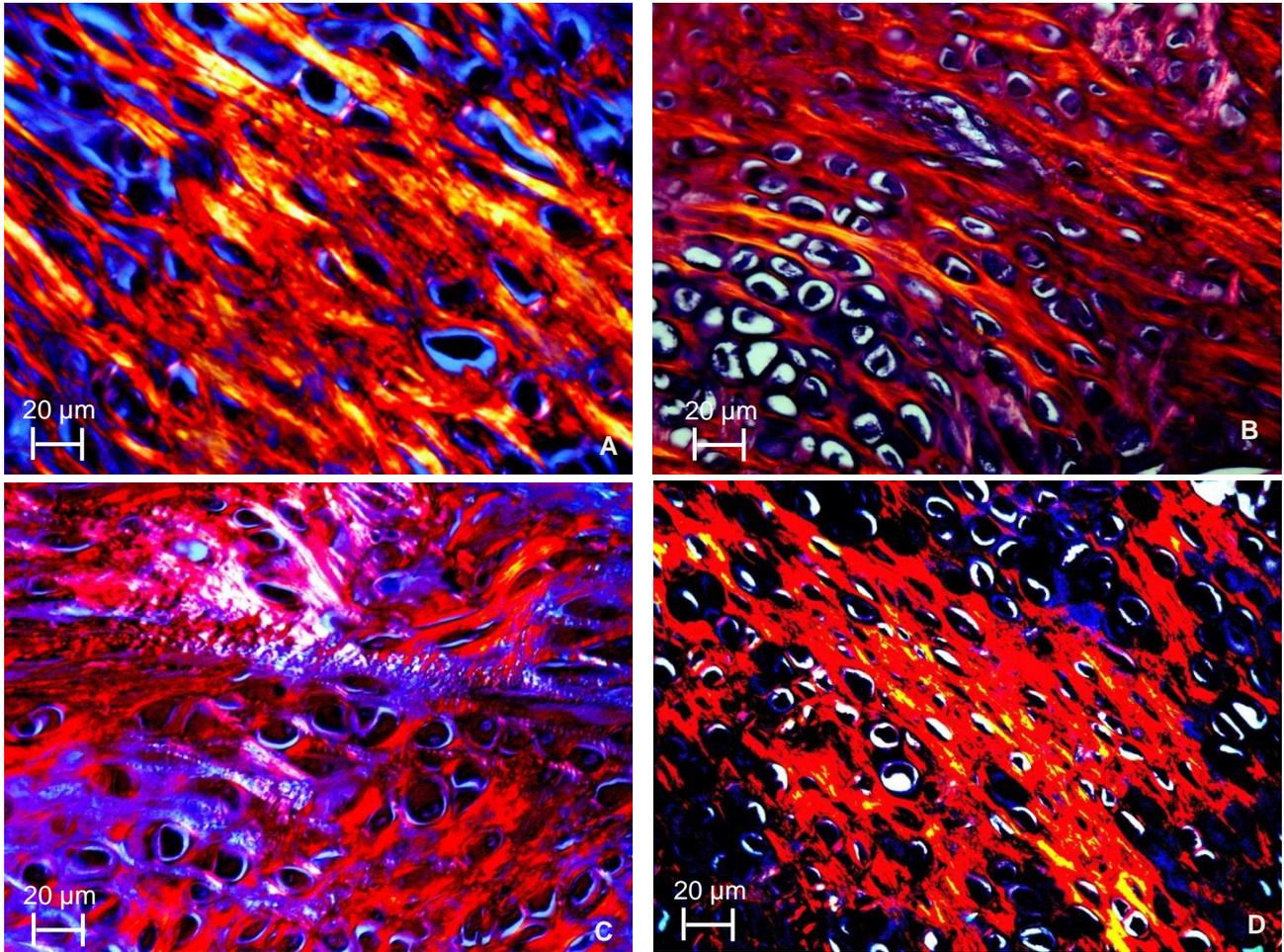


Figura 13: Diferencias de distribución de fibras colágenas. Nótese la diferencia de distribución de estas fibras en A y B, a diferencia de la distribución desuniforme observada en C y D. A) Grupo tratado 11 días; B) Grupo tratado 21 días; C) Grupo control 11 días; D) Grupo control 21 días. Técnica Picrosirius de Junqueira. 400X.

En relación a la cuantificación del número de células formadoras y resorptivas en cada ejemplar, no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos de cada tratamiento. Los resultados se resumen en la tabla III. Los osteoblastos fueron las células encontradas en mayor cantidad, luego las osteoprogenitoras y finalmente los osteoclastos (Fig. 14). Además se comparó los resultados dentro de un mismo grupo, a los 11 y a los 21 días, y los resultados obtenidos no demostraron significancia estadística (Fig.16).

	TRATAMIENTO												CONTROL											
	11 DÍAS						21 DÍAS						11 DÍAS						21 DÍAS					
Hueso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Osteoprogenitoras	6	7	8	6	8	14	11,8	6,5	8	5,3	3,7	10,5	7,7	6	7,5	6,2	10	9,	9,	6,	6,	8,	8,	7,7
Osteoblastos	32	32	27	24	30	27	18,3	19,5	27,7	24,5	22	26,2	23,8	24	24,5	31,5	17	10	17	16	25	18	2	20,
Osteoclastos	3	2	5	6	4	5	2,3	5,2	3,8	4,3	4,2	2,5	4,3	3,	3,8	3,8	4,	6,	2,	4	2,	2,	3,	3,8
														2			5	2	5		8	5	5	

Tabla III: Número de células obtenidas en ambos grupos, y durante los dos periodos de tiempo. Resultados expresados en promedio.

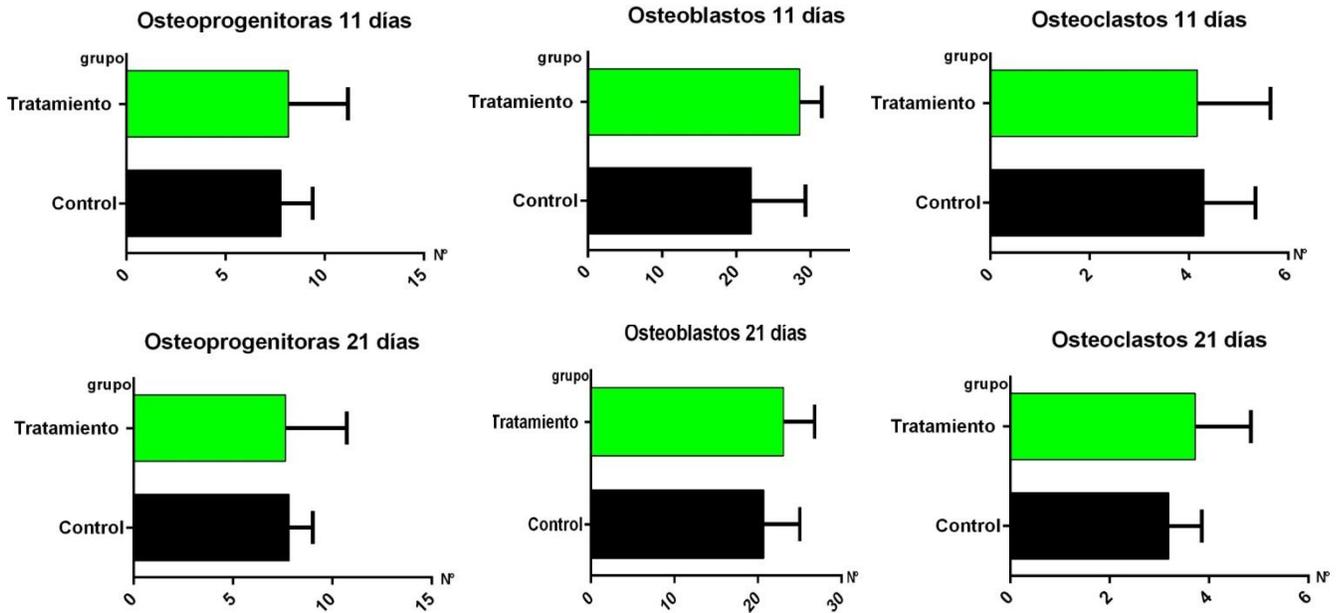


Figura 14: Gráficos donde se muestran los resultados obtenidos en cuanto al número de células de los distintos grupos en los dos periodos.

