

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TOTALIDAD DE CRÉDITOS Y ALTO NIVEL ACADÉMICO

SERVICIO MÉDICO QUIRÚRGICO EN PERROS Y GATOS

“EMPLEO DE CÉLULAS TRONCALES EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
ARTICULARES Y MUSCULOESQUELÉTICAS EN PERROS Y GATOS”

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

César Othón Del Molino Sotelo

Número de Cuenta: 408007517

Asesor:

MVZ. MC. Eduardo Carlos Santoscoy Mejía

Mexico D.F. 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

1.- A mi madre *Hilda Sotelo Olvera* por ser una madre ejemplar, ayudarme a vivir la vida y darme todo y más de lo que una madre puede dar, mi carrera y mi vida profesional están dedicados a ti. Te amo y te estoy eternamente agradecido.

2.- A mi hermana *María del Carmen Del Molino Sotelo* por ser la mejor amiga, confidente y persona con la que pude compartir y recorrer mi vida. Te amo y siempre te llevare como parte de mí; gracias por darme el mejor regalo que un hermano puede querer, a la sobrina más hermosa del universo. Te amo Sandy.

3.- A mi novia *María Yartzeth Rodríguez Rodríguez* por ser mi alma gemela y haberte podido encontrar, por darme siempre valor y alentarme a vivir la vida. Te amo y no podría estar más convencido de que quiero vivir cada segundo de mi vida a tu lado. Eres mi todo.

4.- A mi tía y segunda madre *Yolanda Sotelo y Olvera* por ser un ejemplo de vida, una persona llena de bondad a la cual admiro y respeto tanto profesional como personalmente. Te amo tía y gracias por estar siempre ahí para todos nosotros.

5.- A la familia *Rodríguez Rodríguez (Juan Manuel, Concepción, Claudia, Esther, Alfonso)* por haberme abierto las puertas de su casa y tratarme como un segundo hijo. Saben lo mucho que los quiero.

6.- A mis mejores amigos *Pablo Cogis, Edgar Flores, Miguel Segoviano, Ernesto Domínguez, Hasibi Zavala* porque compartí alegrías y tristezas con cada uno de ustedes, siempre me enseñaron que son la familia que elegí después de nacer y que sin importar la distancia a pesar de que se encuentren a muchos kilómetros de mí, siempre estarán a mi lado y siempre los llevaré conmigo.

7.- A mi asesor el Dr. *Carlos Santoscoy* por haberme apoyado para desarrollar mi trabajo y haberme inculcado el amor por la ciencia.

8.- Al Dr. *Antonio Claudio* por haberme hecho amar la ortopedia.

9.- A todo el equipo Banfield México son un gran equipo y no puedo mencionarlos a todos pero saben que todos forman parte de mí. Particularmente quiero agradecer al Lic. *Adrián Rodríguez*, Dr. *Fausto Reyes*, Dr. *Fernando Vázquez*, Dr. *Luis Tello*, Dr. *Gerardo Vera* porque me han hecho un gran profesional y cada día me demuestran que nunca dejo de aprender y que son mis mentores en todos y cada uno de los aspectos de mi vida personal y profesional. Gracias por haberme dado tanto.

10.- A la Dra. *Sara Caballero* y Dra. *Dinnorah Vargas* porque me dieron una oportunidad única en la vida, han sido increíbles amigas, jefas y personas que tuve la fortuna de encontrar en mi camino. Les estaré por siempre agradecido.

11.- A mis mentores y amigos Dra. *Valeria Aguilar* y Dr. *Ricardo Czaplewski* por haberme dado una visión integral de la vida y formado como médico veterinario. Gracias por haberme permitido descubrir la profesión que amo y darme valores que no tienen precio.

12.- Al Dr. *Luis Armijo* por haberme hecho descubrir el amor por la investigación.

Contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes	6
Objetivo	16
Líneas celulares y su aplicación terapéutica.....	17
Células madre mesenquimales (o células troncales mesenquimales)	19
Migración de las células troncales mesenquimales	21
Plasticidad de las células troncales mesenquimales	22
Algunos métodos de obtención y aislamiento.....	24
Algunos mecanismos o vías de señalización involucrados en la diferenciación de células troncales en progenitores celulares óseos durante la fase de reparación ósea	27
Aplicaciones de las MSC en el tratamiento de enfermedades articulares y musculoesqueléticas en medicina veterinaria y medicina humana	28
Limitaciones del uso de células troncales como tratamiento en enfermedades articulares y musculoesqueléticas.....	33
Conclusión	36
Abreviaturas	37
Bibliografía.....	38

Resumen

DEL MOLINO SOTELO CÉSAR OTHÓN, “EMPLEO DE CÉLULAS TRONCALES EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ARTICULARES Y MUSCULOESQUELÉTICAS EN MEDICINA VETERINARIA”, ASESOR: MVZ. MC. EDUARDO CARLOS SANTOSCOY MÉJIA

En la mayoría de los mamíferos, después de la fertilización, los gametos forman una sola célula llamada cigoto que inicialmente se divide en células idénticas, también llamadas totipotenciales, que tienen la capacidad de formar órganos completos. Las células multipotenciales se han detectado en diversos tejidos en el adulto. Las células troncales mesenquimales o células madre mesenquimales residen en el compartimento estromal de la médula ósea y fueron identificadas en un principio por Friedenstein y Petrakova (1966). Una capacidad que tienen las células madre es la de dejar su tejido “nido” y circular por el flujo sanguíneo. Para poder expresar su programa de diferenciación, la célula madre circulante debe alcanzar el microambiente apropiado. Las patologías ortopédicas como: fracturas, faltas de unión, uniones demoradas, defectos óseos y enfermedades óseas como osteonecrosis han sido tratadas a lo largo de la historia con procedimientos quirúrgicos con injertos óseos autólogos o alogénicos, que han mostrado resultados favorables para la mayoría de los casos (en cuanto a los injertos autólogos). No obstante, debido al potencial de transmisión de otras patologías con el uso de injertos óseos (VIH entre otros) la medicina regenerativa está tomando un lugar importante en el tratamiento de distintas enfermedades articulares y musculoesqueléticas. La terapia celular con células troncales, se refiere al uso de las mismas para regenerar o sustituir células o los tejidos dañados y restaurar la función alterada por malformaciones congénitas, genéticas, enfermedades y traumatismos, entre otros. Las células troncales pueden ser administradas vía endovenosa o directamente sobre el tejido dañado (*International society of stem cells therapies, 2013*), resultando de gran apoyo en los tratamientos antes mencionados, disminuyendo de manera importante el riesgo de infección de enfermedades como VIH o hepatitis.