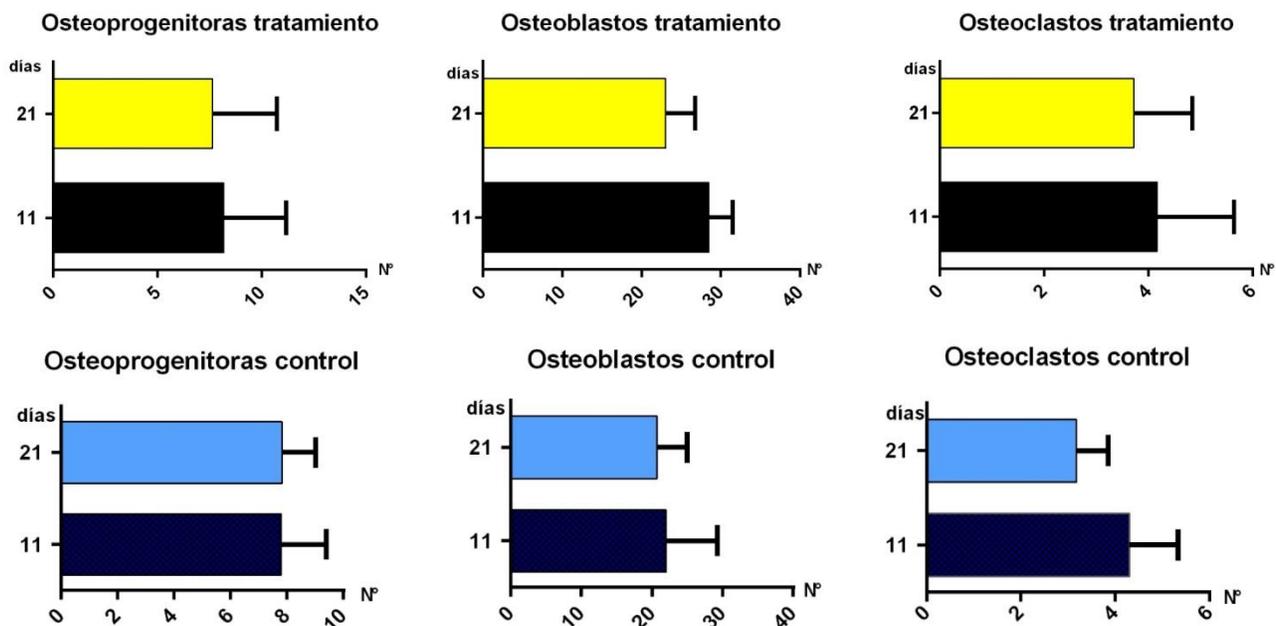


Figura 15: Gráficos donde se muestran los resultados obtenidos en cuanto al número de células dentro de los mismos grupos, comparando los distintos períodos de tiempo.

La neoformación de trabéculas óseas sí mostró diferencia significativa, siendo mayor en las ratas tratadas que en las ratas del grupo control. Esta diferencia se observó tanto a los 11 como a los 21 días de tratamiento. El estudio comparativo dentro de un mismo grupo, arrojó resultados con significancia estadística significativa en el grupo tratado, siendo mayor el número de trabéculas a los 21 días que a los 11 días. La comparación dentro del grupo control no arrojó resultados con significancia estadística (Fig. 16).

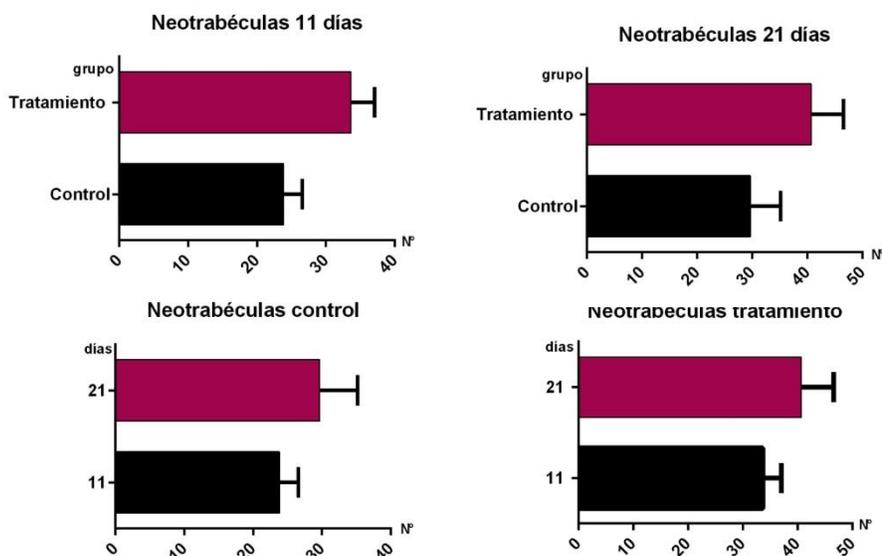


Figura 16: Gráficos donde se muestran los resultados obtenidos en cuanto al número de neotrabéculas en ambos grupos, y dentro de los mismos grupos, comparando los distintos períodos de tiempo.

3.- Cualificar la neoformación de vasos sanguíneos en el área tratada utilizando marcadores moleculares, y cuantificar en ambos grupos el número de células endoteliales.

El anticuerpo anti-factor VIII (Dako Rabbit anti-mouse Von Willebrand Factor) se utilizó para identificar células endoteliales y de este modo la presencia de neovasos. Todas las muestras arrojaron positividad moderada con este marcador, ya sea dentro de la célula endotelial, como en el conectivo perivascular (Fig. 17).

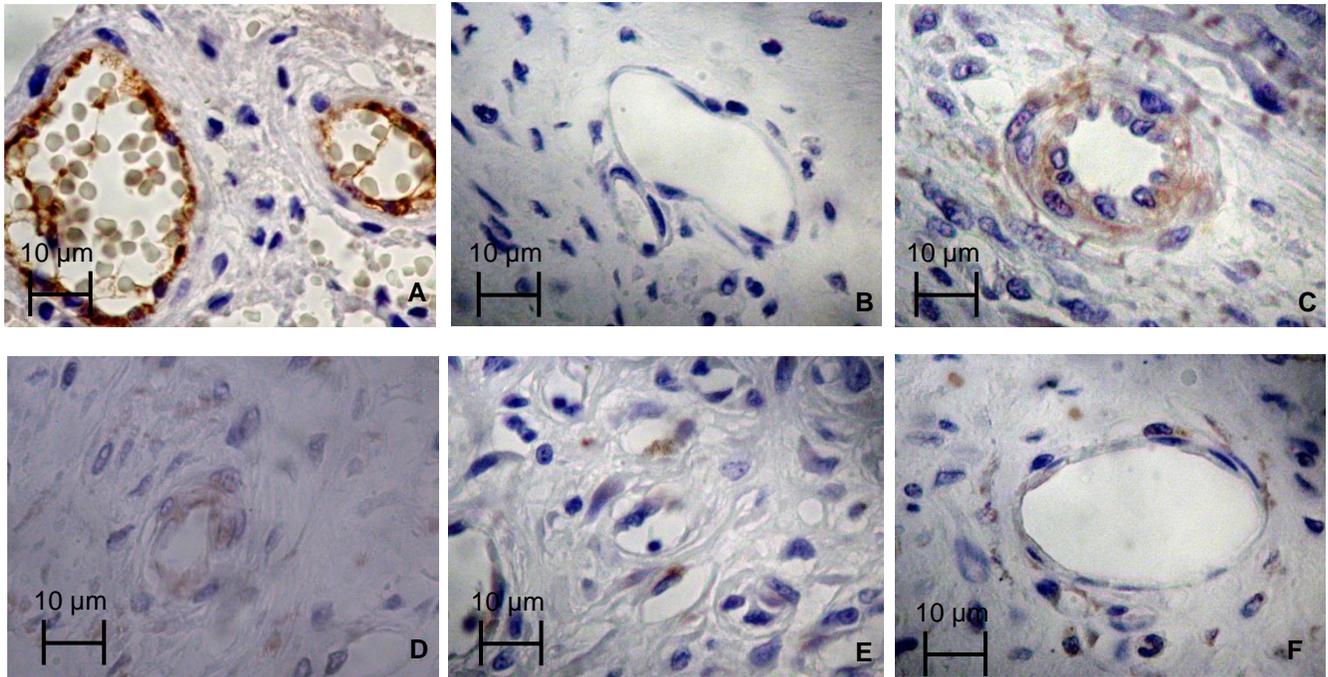


Figura 17: Células endoteliales mostrando positividad frente al anticuerpo anti-factor VIII. A) Control positivo; B) Control negativo; C) Grupo tratado 11 días; D) Grupo tratado 21 días; E) Grupo control 11 días; F) Grupo control 21 días.1000X.

En relación a la determinación de la densidad vascular, las pruebas estadísticas arrojaron un valor estadísticamente significativo al comparar ambos grupos, tanto a los 11 como a los 21 días. Esta diferencia también fue significativa al comparar los días 11 y 21 del grupo tratado, no así el grupo control (Fig. 18). Los datos obtenidos se resumen en la tabla III.

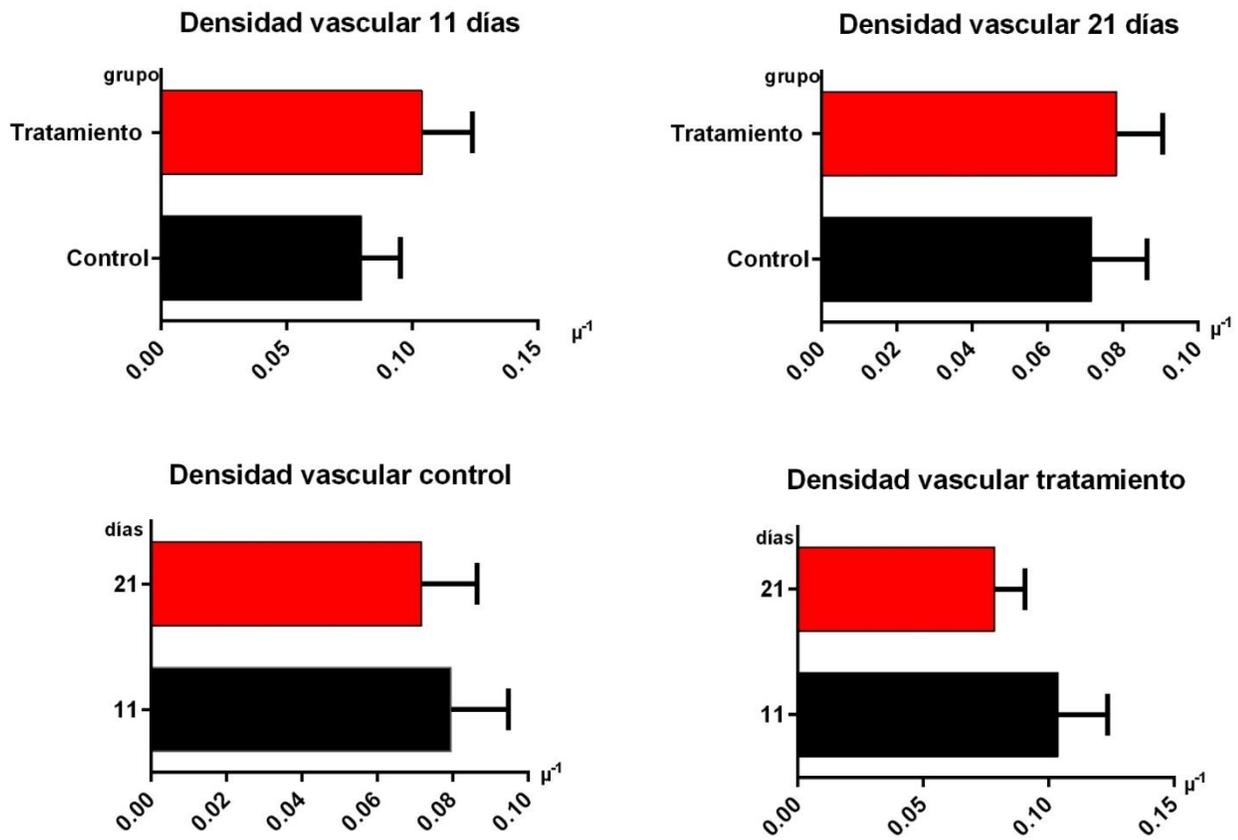


Figura 18: Gráficos donde se muestran los resultados obtenidos en cuanto al número de neotrabéculas en ambos grupos, y dentro de los mismos grupos, comparando los distintos periodos de tiempo.

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo aportar nuevos conocimientos en el campo de la medicina regenerativa veterinaria, evaluando la regeneración ósea en una fractura inducida y tratada con ASCs autólogas, en dos períodos de tiempo (11 y 21 días).

Para lograr esto fue necesario utilizar un modelo experimental en ratas, y así desarrollar la técnica de obtención de ASCs de acuerdo al protocolo descrito por Meruane & Rojas (2010). La obtención de ASCs fue exitosa, ya que se obtuvo un promedio de 5×10^5 /ml células en el primer pasaje de un cultivo realizado con un promedio de 1,4 grs de tejido adiposo, logrando una concentración muy similar a lo descrito por este autor. Sin embargo, existen diferencias con otros investigadores como Mizuno (2009) y Fraser *et al.*, (2006), quienes lograron obtener una población de 5×10^3 células a partir de 1 gr de tejido adiposo, mientras que en la investigación realizada por Williams *et al.*, (2008) y Chung *et al.*, (2012) se obtuvieron $4,2 \pm 1,7 \times 10^5$ células/ml. Por otro lado Nakanishi *et al.*, (2011) obtuvieron una población de 5×10^7 células al cuarto pasaje de cultivo. Arrigoni *et al.*, (2009) lograron purificar un promedio de $6,2 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^5$ y $8,9 \times 10^5 \pm 8,4 \times 10^5$ de ASCs/ml a partir de las regiones inguinal y perirrenal respectivamente. Además estos investigadores obtuvieron $3,5 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^4$ células/ml desde tejido adiposo interescapular en conejo, mientras que de la zona caudal del porcino se aislaron $1,8 \times 10^5 \pm 4,7 \times 10^4$ células. Esta diferencia podría deberse a la edad del individuo, cantidad de tejido extraído, y al número de pasajes del cultivo.

En el primer pasaje del cultivo se observó células adheridas al plástico, coincidiendo con el estudio de obtención de ASCs de Baer & Geiger (2012). Diversas investigaciones coinciden con la morfología fibroblástica que presentaron estas células en el segundo pasaje (Pittenger *et al.*, 1999; Avram *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2009; Arrigoni *et al.*, 2009; Monaco *et al.*, 2009; 2011; Baer & Geiger, 2012; Taghi *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Kim & Heo, 2014; Marędziak *et al.*, 2014; Kou *et al.*, 2014). En relación a las gotas lipídicas, Kou *et al.*, (2014) informan que luego de 2 semanas estas gotas se pierden, y con respecto a las células pequeñas redondas que se encontraron en esta generación, Taghi *et al.*, (2012) mencionan que desaparecen a partir del segundo pasaje, obteniendo células similares histológicamente (Gaiba *et al.*, 2012).

Por el hecho que la fijación de la fractura fue interna a partir de un clavo medular y no rígida externamente, la regeneración ósea fue secundaria, lo que involucra cantidades variables de

osificación membranosa y endocondral, y se identificaron las 3 fases que la constituyen: inflamación, reparación y remodelación, similar a lo descrito por Schindeler *et al.*, 2008; Weatherholt *et al.*, 2013 y Murao & Yamamoto, 2013. En el presente estudio, se observó tejido de granulación reemplazando el hematoma inicial, el cual coincide con las características histológicas descritas por otros investigadores (Geris *et al.*, 2010; Claes *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012; Mirhadi *et al.*, 2013). Sin embargo, estos autores no describen la población celular encontrada dentro de este tejido, como las células de aspecto fusiforme con múltiples prolongaciones y núcleos alargados que se observaron en esta investigación.

En este estudio se observa que la regeneración del tejido óseo sigue el modelo de diferenciación embrionario, coincidiendo con lo descrito por varios autores (Bruder *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2001; Colnot *et al.*, 2003; Eames & Helms, 2004; Shapiro, 2008; Shintaku *et al.*, 2011; Soung *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la participación del factor de transcripción Sox9 y las proteínas Runx1 y Runx2 son esenciales durante la embriogénesis y la formación del callo cartilaginoso (Shintaku *et al.*, 2011). Sox9 es expresado por las células condroprogenitoras y presentan un rol crucial en la condrogénesis (Bi *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2002; Shintaku *et al.*, 2011; Murao & Yamamoto, 2013), mientras que Runx1 y Runx2 participan en los eventos de la osificación directa e indirecta (Smith *et al.*, 2005; Carmeliet & Jain, 2011; Soung *et al.*, 2012), y estimulando la angiogénesis durante la formación del hueso (Shintaku *et al.*, 2011; Zelzer *et al.*, 2001). También se ha descrito la presencia del gen osterix como un factor necesario en la osificación y mineralización (Kierszenbaum & Tres, 2012; Glynn *et al.*, 2013). Prx-1 es un gen de la caja homeobox necesario para el desarrollo de miembros, y su expresión es previa a Sox9 (Martin & Olson, 2000), sin embargo su presencia no es indispensable. En cambio en el adulto sí es necesario para la formación del callo cartilaginoso, y su ubicación radica en las células multipotenciales presentes en el perios-
tio (Soung *et al.*, 2012) (Fig. 19).