Introducción

En la mayoría de los mamíferos, después de la fertilización, los gametos forman una sola célula llamada cigoto. Inicialmente se divide en células idénticas referidas como **totipotenciales**, que tienen el potencial de formar órganos completos. Estas células totipotenciales forman una esfera hueca de células llamada **blastocisto**. Las células que forman la pared interna del blastocisto son **pluripotenciales** y pueden formar muchos tipos de células, sin embargo, no pueden dar origen a todas las células necesarias para el desarrollo fetal. Estas células pluripotenciales pasan por procesos subsecuentes de especialización, que las comprometen aún más en cuanto a los tejidos que formarán, volviéndose así en células **multipotenciales**.^{1,15}

Por lo tanto, el cigoto se sitúa al inicio del desarrollo embrionario mientras que las células troncales somáticas se sitúan al inicio del (los) linaje (s) que componen un tejido determinado.¹

Las células multipotenciales han sido detectadas en una gran cantidad de tejidos en el adulto. Generalmente no cambian su proceso de diferenciación para formar células o tejidos, sin embargo, diversos estudios han demostrado que existe “flexibilidad inherente”, inclusive en aquellas que se han vuelto más especializadas, y que por lo tanto pueden ocurrir algunas circunstancias que las hagan capaces de diferenciarse en distintos tipos de células. **(Fig. 1)**^{1,2,3}

Células troncales durante el desarrollo embrionario en mamíferos

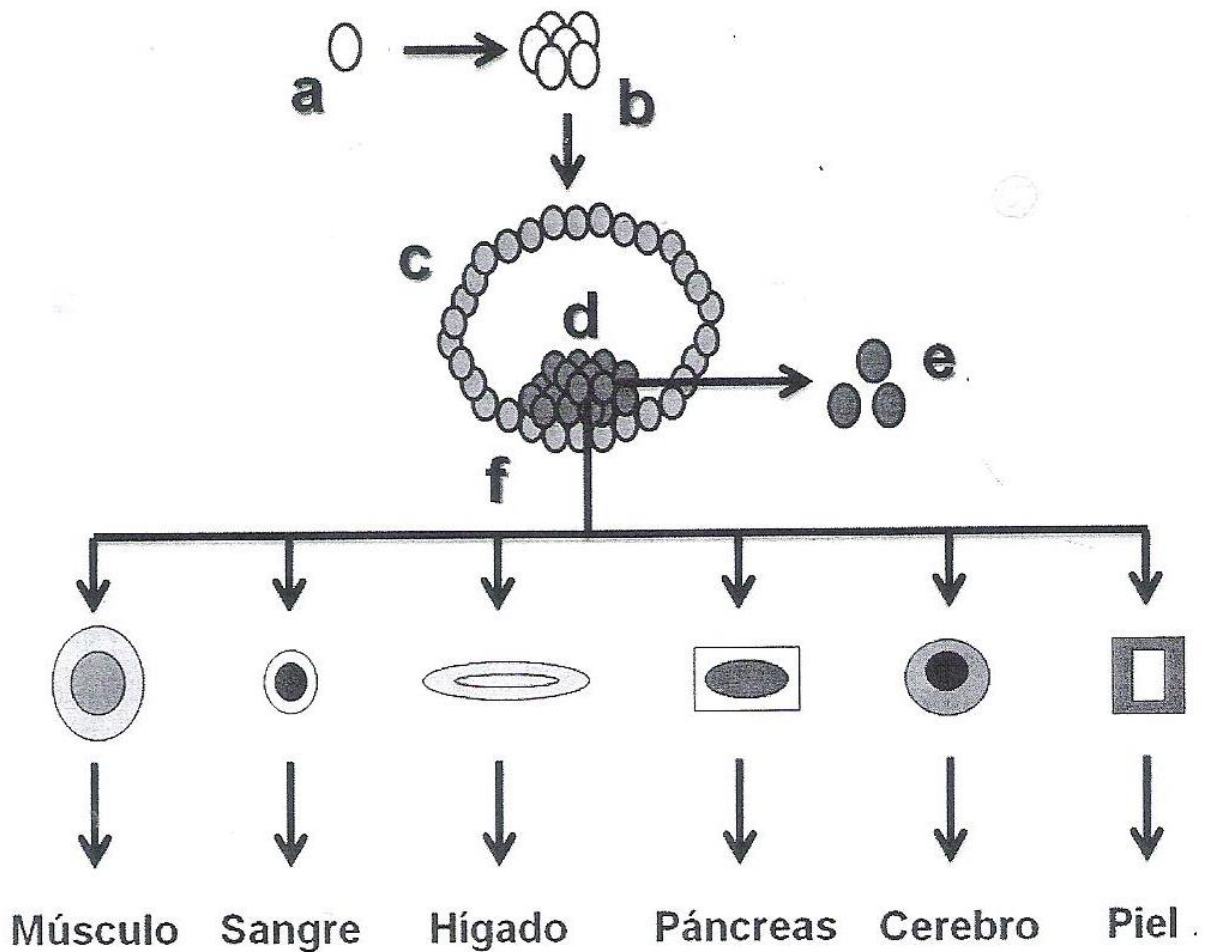


Fig. 1. El cigoto (a) es una célula troncal totipotencial (da origen al embrión y a las estructuras extraembrionarias). Al autorreplicarse, genera varias células idénticas a ella (b), las cuales constituyen el estado de mórula. En el estado de blastocisto (c), las células de la masa celular interna (d) corresponden a células troncales embrionarias pluripotenciales (pueden formar células de cualquier tejido embrionario). Dichas células troncales embrionarias dan lugar a células troncales de la línea germinal (e), o bien, a células troncales somáticas (f) de las tres capas embrionarias: Ectodermo (ej. piel y cerebro), endodermo (ej. hígado y páncreas) y mesodermo (ej. sangre y músculo). Pelayo R, Santa – Olalla J. Células troncales y medicina regenerativa. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2011.

Una célula troncal debe cumplir con ciertos criterios funcionales, ya que éstas no poseen características morfológicas que puedan distinguirlas del resto de las células del tejido al que pertenecen. De acuerdo con esto, las células troncales se han definido como células inmaduras no diferenciadas, con alta capacidad de autorreplicación y que pueden diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo. ^{1,16,17.}

Cuando una célula troncal se divide, por lo menos una de las dos células resultantes conserva casi la totalidad de las características biológicas de la célula original, es decir, la célula troncal se ha autorreplicado, produciendo una nueva célula troncal. En algunos casos, ambas células resultantes son células troncales, en otros, solo una de las dos células generadas conserva las propiedades de “troncalidad”, mientras que la otra pierde la capacidad de autorreplicarse (**Fig. 2**).^{1,17.}

Definición funcional de célula troncal

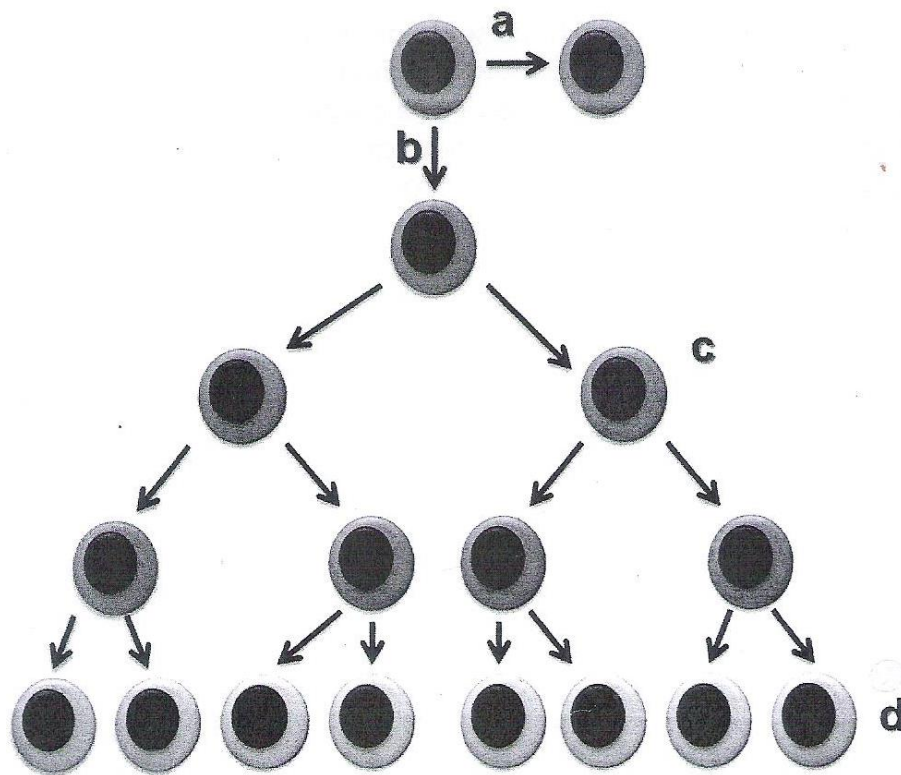


Fig. 2. Las células troncales son células *inmaduras*, no diferenciadas, que tienen la capacidad de autorreplicarse (a) y de diferenciarse (b), dando origen a uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo (d). Entre las células troncales y las células maduras existen poblaciones de células transitorias (c) que permiten la amplificación de células maduras. Pelayo R, Santa – Olalla J. Células troncales y medicina regenerativa. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2011.