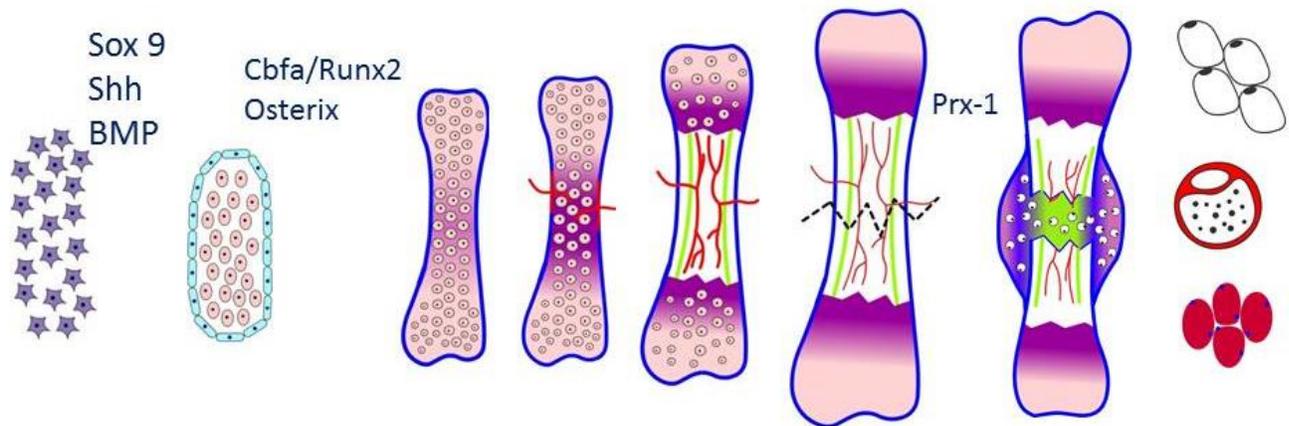


Figura 19: Regeneración v/s desarrollo embrionario. Se observa la presencia del factor de transcripción Sox9 durante la condrodiferenciación, y luego Runx2 y osterix para la diferenciación de osteoblastos y osteocitos. Posterior a una fractura, es necesaria la presencia del gen prx-1 para la formación del callo cartilaginoso, al cual provienen células indiferenciadas desde la musculatura, los pericitos y adipocitos. Modificado Colnot *et al.*, 2012.

A los 11 días es posible observar un callo perióstico secundario constituido por tejido cartilaginoso y óseo. Este último se desarrolla de forma no laminillar, coincidiendo con el estudio de Weatherholt *et al.*, (2013). Otros autores como McKibbin (1978); Epari *et al.*, (2006); Claes *et al.*, (2012) también sugieren que este callo se forma entre los 7 a 10 días luego de la fractura, el cual aumenta de tamaño con el movimiento interfragmentario hasta alcanzar su máximo a los 14 días post fractura (Claes *et al.*, 2006; 2012). Este tejido, que comienza a formarse en una región donde no está ni el periostio ni la vascularización interrumpida (Utvåg *et al.*, 2003; Claes *et al.*, 2012; Knight & Hankenson, 2013), avanza hacia los extremos de la fractura para conformar un puente entre éstos, y así lograr la unión de la fractura. Además de todos estos procesos, Mirhadi *et al.*, (2013) mencionan que la formación del callo es guiada por los condrocitos, y Weatherholt *et al.*, (2013), indican la aparición de una gran masa cartilaginosa formando un callo interno y otro externo, para culminar con la maduración del tejido a hueso laminillar y posterior reabsorción del callo. Nuestro estudio sólo se evaluó hasta los 21 días post fractura, por lo que no se observaron las características recién mencionadas.

Knight & Hankenson (2013), observaron que tanto el cartílago como el hueso eran originados a partir del periostio. Por el contrario, en nuestro estudio se encuentra presencia de pericondrio dando origen a las placas cartilaginosas, posteriormente éste fue reemplazado casi en su totalidad por periostio, el cual se encontraba engrosado. Mostraba una capa externa conectiva muy vascularizada, y una capa interna con osteoblastos que contribuyen a la forma-

ción y progresión del callo perióstico, tal como lo describen Wang *et al.*, (2011); e Ito *et al.*, (2014). La regeneración que se produjo en las ratas de nuestro estudio a partir del periostio, en el cual éste es capaz de proveer osteoblastos y nutrientes, coincide con lo descrito por Ito *et al.*, (2014).

Al interior de las placas cartilaginosas se observan condrocitos hipertrofiados dentro de una matriz calcificada, los cuales experimentan apoptosis. Diversos investigadores coinciden en que estas células liberan calcio entre los 10 y 14 días luego de la injuria (Einhorn, 1998; Einhorn, 2005; Phillips, 2005, Claes *et al.*, 2012; Mirhadi *et al.*, 2013), similar a lo que ocurre durante la osificación endocondral a partir del cartílago de crecimiento (Einhorn, 1998; Claes *et al.*, 2012). Junto con esto, el movimiento interfragmentario disminuye debido a la unión de los bordes del callo, permitiendo la invasión de vasos sanguíneos al tejido cartilaginoso (Rhinelander, 1974; Claes *et al.*, 1997; Claes *et al.*, 2002; 2012; Melnyk *et al.*, 2008; Claes *et al.*, 2012).

La vascularización, que permite el inicio de la osificación, proviene desde el periostio y el tejido conectivo circundante. En nuestro estudio se observó un aumento significativo estadísticamente de la densidad vascular, coincidiendo con lo descrito por Shoji *et al.*, (2010). Estos investigadores además encontraron un aumento en el número de los osteoblastos, coincidiendo con nosotros, sin embargo, en nuestro estudio este aumento no fue estadísticamente significativo. Nakahara *et al.*, (1990) y Claes *et al.*, (2012) creen que todos los osteoblastos involucrados en la osificación membranosa derivan de células precursoras periostales, al igual que Weatherholt *et al.*, (2013), quienes afirman que no se observan MSCs en el endostio, y Chang *et al.*, (2012) y Colnot *et al.*, (2012) al informar que toda la población de osteoblastos dentro del hueso derivan del pericondrio embrionario. En nuestro estudio se evidenció que estas células osteógenas provienen tanto del periostio, como del endostio y de la médula ósea, al igual que lo observado por Knight & Hankenson (2013).

Los osteoclastos observados que experimentan resorción y rodean las trabéculas neoformadas, producen las lagunas de resorción (de Howship) en el tejido donde ejercen su acción. Taichman (2005) y Kierszenbaum & Tres (2012) mencionan que la proliferación, maduración e inhibición de los osteoclastos son inducidas por los osteoblastos. Esto estaría dado por la liberación del factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) por parte de los osteo-

blastos, el cual induce la migración y proliferación de los monocitos sanguíneos. La fusión de los monocitos genera osteoclastos inmaduros, los cuales maduran mediante la vía de transmisión de señales RANKL, liberado por los osteoblastos y algunas células estromales de la médula ósea. Esta activación es inhibida mediante la proteína osteoprotegerina, también elaborada por los osteoblastos. Una vez activados, los osteoclastos adquieren polaridad y forman una membrana rugosa sobre la superficie ósea, la cual representaría el transporte de las vesículas ácidas y su inserción a la membrana plasmática a través del uso de integrinas (Abu-Amer *et al.*, 1997; McHugh *et al.*, 2000; Teitelbaum, 2000; Weatherlot *et al.*, 2012) (Fig. 20).

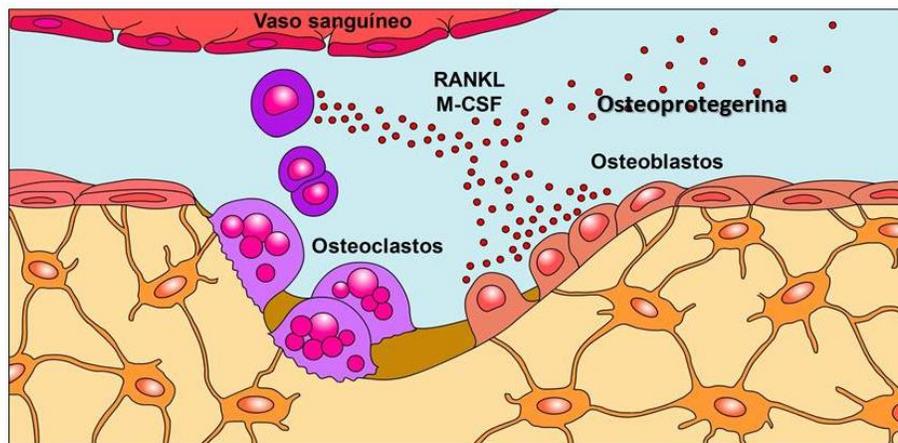


Figura 20: Osteoclastogénesis. Los osteoblastos inducen la migración de los monocitos sanguíneos mediante la liberación del factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF). Los osteoclastos maduran mediante la vía de transmisión de señales RANKL, liberado por los osteoblastos y algunas células estromales de la médula ósea. Esta activación es inhibida mediante la proteína osteoprotegerina, también elaborada por los osteoblastos. Modificado Weatherholt *et al.*, 2013.

Una célula que no podemos dejar fuera de este proceso es el pericito. Diversos informes publicados han reportado que los pericitos vasculares son una posible fuente de MSCs (Bianco *et al.*, 2001; Shi & Gronthos, 2003; Crisan, 2008; Farrington-Rock *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014). Se ha descrito que los pericitos pueden diferenciarse a osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, adipocitos y células del músculo liso (Diaz-Flores *et al.*, 1992; Canfield *et al.*, 1996; Korn *et al.*, 2002; Reilly *et al.*, 1998; Terskikh *et al.*, 2001; Caplan & Correa, 2011; Mendes *et al.*, 2012; Crisan *et al.* 2008; da Silva Meirelles *et al.*, 2006; Herrera-Bravo *et al.*, 2013). Esta gran potencialidad de generar diversos fenotipos celulares, podrían ser explicados por la capacidad de estas células de ser inducidas a un estado "stemness" cuando son tratadas con factores adecuados, ya que expresan el factor de transcrip-

ción Oct-4, también expresado en células madres embrionarias, el cual ha sido considerado como el actor principal de los mecanismos de autorenovación y pluripotencia (Herrera-Bravo *et al.*, 2013).

Se ha sugerido que todas las MSCs son pericitos (Caplan, 2008). Sin embargo la caracterización de estas células es difícil, debido a que carecen de un marcador celular único (Baer & Geiger, 2012). Hu *et al.* (2013) afirman que las características básicas de las ASCs y las USCs son similares, y ambas tienen una fuerte capacidad de autorenovación, antiapoptótica, y de multidiferenciación.

Varios investigadores han demostrado la eficacia y la viabilidad de los implantes a base de MSCs, ya sea alogénicos o autólogos para sanar grandes defectos óseos (Bruder *et al.* 1998; Kang *et al.* 2012; Zhu *et al.* 2011; Braly *et al.*, 2013), incluyendo defectos de tamaño del esqueleto apendicular y calota en modelos de ratón (Koob *et al.*, 2011; Monteiro *et al.* 2012a; 2012b), rata (Stephan *et al.*, 2010; Agacayak *et al.*, 2012; Osugi *et al.*, 2012), perro (Mokbel *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011, y oveja (Field *et al.*, 2011; Marquass *et al.*, 2011; Reichert *et al.*, 2012); entre otros (Khojasteh *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos por nosotros, nos muestra un aumento en el número de células formadoras y de resorción ósea en el grupo tratado con ASCs en comparación con el grupo control, sin embargo este aumento no es estadísticamente significativo. En este estudio, se evidenció un aumento significativo en el número de neotrabéculas y neovasos formados, lo que nos sugiere una actividad sintetizadora por parte de las células multipotenciales obtenidas a partir del tejido adiposo. Apoyando esta observación un grupo de investigadores (Amable *et al.*, 2014) observaron la capacidad de estas células de sintetizar proteínas colágenas *in vitro*, y encontraron que las células mesenquimáticas multipotenciales derivadas del tejido adiposo secretan mayores concentraciones de colágeno I y III, en relación a las células multipotenciales derivadas de la médula ósea, y de cordón umbilical.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto podemos afirmar que se confirma la hipótesis planteada la cuál dice relación a que el tiempo de regeneración ósea es menor y la vascularización es mayor en las fracturas tratadas con ASCs versus fracturas no tratadas con ASCs, ya que se encontró un aumento significativo de neotrabéculas y neovasos.

CONCLUSIÓN

Las células mesenquimáticas multipotenciales obtenidas del tejido adiposo representan un gran potencial para cicatrización ósea, acelerando la regeneración del tejido por múltiples vías: i) promoviendo la neovascularización, ii) producción y liberación de factores que estimulan la producción de colágeno por parte de los fibroblastos, y iii) mediante la síntesis de los componentes de la matriz extracelular cartilaginosa y ósea.

Se acepta la hipótesis debido a que se encontró un aumento significativo de neotrabéculas y neovasos en las fracturas tratadas con ASCs

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abu-Amer, Y.; Ross, F.P; Schlesinger, P.; Tondravi, M.M. & Teitelbaum, S.L. 1997. Substrate Recognition by Osteoclast Precursors Induces C-src/Microtubule Association. *J Cell Biol.* 137:247–258.
2. Agacayak, S.; Gulsun, B.; Ucan, M.C. 2012. Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:679–686.
3. Ailhaud, G.; Grimaldi, P & Negrel, R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr.* 12:207-33.
4. Akiyama, H.; Kim, J.E.; Nakashima, K.; Balmes, G.; Iwai, N.; Deng, J.M.; Zhang, Z.; Martin, J.F.; Behringer, R.R.; Nakamura, T. & de Crombrughe, B. 2005. Osteochondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14665–14670.
5. Amable, P.; Telles, M.; Vieira, R.; Granjeiro, J. & Borojevic, R. 2014. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther.* 5:53.

6. Arrigoni, E.; Lopa, S.; de Girolamo, L.; Stanco, D. & Brini, A.T. 2009. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res.* 338:401–11.
7. Aubin, J. E. 2000. Osteogenic cell differentiation. In: Davies J. E. ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies J. E. ed.; p.p. 19-30.
8. Avram, M.M.; Avram, A.S. & James, W.D. 2007. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol.* 56:472-92.
9. Badiavas, E.V.; Abedi, M.; Butmarc J.; Falanga, V. & Quesenberry, P. 2003. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol.* 196:245-50.
10. Baer, P. & Gelger, H. 2012. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012:812693.
11. Barnes, G.L.; Kostenuik, P.J.; Gerstenfeld, L.C. & Einhorn, T.A. 1999. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res.* 14:1805-1815.
12. Bi, W.; Deng, J.M.; Zhang, Z.; Behringer, R.R. & de Crombrughe, B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85–89.
13. Bianco, P.; Riminucci, M. & Gronthos, S. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180–192
14. Black, L.L.; Gaynor, J.; Gahring, D.; Adams, C.; Aron, D.; Harman, S.; Gingerich, D. A. & Harman, R. 2007. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: A randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther.* 8:272–284.

15. Braly, H.; O'Connor, D. & Brinker, M. 2013. Percutaneous Autologous Bone Marrow Injection in the Treatment of Distal Meta-diaphyseal Tibial Nonunions and Delayed Unions. *J Orthop Trauma*. 27:527–534.
16. Bruder, S.P.; Fink, D.J. & Caplan A.I. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 56:283–294.
17. Bruder, S.P.; Jaiswal, N.; Ricalton, N.S. 1998. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop*. S247–S256.
18. Bruder, S.P.; Jaiswal, N. & Haynesworth, S.E. 1997. Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 64:278–294.
19. Bruder, S.P.; Kraus, K.; Goldberg, V. & 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.
20. Butt, T. 2002. Septic arthritis in horses: diagnosis and treatment. *Large Animal Vet Rounds*. 2:1–6.
21. Canfield, A.E.; Sutton, A.B.; Hoyland, J.A. & Schor, A.M. 1996. Association of thrombospondin-1 with osteogenic differentiation of retinal pericytes in vitro. *J. Cell Sci*. 109:343-53.
22. Caplan, A.I. 2008. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 3:229–230.
23. Caplan, A. & Correa, D. 2011. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* 9:11–15.
24. Carmeliet, P. & Jain, R.K. 2011. Molecular mechanism and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473:298-307.