Las células madre mesenquimales o células troncales mesenquimales (**MSC**, **Mesenchymal Stem Cells**) se han aislado a partir de casi todos los órganos, incluyendo la médula ósea, periosteo, tejido adiposo, tejido sinovial, tejido músculo esquelético, sangre del cordón umbilical y sangre periférica. ^{16, 18, 13.}

Entre las células troncales y su progenie totalmente diferenciada, existen poblaciones intermedias de células progenitoras/ precursoras, las cuales no son capaces de autorreplicarse, poseen capacidades proliferativas limitadas y un restringido potencial de diferenciación. Una de las principales funciones de estas poblaciones intermedias es incrementar el número de células diferenciadas por cada división de las células troncales.¹

En resumen, las células troncales se definen por la capacidad de autorenovación, es decir, de producir células idénticas a la inicial (lo que permite el mantenimiento de la población de células troncales) y por el potencial para generar múltiples y distintas células diferenciadas.^{1, 16, 17, 18.}

Antecedentes

La presencia de células troncales no hematopoyéticas residentes en médula ósea fueron mencionadas en un inicio por el patólogo alemán Cohnheim hace poco más de 130 años. En sus trabajos, se mencionaba la posibilidad de que la médula ósea fuera quizás la fuente de fibroblastos que depositaban las fibras de colágena como parte de un proceso natural de reparación de heridas.⁹

Las células troncales mesenquimales o células madre mesenquimatosas o mesenquimales, que residen en el compartimento estromal de la médula ósea fueron identificadas en un principio por Friedenstein y Petrakova (1966) que aislaron células progenitoras formadoras de hueso de la médula ósea de rata y las denominaron como unidades formadoras de colonia de células similares a fibroblastos¹⁹. Dichas células tenían características adherentes, clonogénicas, no fagocíticas y de tipo fibroblastoide.

(CFU-F, *Cell – Forming Units – Fibroblasts*) Debido a que la médula ósea o las células trabeculares óseas tienen gran potencial osteogénico, ha sido muy práctico por muchos años el obtener médula ósea ya sea del esternón (humanos) o bien de la cresta iliaca para utilizarse como injerto y poder así estimular la reparación ósea. ^{1,2,9}

El término de célula madre mesenquimal o célula troncal mesenquimal fue introducido por Caplan, quien sugirió la existencia de una célula con potencial mayor a la descrita por Owen (“célula primitiva con la capacidad de originar fibroblastos, células reticulares, adipocitos y células osteogénicas”), la cual tiene la capacidad para diferenciarse hacia múltiples fenotipos mesenquimales como tejido adiposo, tendón, ligamento, músculo y hueso, nombrando a este proceso **mesengénesis (Fig. 3)**.^{1, 15.}

Proceso de Mesengénesis que ocurre en una célula troncal mesenquimal

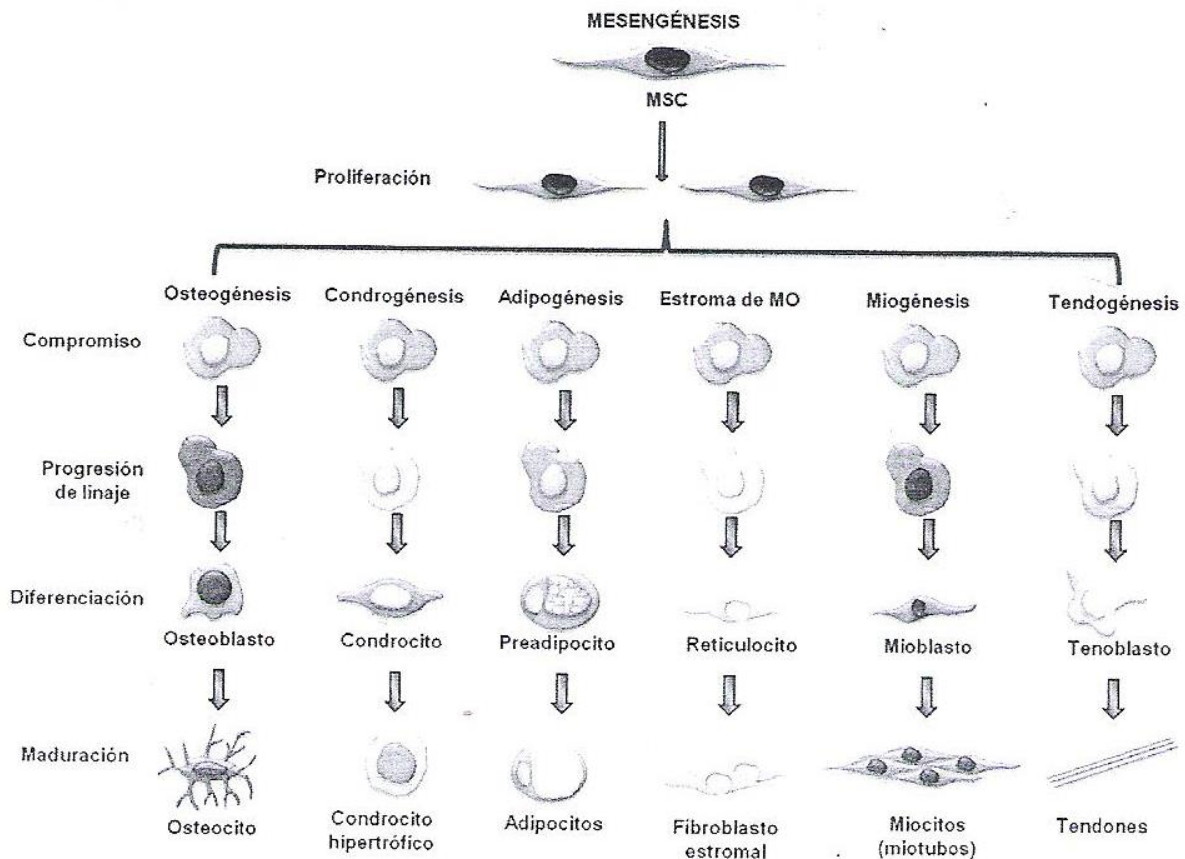


Fig. 3. En el proceso de mesengénesis, las células MSC comienzan a proliferar, y posteriormente adquieren un compromiso celular, el cual va a determinar el tipo de tejido que formarán. Pelayo R, Santa – Olalla J. Células troncales y medicina regenerativa. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2011.

En la práctica ortopédica en pequeñas especies se han utilizado terapias celulares para la reparación ósea empleando principalmente injertos óseos autólogos. En pequeñas especies, el uso del aspirado celular autólogo o de concentrado plaquetario para el

tratamiento de diversas afecciones ortopédicas, tiene como finalidad el estimular la reparación ósea.