25. Chamberlain, S.J.; Chen, P.F.; Ng, K.Y.; Bourgois-Rocha, F.; Lemtiri-Chlieh, F.; Levine, E. S. & Lalande, M. 2010. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader–Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci.* 107:17668–17673.
26. Chang, H. & Knothe, M.L. 2012. The periosteum: tapping into a reservoir of clinically useful progenitor cells. *Stem Cells Transl Med.* 1:480–491.
27. Chen, D.; Chen, L.; Ling, Q.; Wu, M.; Wang, C.; Kumar, S.; Chang, Y.; Munusamy, M.; Alarfajj, A.; Wang, H.; Hsu, S. & Higuchi, A. 2014. Purification of human adipose-derived stem cells from fat tissues using PLGA/silk screen hybrid membranes. *Biomaterials.* 35:4278-87.
28. Chung, D.; Hayashi, K.; Toupadakis, C.; Wong, A. & Yellowley, C. 2012. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Res Vet Sci.* 92:66–75.
29. Claes, L.; Augat, P.; Suger, G. & Wilke, H. J. 1997. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res.* 15:577–584.
30. Claes, L.; Eckert-Hübner, K. & Augat, P. 2002. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res.* 20:1099–1105.
31. Claes, L.; Maurer-Klein, N.; Henke, T.; Gerngross, H.; Melnyk, M. & Augat, P. 2006. Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res.* 24:1178–1185.
32. Claes, L.; Recknagel, S. & Ignatius, A. 2012. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol.* 8:133–143.
33. Colnot, C.; Thompson, Z.; Miclau, T.; Werb, Z. & Helms, J.A. 2003. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130:4123–4133.

34. Colnot, C.; Zhang, X. & Knothe, M. 2012. Current Insights on the Regenerative Potential of the Periosteum: Molecular, Cellular, and Endogenous Engineering Approaches. *J Orthop Res.* 30:1869-78.
35. Córdova, L. A. 2010. Reparación ósea mandibular con autoinjerto ilíaco: estudio celular inicial en el modelo animal *Oryctolagus cuniculus*. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, mención Morfología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Chile.
36. Crisan, M.A.; Yap, S.; Casteilla, L.; Chen, C.W.; Corselli, M.; Park, T.S.; Andriolo, G.; Sun, B.; Zheng, B.; Zhang, L.; Norotte, C.; Teng, P.N.; Traas, J.; Schugar, R.; Deasy, B.M.; Badylak, S.; Buhring, H.J.; Jacobino, J.P.; Lazzari, L.; Huard, J. & Péault, B. 2008. Perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 3:301–313.
37. Currey, J.D. 2003. The many adaptations of bone. *J Biomech.* 36:1487–95.
38. da Silva Meirelles, L.; Chagastelles, P.C. & Nardi, N.B. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 119:2204–2213.
39. Davies, J.E. & Hosseini, M.M. 2000. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies J.E. (ed.). *Bone Engineering*. Toronto: Davies J.E. p.p. 1-14.
40. Day, S.M.; Ostrum, R.F.; Chao, E.Y.; Rubin, C.T.; Aro, H.T. & Einhorn, T.A. 2000. Bone Injury, Regeneration, and Repair. In: Buckwalter, J.A.; Einhorn, T.A.; Simon, S. R. editor. *Orthopaedic Basic Science*. 2 ed: American Academy of Orthopaedic Surgeons; p.p. 371-399.
41. Del Bue M.; Riccò S.; Ramoni R.; Conti V.; Gnudi G.; Grolli S. 2008. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet Res Commun.* 32:51–55.

42. Diaz-Flores, L.; Gutierrez, R.; & Lopez-Alonso, A. 1992. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 275:280–286.
43. Eames, B.F. & Helms, J.A. 2004. Conserved molecular program regulating cranial and appendicular skeletogenesis. *Dev Dyn*, 231:4–13.
44. Einhorn, T.A. 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 355:S7–S21.
45. Einhorn, T.A. 2005. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 19:S4–S6.
46. Epari, D.R.; Taylor, W.R.; Heller, M.O. & Duda, G.N. 2006. Mechanical conditions in the initial phase of bone healing. *Clin Biomech.* 21:646-655.
47. Falanga, V.; Iwamoto, S.; Chartier, M.; Yufit, T.; Butmarc, J.; Kouttab, N.; Shrayar, D. & Carson, P. 2007. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.* 13:1299-1312.
48. Farrington-Rock, C.; Crofts, N.J. & Doherty, M.J. 2004. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation.* 110:2226–2232.
49. Ferguson, C.; Alpern, E.; Miclau, T. & Helms, J.A. 1999. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev.* 87:57-66.
50. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I.; Alobera Gracia, M.A.; del Canto Pingarrón, M. & Blanco Jerez, L. 2006. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 11:47-51.
51. Field, J.R.; McGee, M. & Stanley, R. 2011. The efficacy of allogeneic mesenchymal precursor cells for the repair of an ovine tibial segmental defect. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 24:113–121.

52. Franchini M. & Lippi, G. 2007. The role of von Willebrand factor in hemorrhagic and thrombotic disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci*; 44:115–49.
53. Franchini, M.; Frattini, F.; Crestani, S.; Bonfanti, C. & Lippi, G. 2013. von Willebrand factor and cancer: A renewed interest. *Thromb Res.* 131:290–292.
54. Fraser, J.K.; Wulur, I.; Alfonso, Z. & Hedrick, M.H. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24:150–154.
55. Friedenstein, A.J.; Deriglasova, U.F.; Kulagina, N.N.; Panasuk, A.F.; Rudakowa, S.F.; Luriá, E.A. & Ruadkow, I.A. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 2:83-92.
56. Frost, H.M. 1989. The biology of fracture healing - An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Rel Res.* 248:283–293.
57. Gaiba, S.; Pereira de França, L.; Pereira de França, J. & Masako, L. 2012. Characterization of human adipose-derived stem cells. *Acta Cir Bras.* 27:471-476.
58. Geris L., Schugart R. & Van Oosterwyck H. 2010. In silico design of treatment strategies in wound healing and bone fracture healing. *Philos. Trans. R. Soc. A: Math. Phys. Eng. Sci.*, 368:2683–2706.
59. Gerstenfeld, L.C.; Cullinane, D.M.; Barnes, G.L.; Graves, D.T. & Einhorn, T.A. 2003. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 88:873-884.
60. Gilmore, G.L.; DePasquale, D.K.; Lister, J. & Shadduck, R.K. 2000. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 28:1297-1305.

61. Gimble, J.; Katz, A. & Bunnell, B. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 100:1249-60.
62. Giordano, A.; Galderisi, U. & Marino, I. R. 2007. From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J cell Physiol.* 211:27-35.
63. Glynn, E.; Sanchez, A.; Zinn, S.; Hoagland, T. & Govoni, K. 2013. Culture conditions for equine bone marrow mesenchymal stem cells and expression of key transcription factors during their differentiation into osteoblasts. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4:40.
64. Guest, D.J.; Smith, M.R. & Allen, W.R. 2008. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet. J.* 40:178–81.
65. Gundersen, H.J. 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc.* 111:219-227.
66. Hausman, G.J. & Hausman, D.B. 2006. Search for the preadipocyte progenitor cell. *J Clin Invest.* 116:3103-3106.
67. Heersche, J.N. 2002. Mesenchymal stem cells and their involvement in bone remodeling, repair, and regeneration. In: Zarb, G.; Leckholm, U.; Albrektsson,; Tenenbaum, H. eds. *Aging, Osteoporosis, and dental implants.* Carol Stream: Quintessence Publishing Co.; p.p. 17-23.
68. Herrera-Bravo, J.; Montiel-Eulefi, E.; Glaser, T.; Garcés, M.; Leal, P. & Henning, A. 2013. La Translocación in vitro Citoplasma/Núcleo del Factor de Transcripción Embrionario OCT-4 en Células Perivasculares Propone a la Aorta Como un Nicho Quiescente de Células Madre Adultas. *Int J Morphol.* 31:1430-1438.
69. Herthel, D.J. 2001. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cell and other bone marrow components. *Proc. Am. Ass. equine Practnrs.* 47:319-21.