En grandes especies se ha utilizado en la reparación de fracturas y ha sido complementaria en técnicas de artrodesis, sin embargo existen otras aplicaciones como el tratamiento de quistes óseos.

Existen factores importantes en los cuales la utilización de injertos ortopédicos o tratamientos celulares se vuelven una alternativa con grandes beneficios, principalmente en la pérdida de tejido, reparaciones deficientes, grandes áreas de tensión o estrés, así como infecciones.⁴

Los mecanismos activados para efectuar la reparación ósea son análogos al desarrollo y formación del hueso en sus primeras etapas (osteogenesis). La principal diferencia es que la reparación de una fractura es precedida por una respuesta inflamatoria e incremento subsecuente en el aporte sanguíneo en dicha región. La reparación ósea representa una serie de procesos que se superponen entre sí, muy similares a la reparación de cualquier herida, en la cual se incluye un proceso inflamatorio, una fase de reparación y una fase de remodelación. La fase de la inflamación dura las primeras 2 o 3 semanas después del momento de la lesión y las respuestas celulares son activadas para comenzar el proceso de reparación ósea y proteger el tejido de cicatrización de alguna infección. El reclutamiento celular inicialmente lleva al remplazo de hematoma en el sitio de fractura con tejido fibroso y de manera progresiva a matriz cartilaginosa. A medida que la estabilidad en el sitio de fractura incrementa, la capa de matriz cartilaginosa es remplazada por hueso por medio de osificación endocondral,

tanto en el callo perióstico como endostial, dando como resultado la estabilidad interfragmentaria. A continuación se lleva a cabo un puenteo óseo en el sitio de fractura, en un periodo de meses o años, y la fase de remodelación se vuelve dominante con una remodelación osteonal para reemplazar y vascularizar de manera continua el nuevo hueso.

El reclutamiento de células mesenquimales estromales en el sitio de la fractura es crucial para su reparación. Dichas células residen en la médula ósea en pequeñas densidades (1 por cada 100 000 células en la médula ósea aproximadamente). Otras fuentes de células estromales incluyen las poblaciones de monocitos circulantes. Muchas vías de señalización durante la osteogénesis embrionaria que también se involucran en el reclutamiento celular y la diferenciación celular, se encuentran activos en la zona de fractura durante el proceso de reparación. **(Fig. 4)**

Diferenciación de una célula progenitora estromal mesenquimal

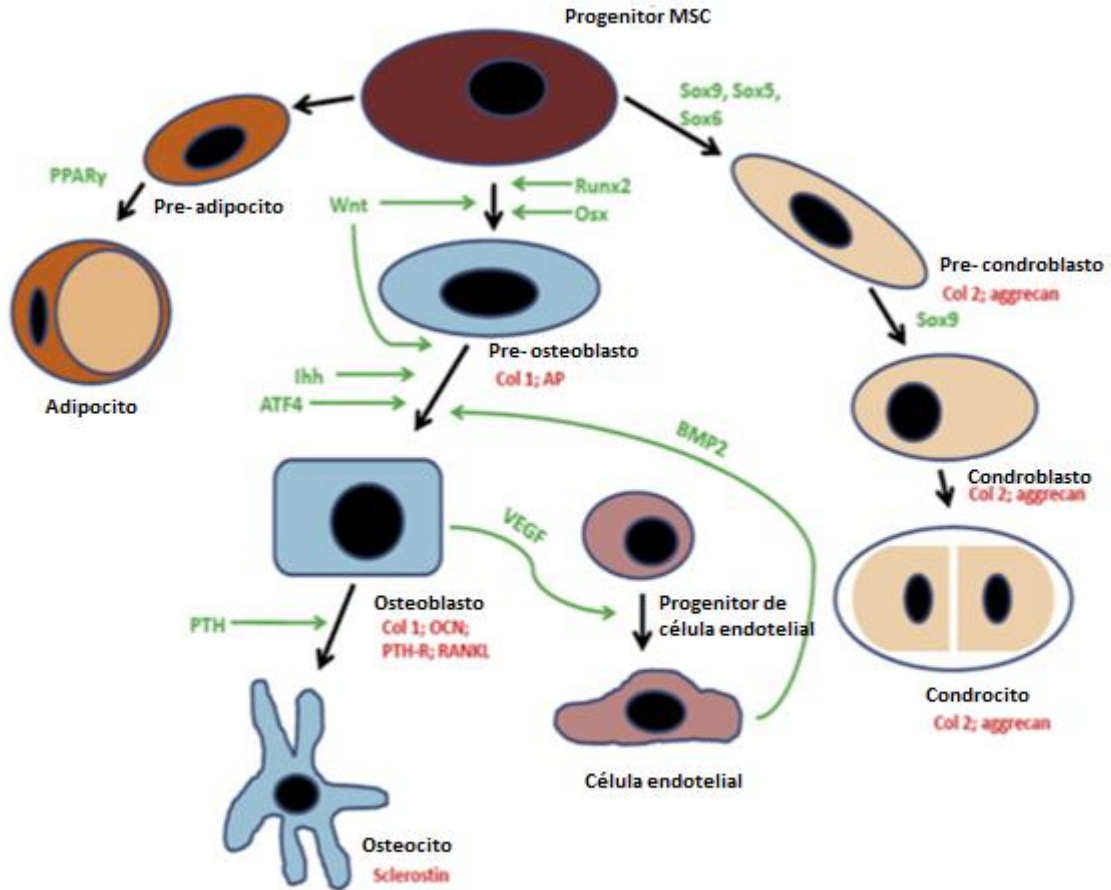


Fig. 4. Los factores estimulantes se representan en color verde. Los productos genéticos se muestran de color rojo. Milner *et al.* Stem Cell – based Therapies for Bone Repair. Stem Cells and Bone Repair (2011). Vet Clin Equine 27 (2011) 299 – 314. doi:10.1016/j.cveq.2011.05.002

La hipoxia y la ruptura vascular en el sitio de la fractura sirven como estímulos adicionales a la diferenciación celular y a la regeneración ósea. **(Fig. 5)**