70. Hu, L.; Hu, J.; Zhao, J.; Liu, J.; Ouyang, W.; Yang, C.; Gong, N.; Du, L.; Khanal, A. & Chen, L. 2013. Side-by-Side Comparison of the Biological Characteristics of Human Umbilical Cord and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2013:438243.
71. Ito, R.; Matsumiya, T.; Kon, T.; Narita, N.; Kubota, K.; Sakaki, H.; Ozaki, T.; Imaizumi, T.; Kobayashi, W. & Kimura, H. 2014. Periosteum-derived cells respond to mechanical stretch and activate Wnt and BMP signaling pathways. *Biomed Res.* 35:69-79.
72. Jaffe, E.A.; Hoyer, L.W. & Nachman, R.L. 1974. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1906.
73. Kang, S.W.; Bae, J.H. & Park, S.A. 2012. Combination therapy with BMP-2 and BMSCs enhances bone healing efficacy of PCL scaffold fabricated using the 3D plotting system in a large segmental defect model. *Biotechnol Lett.* 34:1375–1384.
74. Khojasteh, A.; Behnia, H. & Dashti, S.G. 2012. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 70:972–982.
75. Kierszembbaum, A. & Tres, L. 2012. *Histología y biología celular. Introducción a la anatomía patológica.* Elsevier España, 3° ed.
76. Kim, E. & Heo, C. Y. 2014. Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World J Stem Cells.* 6:65-68.
77. Knight, M. & Hankenson, K. 2013. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care.* 2:306–316.
78. Kon, E.; Muraglia, A.; Corsi, A.; Bianco, P.; Maracci, M.; Martin, I.; Boyde, A.; Ruspantini, I.; Chistolini, P.; Rocca, M.; Giardino, R.; Cancedda, R. & Quarto, R. 2000. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic

accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res.* 49:328-337.

79. Koob, S.; Torio-Padron, N. & Stark, G.B. 2011. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* 17:311–321.
80. Korn, J.; Christ, B. & Kurz, H. 2002. Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells. *J. Comp. Neurol.* 442:78-88.
81. Kou, L.; Lu, K.; Wu, M.; Wang, H.; Zhang, Y.; Sato, S. & Shen, J. 2014. The phenotype and tissue-specific nature of multipotent cells derived from human mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 444:543–548.
82. Kumar, V.; Abbas, A.K. & Aster J.C. 2012. *Robbins Basic Pathology*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
83. Le, A.X.; Miclau, T.; Hu, D. & Helms, J.A. 2001. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res.* 19:78–84.
84. Lee, S.Y.; Miwa, M.; Sakai, Y.; Kuroda, R.; Matsumoto, T. Iwakura, T.; Fujioka, H.; Doita, M & Kurosaka, M. 2007. In vitro multipotentiality and characterization of human unfractured traumatic hemarthrosis-derived progenitor cells: a potential cell source for tissue repair. *J Cell Physiol.* 210:561–566.
85. Lin, G.; Garcia, M.; Ning, H.; Banie, L.; Wuo, Y.L.; Lue, T. & Lin, C.S. 2008. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Develop.* 17:1053–1063.
86. Litzke, L.E.; Wagner, E.; Baumgaertner, W.; Hetzel, U.; Josimović-Alasević, O. & Libera, J. 2004. Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann. Biomed Eng.* 32:57-69.

87. Lu, F.; Mizuno, H.; Uysal, C.A.; Cai, X.; Ogawa, R. & Hyakusoku, H. 2008. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 121:50-8.
88. Lu, X.; Li, S.; & Cheng, J. 2002. Bone marrow mesenchymal stem cells: progress in bone/cartilage defect repair. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*; 19: 135.
89. Mandarim-de-lacerda, C. 2003. Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc.* 75:469-486.
90. Marędziak, M.; Marycz, K.; Śmieszek, A.; Lewandowski, D. & Toker, N. 2014. The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2014:1-10.
91. Marquass, B.; Schulz, R. & Hepp, P. 2011. Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *Am J Sports Med.* 39:1401–1412.
92. Martin, J.F. & Olson, E.N. 2000. Identification of a prx1 limb enhancer. *Genesis* 26:225–229.
93. Martin, D.R.; Cox, N.R.; Hathcock, T.L.; Niemeyer, G.P. & Baker, H.J. 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol.* 3:879-886.
94. Marycz, K.; Grzesiak, J.; Wrzeszcz, K.; Golonka, P. 2012a. Adipose stem cell combined with plasma-based implant bone tissue differentiation in vitro and in a horse with a phalanx digitalis distalis fracture: a case report. *Vet Med.* 57:610–617.
95. Marycz K.; Toker N.Y.; Grzesiak J.; Wrzeszcz K.; Golonka P. 2012b. The therapeutic effect of autogenic adipose derived stem cells combined with autogenic platelet rich plasma in tendons disorders hi horses in vitro and in vivo research. *J Anim Vet Adv.* 11:4324–4331.

96. McGuckin, C.P.; Pearce, D.; Forraz, N.; Tooze, J.A.; Watt, S.M. & Pettengell, R. 2003. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *Euro J Haematol.* 71:341-350.
97. McHugh, K.P.; Hodivala-Dilke, K. & Zheng, M.H. 2000. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest.* 105:433–40.
98. McKibbin, B. 1978. Biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Brit.* 60:150-162.
99. Melnyk, M., Henke, T., Claes, L. & Augat, P. 2008. Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury. *Arch Orthop Trauma Surg.* 128:1159–1165.
100. Mendes, L.; Pirraco, R.; Szymczyk, W.; Frias, A.; Santos, T.; Reis, R. & Marques, A. 2012. Perivascular-Like Cells Contribute to the Stability of the Vascular Network of Osteogenic Tissue Formed from Cell Sheet-Based Constructs. *PLoS One* 7:e41051.
101. Mendolicchio, G. & Ruggeri, Z.M. 2005. New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol.* 42:5-14.
102. Meruane, M. & Rojas, M. 2010. Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo. *Int J Morphol.* 28:879-889.
103. Mirhadi, S.; Ashwood, S. & Karagkevrekis, B. 2013. Factors influencing fracture healing. *Trauma* 15:140-155.
104. Mizumo, H. 2009. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and literature review. *J Nippon Med Sch.* 76:56-66.
105. Mohammed, H.O.; Divers, T.J.; Symmers, B.A. & de Lahunta, A. 2007. Vitamin E deficiency and risk of equine motor neuron disease. *Acta Vet Scand.* 49:17.

106. Mokbel, A.; El-Tookhy, O. & Shamaa, A.A. 2011. Homing and efficacy of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in experimental chondral defects in dogs. *Clin Exp Rheumatol.* 29:275–284.
107. Monaco, E.; Lima, A.; Bionaz, M.; Makia, A.; Hurley, W.L. & Wheeler, M.B. 2009. Morphological and Transcriptomic Comparison of Adipose and Bone Marrow Derived Porcine Stem Cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2:20 –33.
108. Monaco, E.; Bionaz, M.; Hollister, S.J. & Wheeler, M.B. 2011. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *The-riogenology* 75:1381–1399.
109. Monteiro, B.S.; Argolo-Neto, N.M. & Nardi, N.B. 2012. Treatment of critical defects produced in calvaria of mice with mesenchymal stem cells. *An Acad Bras Cienc.* 84:841–851.
110. Monteiro, B.S.; Del Carlo, R.J. & Argolo-Neto, N.M. 2012. Association of mesenchymal stem cells with platelet rich plasma on the repair of critical calvarial defects in mice. *Acta Cir Bras.* 27:201–209.
111. Montes, G.S. & Junqueira, L.C. 1991. The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 86:1-11.
112. Mueller, S. & Glowacki, J. 2001. Age-Related Decline in the Osteogenic Potential of Human Bone Marrow Cells Cultured in Three-Dimensional Collagen Sponges. *J Cell Biochem.* 82:583-590.
113. Murao, H.; Yamamoto, K. & Matsuda, S. 2013. Periosteal cells are a major source of soft callus in bone fracture. *J Bone Miner Metab.* 31:390–398.
114. Murray, I.; West, C.; Hardy, W.; James, A.; Park, T.; Nguyen, A.; Tawonsawatruk, T.; Lazzari, L.; Soo C. & Péault, B. 2014. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci.* 71:1353–1374.