Neovascularización desarrollada en un sitio de fractura

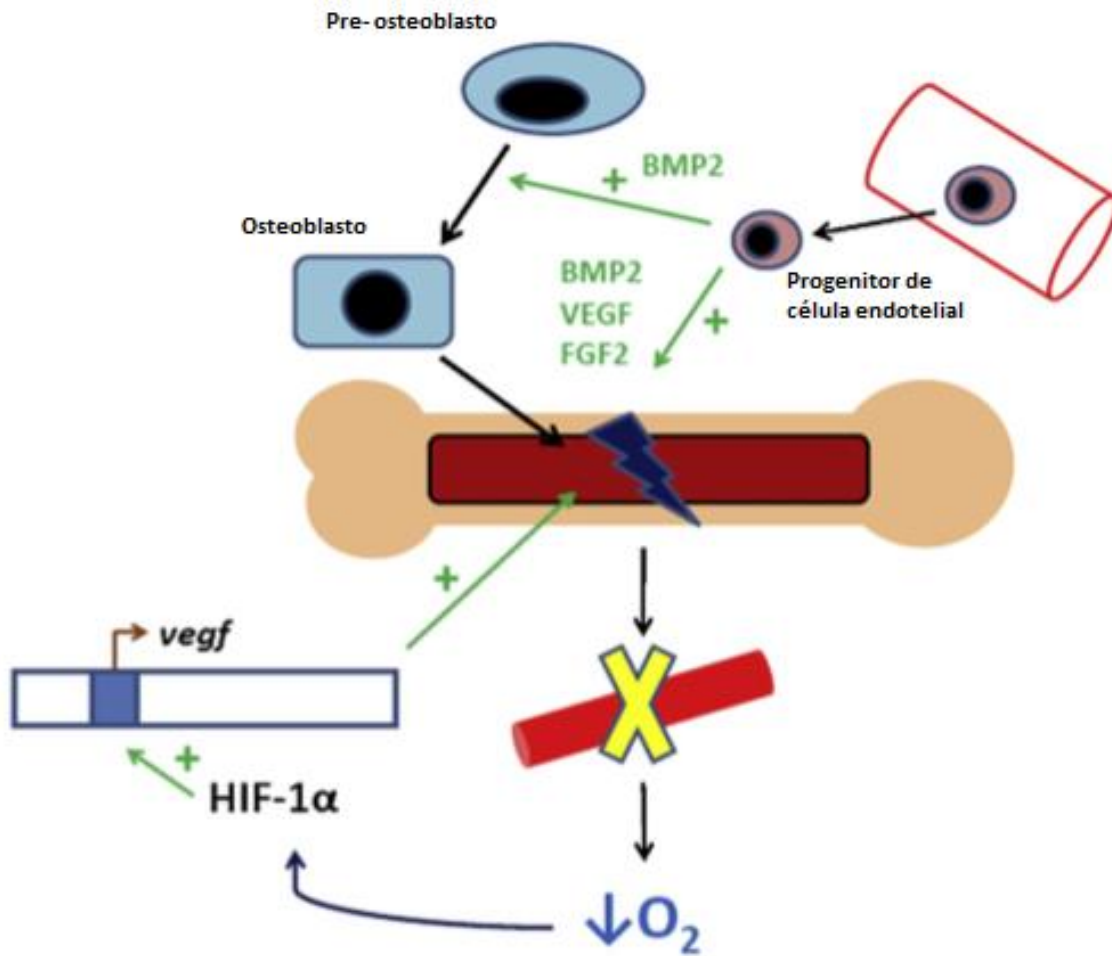


Fig. 5. Esquema representativo de cómo la ruptura vascular y la hipoxia en el sitio de la fractura estimulan la diferenciación celular y la neovascularización. Estos procesos estimulan la movilización de células progenitoras endoteliales circulantes que actúan directamente en la neovascularización y contribuyen de manera paracrina en la reparación. Milner *et al.* Stem Cell – based Therapies for Bone Repair. Stem Cells and Bone Repair (2011). Vet Clin Equine 27 (2011) 299 – 314. doi:10.1016/j.cveq.2011.05.002

La **neovascularización** es un proceso crítico requerido para la reparación ósea. El aporte sanguíneo puede llevarse a cabo por medio de angiogénesis a partir de vasos preexistentes al igual que por las células progenitoras endoteliales, que pueden actuar de manera directa en la neovascularización así como por medio de factores de crecimiento secretados de forma paracrina como PMO, FCE y el factor de crecimiento de fibroblastos básico – 2 (FGF -2, *Fibroblast Growth Factor 2*).¹⁰

La habilidad de las células estromales para sobrevivir y contribuir a la reparación ósea depende de factores como la estabilidad de los fragmentos, la vascularización, la expresión de factores de crecimiento y otros factores celulares.

Algunas estrategias que minimizan la inflamación en el sitio de la fractura y promueven la neovascularización de manera rápida, pueden ayudar a facilitar las respuestas de las células osteoprogenitoras y acelerar la reparación.⁴

La EAD (ocasionalmente referida como osteoartritis) representa la mayor causa de dolor crónico en perros en Estados Unidos de América, con más del 20%, o bien de 10 a 12 millones de perros afectados (2008).^{5,6} Sin embargo, en gatos, es una enfermedad difícil de detectar que se ha determinado que más del 90% de gatos entre 6 meses y 20 años presentan por lo menos una articulación con signos radiográficos compatibles con EAD.^{22, 23, 24,25.}

Dicha enfermedad es progresiva y puede tener bajo grado de inflamación que afecta tanto a los tejidos articulares como a los tejidos periarticulares incluyendo la cápsula articular, el cartílago articular, el espacio sinovial y el hueso subcondral. Se ha aceptado que la combinación de factores bioquímicos y biomecánicos son los responsables de

ocasionar sinovitis y la degeneración del cartílago articular, así como la pérdida de matriz celular. En algunos casos se puede dar como resultado la pérdida total de la superficie articular. (**Fig. 6**).^{7,20, 21, 22,23, 24, 25.}

Enfermedad Articular Degenerativa (EAD) de la rodilla de un perro



Fig 6. Se observa la presencia de entesofitos en áreas de inserción capsular y ligamentosa (A), osteofitos pericondrales sobre el borde del cartílago articular (B), osteosclerosis subcondral (C) y calcificación intraarticular (D) Brusa, Boccia. Enfermedad articular degenerativa canina: consideraciones sobre el manejo médico terapéutico. ¿Son los condoprotectores una alternativa? ISSN 1514-2590. ANALECTA VETERINARIA 2000; 20, 1: 5 -13.

Los condrocitos que son las células del cartílago articular, mantienen la homeostasis en la síntesis y degradación de la matriz extracelular secretando componentes macromoleculares (colágena, glicosaminoglicanos, y ácido hialurónico).

La secreción de mediadores líticos que dañan a los tejidos (citoquinas, radicales libres, proteasas, prostaglandinas) son controlados por un balance de sustancias anabólicas y reparativas (factores de crecimiento, inhibidores y citoquinas catabólicas) así como por inhibidores de las enzimas degradadoras. En esta patología, existe sobreproducción de mediadores proinflamatorios y líticos en relación con los mediadores inhibitorios, dando como resultado un balance positivo a favor del catabolismo en función del anabolismo, que conlleva a la destrucción del cartílago articular. Es por eso que con tantos pacientes afectados por dicha enfermedad, así como la incapacidad de utilizar de manera prolongada antiinflamatorios no esteroideos (AINES) sin tener efectos colaterales han propuesto la utilización de terapias celulares como una alternativa factible.^{5,6,7,8}

Objetivo

El objetivo de este trabajo es presentar las ventajas de la terapia de células madre mesenquimatosas como uso complementario en el tratamiento de patologías musculoesqueléticas que afectan a perros y gatos, principalmente en el caso de fracturas o en enfermedad articular degenerativa (EAD) sobre todo en pacientes gerontes.¹

Es importante resaltar, que dicho tratamiento representa un complemento en el manejo de enfermedades musculoesqueléticas, ayudando tanto a la reparación como a retrasar los procesos degenerativos derivados de las mismas.

Es necesario establecer un protocolo terapéutico para determinar la aplicación óptima para el tratamiento de dichas patologías, por lo que el presente trabajo no pretende determinar un patrón a seguir, sino el presentar el uso de las células madre para así establecer con base en el criterio de cada profesional veterinario y a cada paciente o bien para asentar las bases para su futura investigación y desarrollo como esquema de tratamiento.

Líneas celulares y su aplicación terapéutica

Las MSC además de dar origen a distintas líneas celulares previamente mencionadas, pueden generar progenitores comprometidos con una o más líneas celulares con un grado aparente de plasticidad o interconversión ¹.

La principal capacidad que tienen las células madre, es la de dejar su tejido inicial y circular por el flujo sanguíneo. Sin embargo, para poder expresar su programa de diferenciación, una célula madre circulante debe alcanzar el microambiente apropiado, es decir, el ambiente que contenga las condiciones aptas para su diferenciación.^{11, 12}

A continuación se presenta una tabla en la cual se hace referencia a las distintas células madre y las líneas celulares o células a las que pueden dar origen. Dicha tabla hace referencia a células madre de humano y a algunas de los órganos de donde se pueden obtener dichas células.

Células madre y su linaje

Célula madre	Localización (origen)	Células producidas
Hematopoyética	Médula ósea	Células sanguíneas, endoteliales, hepáticas y musculares
Neural	Cerebro	Neuronas, astrocitos, oligodendrocitos.
Epitelial	Vísceras, epidermis	Todas las células en las criptas epiteliales, todas las células en las capas epidérmicas.
Mesenquimal	Médula ósea	Hueso, cartílago, tendones, tejido adiposo, muscular, estroma medular, y células neurales.
Embriónica	Blastocisto. Células primordiales de la masa interna	Todas las células

Tabla.7 Origen de algunas células madre en humanos y las líneas que producen. Minguell *et al.* Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine* (2001). 226:507-520. Unidad de Biología Celular. Universidad de Chile.

Las MSC pueden diferenciarse en varias líneas celulares del mesodermo (capa germinal que origina sangre, tejido óseo, músculo, cartílago y tejido adiposo). Teóricamente, la diferenciación mesodérmica es fácil de alcanzar por las MSC debido a que tienen el mismo origen embrionario^{11,13}; ectodermo (capa que origina piel y linajes neurales) y endodermo (capa que origina tejidos de los tractos respiratorios y digestivo) bajo condiciones específicas *in vitro*. La diferenciación también está regulada por

diversos eventos genéticos que involucran distintos factores de transcripción. La diferenciación hacia un camino fenotípico en particular puede ser controlada por algunos genes reguladores que pueden inducir la diferenciación de células progenitoras en líneas celulares específicas. Además de los factores de crecimiento y de sustancias químicas inductoras, un microambiente elaborado con “andamios” hechos de biomateriales pueden proveer a las MSC con condiciones apropiadas para su proliferación y su diferenciación.¹¹

Otra capacidad que tienen las MSC es la de regular la función de diferentes componentes del sistema inmune, entre ellos los linfocitos T (**LT**), las células dendríticas (**DC, Dendritic Cells**), los linfocitos B y las células NK (**Natural Killer**). Este efecto inmunoregulador de las MSC puede darse a través de contacto celular y/o mediante la secreción de diversos factores.^{11, 18.}

Células madre mesenquimales (o células troncales mesenquimales)

La médula ósea (**MO**) es un órgano donde se localizan tanto las células troncales hematopoyéticas (**HSC, Hematopoyetic Stem Cells**) como las MSC. Las HSC son las células troncales que más se han caracterizado y mantienen la producción de células sanguíneas (hematopoyesis) a lo largo de la vida de un individuo. Las MSC originan a la mayoría de las células que constituyen el estroma de la médula ósea encargado de mantener la formación de hueso, cartílago y músculo.^{13, 25} Se ha demostrado en diversos estudios que las MSC tienen el potencial para ser inducidas a linajes neuroectodermales y endodermales, incluyendo neuronas y hepatocitos, propiedad

descrita como plasticidad. Esta capacidad de diferenciación hacia distintos linajes, pero además la de mantener la formación de células sanguíneas e incluso la de inmunosupresión, les han otorgado un gran potencial clínico.^{1,13}

En la MO existen dos sistemas, el sistema hematopoyético (capaz de formar a todas las células sanguíneas) y el sistema estromal, definido de manera tradicional como el soporte sobre el cual proliferan y se diferencian las células hematopoyéticas. El sistema estromal consiste de una población heterogénea de células que incluyen células reticulares, adipocitos, osteoblastos, células endoteliales vasculares, células de músculo liso del endotelio vascular y macrófagos; las cuales participan todas de manera activa en la producción hematopoyética, debido a su capacidad de secreción de proteínas de matriz extracelular y citosinas, tanto inhibitoras como estimulantes, y con ello conforman lo que se conoce como microambiente hematopoyético.^{1, 15.}

Si se considera al sistema estromal como un tejido, en muchas especies de mamíferos este tejido tiene la capacidad de regenerarse tras sufrir daños severos por distintos mecanismos. La regeneración de dicho tejido se lleva a cabo, tanto posterior a un daño como de manera fisiológica para mantener la homeostasis del organismo mismo, a partir de una población de MSC.¹

Migración de las células troncales mesenquimales

Estudios recientes han revelado que las células madre son altamente migratorias y parecen ser atraídas a zonas con patologías, entre ellas, las patologías cerebrales o en regiones isquémicas. Se ha observado que las MSC humanas transplantadas en fetos de ovejas se han incrustado en diversos tejidos (médula ósea, bazo, timo, hígado).^{9,19} Las células hematopoyéticas circulantes atraviesan de manera activa el endotelio vascular de distintos órganos hacia sus nichos. La migración también forma parte de la capacidad de respuesta de defensa y reparación del huésped. Los factores de crecimiento, las moléculas de adhesión, entre otros, son señales para el efecto migratorio de manera directa.^{1, 9, 15.}

La terapia con células troncales, se refiere al uso de las mismas para regenerar o sustituir células o los tejidos dañados y restaurar la función alterada por causas que comprenden malformaciones congénitas, genéticas, enfermedades y traumatismos. Las células troncales pueden ser administradas vía endovenosa o directamente en el tejido dañado (*International society of stem cells therapies*).

Las MSC poseen cuatro propiedades biológicas que las hacen candidatos especiales para emplearlas en la terapia celular: baja inmunogenicidad, amplio potencial de diferenciación, capacidad de secretar factores que favorecen la remodelación de tejidos y tienen propiedades inmunorreguladoras. Debido a estas características, son numerosos los padecimientos en los que las MSC son potencialmente aplicables entre

los cuales se encuentran: enfermedad injerto contra hospedero, enfermedades autoinmunes, patologías óseas, cartilagosas, renales, pulmonares, hepáticas, cardiovasculares y neurológicas.^{1, 2, 5, 8, 18}

Para su uso clínico, las MSC deben ser expandidas en cuartos especializados con flujo laminar (*Stem Cell Factory*) y bajo estrictos estándares de control de higiene y calidad.¹⁷

Plasticidad de las células troncales mesenquimales

Uno de los primeros eventos en el desarrollo de los vertebrados es la integración de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y finalmente endodermo. Para que todo esto se lleve a cabo, es necesaria la expresión secuencial de una gran cantidad de genes y una vez presentadas dichas decisiones, los eventos son perdurables y todas las células que se producen subsecuentemente, como las troncales, progenitoras y maduras de cada capa germinal, mantendrán de manera irreversible la especificidad de linaje a lo largo de la vida de un individuo.^{26, 15, 14.}

Trabajos recientes han cuestionado la restricción de linaje por parte de las células troncales y se ha instaurado el concepto de plasticidad. Se entiende por plasticidad como la capacidad que tienen las células para formar un tejido esperado (debido al compromiso con dicho linaje) o bien para formar otro no esperado, por lo tanto, pueden traspasar esos límites en cuanto a su origen de capa germinal y “transdiferenciarse” en respuesta a señales regenerativas microambientales. Es decir, se puede dar la conversión de una célula de un linaje específico en otra de un linaje distinto.**(fig 8)**¹