115. Nakagawa, H.; Akita, S.; Fukui, M.; Fujii, T. & Akino, K. 2005. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol.* 153: 29-36.
116. Nakahara, H.; Bruder, S.P.; Haynesworth, S.E.; Holecek, J.J.; Baber, M.A.; Goldberg, V.M. & Caplan, A.I. 1990. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by sub-cultured cells derived from the periosteum. *Bone.* 11:181–188.
117. Nakanishi, C.; Nagaya, N.; Ohnishi, S.; Yamahara, K.; Takabatake, S.; Konno, T.; Hayashi, K.; Kawashiri, M.; Tsubokawa, T. & Yamagishi, M. 2011. Gene and Protein Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived From Rat Adipose Tissue and Bone Marrow. *Circ J.* 75:2260–2268.
118. Nambu, M.; Ishihara, M.; Nakamura, S.; Mizuno, H.; Yanagibayashi, S.; Kanatani, Y.; Hattori, H.; Takase, B.; Ishizuka, T.; Kishimoto, S.; Amano, Y.; Yamamoto, N.; Azuma, R. & Kiyosawa, T. 2007. Enhanced healing of mitomycin C-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix. *Wound Rep Reg.* 15:505-10.
119. Osugi, M.; Katagiri, W.; Yoshimi, R.; Inukai, T.; Hibi, H.D. & Ueda, M. 2012. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A* 18:1479–1489.
120. Phillips, A. M. 2005. Overview of the fracture healing cascade. *Injury.* 36:5–7.
121. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M. Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S. & Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143–147.
122. Puissant, B.; Barreau, C.; Bourin, P.; Clavel, C.; Corre, J.; Bousquet, C.; Taureau, C.; Cousin, B.; Abbal, M.; Laharrague, P.; Penicaud, L.; Casteilla, L. & Blancher, A. 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Hematol.* 129:118-129.

123. Rehman, J.; Traktuev, D.; Li, J.; Merfeld-Clauss, S.; Temm-Grove, C.J.; Bovenkerk, J.E.; Pell, C.L.; Johnstone, B.H.; Considine, R.V. & March, K.L. 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 109:1292-1298.
124. Reichert, J.C.; Cipitria, A. & Epari, D.R. 2012. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci Transl Med*. 4:141ra93.
125. Reilly, T.M.; Seldes, R.; Luchetti, W. & Brighton, C.T. 1998. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop Relat Res*. 364:95-103.
126. Rhinelander, F.W. 1974. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 105:34–81.
127. Rider, D.A.; Dombrowski, C.; Sawyer, A.A.; Ng, G.H.; Leong, D.; Hutmacher, D.W.; Nurcombe, V. & Cool, S.M. 2008. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 26:1598–1608.
128. Rigotti, G.; Marchi, A.; Galiè, M.; Baroni, G.; Benati, D.; Krampera, M.; Pasini, A. & Sbarbati, A. 2007. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 119:1409-1422.
129. Rodriguez, A.M.; Elabd, C. & Amri, E.Z. 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 87:125–128.
130. Rojas, M. & Meruane, M. 2012. Potencialidad celular evolutiva y medicina regenerativa. *Int J Morphol*. 30:1243-1251.
131. Schindeler, A.; McDonald, M.M. & Bokko, P. 2008. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*. 19:459–466.

132. Shapiro, F. 2008. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Europ Cells Mater.* 15:53-76.
133. Shi, S. & Gronthos, S. 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 18:696–704.
134. Shintaku, Y.; Murakami, T.; Yanagita, T.; Kawanabe, N.; Fukunaga, T.; Matsuzaki, K.; Uematsu, S.; Yoshida, Y.; Kamioka, H.; Takano-Yamamoto, T.; Takada, K. & Yamashiro, T. 2011. Sox9 Expression during Fracture Repair. *Cells Tissues Organs,* 194:38–48.
135. Shoji, T.; Li, M.; Mifune, Y.; Matsumoto, T.; Kawamoto, A.; Kwon, S.; Kuroda, T.; Kuroda, R.; Kurosaka, M. & Asahara, T. 2010. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab Invest.* 90:637–649.
136. Smith, R.K.W.; Korada, M.; Blunn, G.W. & Goodship, A.E. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J.* 35:99-102.
137. Smith, N.; Dong, Y.; Lian, J.B.; Pratap, J.; Kingsley, P.D.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Schwarz, E.M.; O'Keefe, R.J.; Stein, G.S & Drissi, M.H. 2005. Overlapping expression of Runx1 (Cbfa2) and Runx2 (Cbfa1) transcription factors supports cooperative induction of skeletal development. *J Cell Physiol.* 203:133–143.
138. Soung, D.; Talebian, L.; Matheny, C.; Guzzo, R.; Speck, M.; Lieberman, J.; Speck, N. & Drissi, H. 2012. Runx1 dose-dependently regulates endochondral ossification during skeletal development and fracture healing. *J Bone Miner Res.* 27:1585–1597.
139. Spencer, N.; Gimble, J. & Lopez, M. 2011. Mesenchymal Stromal Cells: Past, Present, and Future. *Vet Surg.* 40:129–139.

140. Sporn, L.A.; Chavin, S.I.; Marder, V. & Wagner, D. 1985. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest.* 76:1102.
141. Stephan, S.J.; Tholpady, S.S. & Gross, B. 2010. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *Laryngoscope.* 120:895–901.
142. Taichman, R. 2005. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood;* 105: 2631-2639.
143. Taghi, M.B.; Kashani, H.G.; Taghi, L.; Leili, H. & Leyla, M. 2012. *Cell Biol Int.* 36:1239–1249.
144. Teitelbaum, S. 2000. Bone resorption by osteoclast. *Science.* 289:1504-1508.
145. Terskikh, A.V.; Easterday, M.C.; Li, L.; Hood, L.; Kornblum, H.I.; Geschwind, D.H. & Weissman, I.L. 2001. From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7934-7939.
146. Tsai, H.M. 1996. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood.* 87:4235-4244.
147. Tuglu, M.I.; Ozdal-Kurt, F.; Koca, H.; Sarac, A.; Barut, T. & Kazanc, A. 2010. The contribution of differentiated bone marrow stromal cell-loaded biomaterial to treatment in critical size defect model in rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 16:783–792.
148. Uccelli, A.; Pistoia, V. & Moretta, L. 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 28:220-226.
149. Utvåg, S.E., Grundnes, O., Rindal, D.B. & Reikerås, O. 2003. Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. *J Orthop Trauma.* 17:430–435.

150. Vortkamp, A.; Pathi, S.; Peretti, G.M.; Caruso, E.M.; Zaleske, D.J. & Tabin, C.J. 1998. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev.* 71:65-76.
151. Wang, Q.; Huang, C.; Xue, M. & Zhang, X. 2011. Expression of endogenous BMP-2 in periosteal progenitor cells is essential for bone healing. *Bone.* 48:524–532.
152. Wang, M.; Crisostomo, P.; Herring, C.; Meldrum, K. & Meldrum, D. 2006. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *AJP-Regul Interg Comp Physiol.* 291:880-83.
153. Weatherholt, A.; Fuchs, R. & Warden, S. 2013. Cortical and trabecular bone adaptation to incremental load magnitudes using the mouse tibial axial compression loading model. *Bone.* 52:372–379.
154. Williams, K.J.; Picou, A.A.; Kish, S.L.; Giraldo, A.M.; Godke, R.A. & Bondioli, K.R. 2008. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. *Cells Tissues Organs.* 188:251– 258.
155. Yamaguchi, A.; Komori, T. & Suda, T. 2000. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 21:393-411.
156. Yang, Q.; Peng, J. & Lu, S.B. 2011. Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing. *Chin Med J.* 124:3930-3938.
157. Yoshikawa, T.; Mitsumo, H.; Nonaka, I.; Sen, Y.; Kawanishi, K.; Inada, Y.; Takakura, Y.; Okuchi, K. & Nonomura, A. 2008. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg.* 121:860-77.

158. Young, H.E.; Mancini, M.L.; Wright, R.P.; Smith, J.C.; Black, A.C.; Reagan, C.R. & Lucas, P.A. 1995. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn.* 202:137-144.
159. Zaragosi, L.E.; Ailhaud, G. & Dani, C. 2006. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose -derived stem cells. *Stem Cells.* 24:2412-2419.
160. Zelzer, E.; Glotzer, D.J. & Hartmann, C. 2001. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev.* 106:97-106.
161. Zhu, S.; Zhang, B. & Man, C. 2011. NEL-like-molecule-1-modified bone marrow mesenchymal stem cells/poly lacticco-glycolic acid composite improves repair of large osteochondral defects in mandibular condyle. *Osteoarthr Cartil.* 19:743–750.
162. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizumo, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P. & Hedrick, M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211-228.