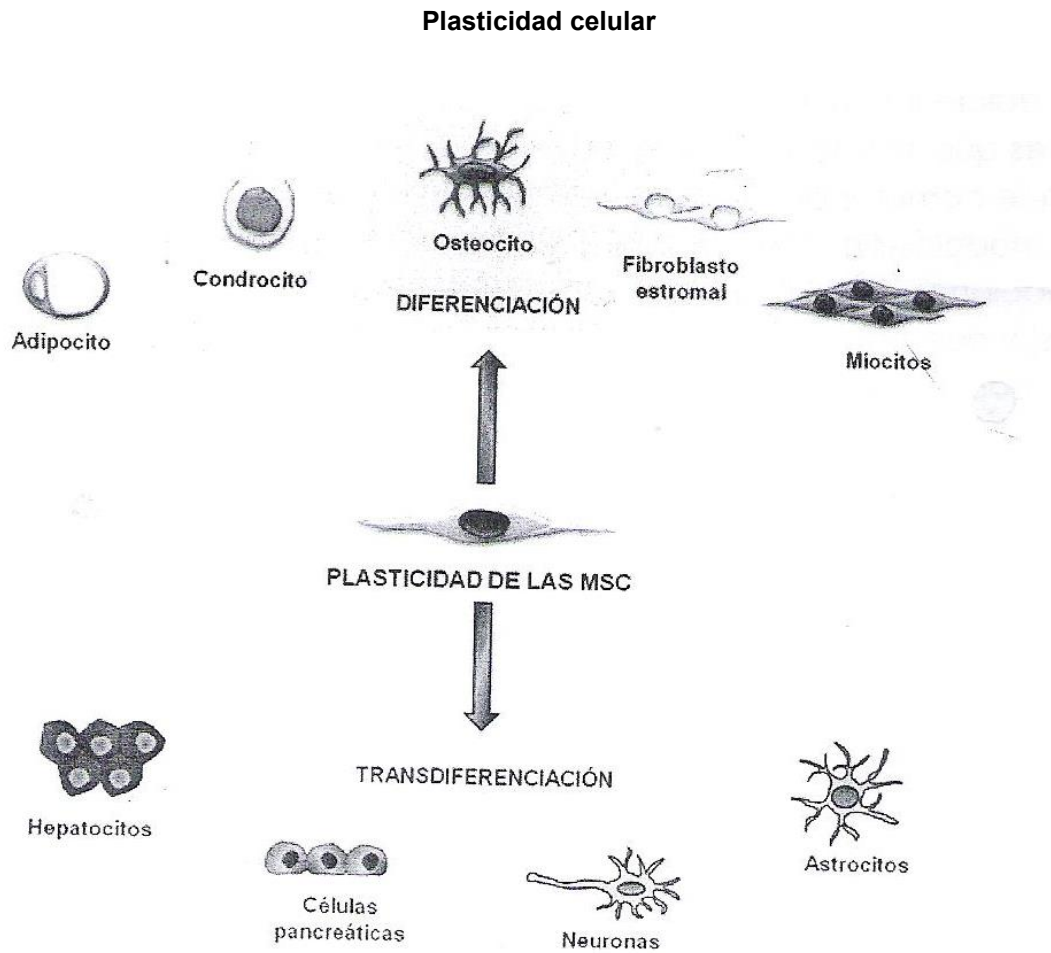


Fig. 8. Plasticidad de las MSC para dar origen a un tipo celular esperado (diferenciación) como a otro distinto no esperado (transdiferenciación). Pelayo R, Santa – Olalla J. Células troncales y medicina regenerativa. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2011.

Algunos métodos de obtención y aislamiento

Existen diversas consideraciones importantes a cerca de la obtención de tejidos para el aislamiento de células madre. La primera es que la cantidad de tejido colectado y procesado no predice la recuperación de MSC. La segunda es que existen gran cantidad de variaciones intrínsecas de donador a donador que influyen el éxito del aislamiento de las MSC. Sin embargo, el factor más confiable para predecir el éxito del aislamiento de MSC parece ser la edad del donador, ya que algunos investigadores creen que las MSC son los pericitos en los vasos sanguíneos y que por lo tanto la densidad tisular vascular, generalmente mayor en pacientes jóvenes, dicta la recuperación de las MSC. La técnica de aislamiento utilizada (o bien la técnica de digestión en el caso de células madres obtenidas del tejido del cordón umbilical o del tejido adiposo) también contribuye al número de células aisladas ^{1, 15, 17}.

Las MSC se caracterizan por su potencial de adhesión en cultivos monocapas y su potencial de diferenciación in vitro. Así mismo, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) reconoció diferentes marcadores que las células deben mostrar o bien no presentar para poder ser clasificadas como MSC. Algunos marcadores que deben mostrar incluyen CD105, CD73 y CD90, mientras que deben estar ausentes los marcadores CD45, CD34 y muchos otros marcadores que presentan las células madres hematopoyéticas ^{17, 43}.

Las MSC pueden ser aisladas de diversos tejidos. La sangre del cordón umbilical (**SC**) y el tejido del cordón umbilical (**TC**) solo se pueden obtener durante el parto. Dichos tejidos proveen una fuente autóloga de un gran número de tipos celulares troncales.

Idealmente, SC se procesa y congela para su uso posterior como una mezcla de células con un potencial pluripotencial. Las MSC derivadas de SC se ha vuelto comercialmente disponible para su uso en caballos y en humanos. Un gran número de MSC puede ser expandido a partir del TC. En conjunto, estos dos tejidos proveen un amplio margen de opciones terapéuticas con un potencial autólogo para un animal de gran valor. Si no se pueden obtener tejidos placentarios, la médula ósea (MO) y el tejido adiposo (**TA**) son los tejidos con mejor disponibilidad para el aislamiento de MSC. La colecta de ambos tejidos es moderadamente invasiva y traumática.

MO puede ser colectada y cultivada de manera exitosa a partir del esternón o de la tuberosidad coxal o cresta iliaca (en animales y humanos). No se han encontrado diferencias entre los sitios de obtención para el aislamiento de MSC. SC debe ser colectada en “citrate phosphate dextrose adenine 1 anticoagulant” para promover la viabilidad celular, especialmente cuando SC será enviada a un laboratorio. En especies en las cuales pueda ser colectado el tejido del cordón umbilical y en los cuales exista riesgo de contaminación (granjas, establos, patios, etc) es necesario realizar un lavado exhaustivo de las muestras. El TA puede ser colectado en un medio salino bufferado con fosfato previo a su procesamiento ⁴⁵.

Una de las principales características de las células troncales es su potencial para adherirse al plástico durante condiciones *in vitro*. *In vitro*, las MSC, al tener una morfología similar a fibroblastos, mantienen dichas características durante los diversos pasos de expansión. Así mismo, expresan una gran cantidad de moléculas de adhesión, también encontradas en células mesenquimales, endoteliales y epiteliales.

Las MSC derivadas de TA pueden ser aisladas en grandes cantidades a partir de liposucciones (en humanos) o de la obtención del ligamento falciforme (en pequeñas especies) y posterior a una digestión de 1 – 2 h del TA con colagenasa en baño maría a 37°C⁴⁶.

Investigaciones realizadas clonando varias CFU – F y analizándolas de manera independiente, han determinado que algunas de ellas son capaces de diferenciarse hacia hueso, tejido adiposo y cartílago, mientras que otras solo se diferencian a hueso. La proliferación de CFU-F in vitro está regulada por diferentes factores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet Derived Growth Factor*), el factor de crecimiento epidermal (EGF, *Epidermal Growth Factor*) y el FGF - 2. De igual manera, se han detectado algunos inhibidores de la formación de colonias de CFU-F, como el interferón-alfa (INF - α) y la interleucina-4(IL-4), que bajo condiciones in vitro inhiben la formación de colonias estimuladas por la combinación de EGF y PDGF. Actualmente no existe un procedimiento experimental único para la purificación de MSC y la mayoría de los laboratorios se han basado en la adherencia y en su capacidad de diferenciación multipotencial (hueso/adipocito/cartílago).^{8,14}.

Algunos mecanismos o vías de señalización involucrados en la diferenciación de células troncales en progenitores celulares óseos durante la fase de reparación ósea

Durante los últimos 10 años se han estudiado algunas patologías que ocurren en humanos como la osteogenesis imperfecta o bien la acondroplasia mediante modelos en animales (principalmente roedores genéticamente modificados) para conocer los mecanismos biológicos que ocurren en la diferenciación celular de los progenitores óseos^{27,28}. Algunas moléculas y factores que regulan desarrollo óseo y el crecimiento óseo postnatal se expresan de nueva cuenta durante la reparación de fracturas y la regeneración ósea, incluyendo genes en el Wnt, Hedgehog (HH), proteínas morfogénicas óseas (BMP), hormona paratiroidea (PTH), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros^{29,30}. Sin embargo, todavía no se conoce paso a paso la función de cada uno de dichos factores durante la reparación ósea y durante el proceso de diferenciación, ya que se han hecho modificaciones en diferentes modelos animales, alterando los sitios de producción de dichos factores y no se han obtenido resultados completamente concluyentes debido a distintos factores o mecanismos compensatorios^{31, 32, 33, 34}.

El camino de las Wnts es esencial para el desarrollo y la reparación ósea, no obstante, la regulación de la formación cartilaginosa y ósea de las Wnts durante la regeneración esquelética está influenciada por distintas variaciones en el microambiente celular que no se ven afectados durante el desarrollo esquelético de la misma manera. Durante el desarrollo, la señalización de las Wnts regulan la osteogenesis y la condrogenesis basados en patrones esqueléticos³⁵. Por otro lado, durante el proceso inflamatorio de la reparación ósea, diversas citocinas y factores de crecimiento tales como la

interleucina-1a (IL-1a), IL-1b, IL-6, IL-18 y el factor de necrosis tumoral (TNF – α) se liberan en el sitio de fractura.³⁶ Dichas citocinas y factores de crecimiento participan de manera esencial iniciando la cascada de reparación promoviendo la activación, el reclutamiento y diferenciación de las células troncales que son esenciales para la regeneración ósea y la reparación apropiada de la fractura, así mismo, reclutan otras células inflamatorias y potencializan la angiogénesis y la resorción de la matriz extracelular^{34,37,38}.

Aplicaciones de las MSC en el tratamiento de enfermedades articulares y musculoesqueléticas en medicina veterinaria y medicina humana

Las fracturas, faltas de unión, uniones demoradas, defectos óseos y enfermedades óseas (osteonecrosis, entre otras) han sido tratadas a lo largo de la historia con procedimientos quirúrgicos, principalmente injertos óseos autólogos o alogénicos, con resultados favorables para la mayoría de los clínicos en el caso de injertos autólogos²⁵. La desventaja que presentan los injertos autólogos es que se requiere de un procedimiento invasivo y doloroso para poder obtener el injerto óseo, lo que incrementa el manejo intrahospitalario del paciente y el periodo de recuperación postquirúrgico. Por otra parte, los sitios anatómicos para poder obtenerlo son limitados; por lo tanto, bajo estos criterios, los aloinjertos parecen presentar una mejor alternativa frente a los autoinjertos ya que la cantidad obtenida no presenta un inconveniente, sin embargo, el proceso de esterilización hace más frágil al hueso y pueden existir reacciones de rechazo, por lo que el injerto óseo puede ser una fuente de infecciones severas tanto en el paciente veterinario como en el paciente humano^{9, 15, 39}.

Es por esto que el cultivar células troncales obtenidas de médula ósea, inducir las a diferenciarse en osteoblastos, insertarlos en una matriz ósea y posteriormente trasplantarlas ha sido estudiado como una forma de reemplazar los injertos óseos convencionales. Hacer uso de las células troncales, disminuye notablemente el riesgo de infecciones y adicionalmente otorga un menor tiempo de recuperación para el paciente que ha sido sometido a una terapia celular frente al que ha sido sometido a un tratamiento quirúrgico para la colocación de un injerto óseo ¹⁵ .

En la práctica ortopédica en grandes especies, las terapias celulares han sido utilizadas por mucho tiempo principalmente para ayudar en la reparación ósea en fracturas, utilizando injertos óseos, sin embargo, los estudios recientes se han enfocado en la aplicación de células troncales para asistir la reparación ósea. Muchas de estas técnicas involucran la protección y la distribución de las células troncales en el sitio de fractura, así como el uso de materiales y/o fármacos para reclutar y modular la actividad celular troncal que reside en el sitio de la fractura ^{4, 10} .

El uso de injertos óseos autólogos en defectos óseos en grandes especies representa el modelo de oro para estimular la formación ósea ya que contienen tanto células osteogénicas como matriz ósea. Los injertos óseos esponjosos contienen una combinación de poblaciones celulares, en las que se encuentran osteoblastos completamente diferenciados y MSC indiferenciadas. Dichas MSC, pueden responder a estímulos medioambientales locales y diferenciarse en los tipos celulares requeridos ^{1,2} .

Posterior al trabajo realizado por Connolly en el cual se trató de manera exitosa una falta de unión con aspirado de MO, se publicó también un ensayo en el cual se inyectó 3 – 5ml de aspirados de MO en una no unión en tibia en 100 pacientes humanos, en el que los resultados fueron favorables ⁴⁰ .

Herningou *et al.* establecieron un ensayo en el cual concentraron un aspirado de MO en el cual aspiraron 300 ml de MO y lo concentraron en 50 ml. Posteriormente cuantificaron el número de MSC aplicadas y 53 de 60 pacientes tratados mostraron una unión ósea en un promedio de 12 semanas y en el 2002, describieron el uso de concentrado de MO para tratar la osteonecrosis de la cabeza femoral en humanos ⁴¹ .

Kim *et al.* demostraron que los osteoblastos autólogos cultivados e injertados indujeron de manera efectiva la formación de hueso en zonas presentando defectos óseos. Posteriormente demostraron que en un estudio clínico aleatorio que los osteoblastos autólogos cultivados e implantados en una fractura, aceleraron la tasa de unión por medio de formación ósea ¹⁵ .

Los veterinarios han utilizado las MSC derivadas de tejido adiposo para tratar enfermedades articulares y lesiones ligamentosas en equinos de manera comercial desde el 2003.⁶

Black *et al.* realizaron un estudio en el cual se llevó a cabo un ensayo controlado, doble ciego, aleatorio, multicentrico en perros con EAD coxofemoral ⁵ . En dicho estudio participaron 4 perros de compañía que acudieron a clínicas veterinarias en San Diego, Chicago y Colorado, también participaron 21 perros (14 hembras y 7 machos) en edades de 1 a 11 años, los cuales debían presentar EAD coxofemoral con una duración

mínima de 6 meses; se colectó por lo menos 23 g de grasa por el investigador. La grasa se obtuvo tanto del grupo tratado como del grupo control para mantener el estudio doble ciego. El personal del laboratorio le entregó al investigador el material, el cual constaba de jeringas con 0.6 ml de Solución Salina Fisiológica (grupo control) o una suspensión de 0.6 ml de 4.2 millones a 5 millones (dependiendo del concentrado celular) de MSC preparadas a partir de la grasa del paciente. El estudio concluyó en el día 90, tomando como día 0 el día en el cual se le administró al grupo A de pacientes una aplicación de una sola inyección intraarticular de concentrado celular en cada articulación coxofemoral, y al grupo B se le administró el placebo de manera intraarticular una sola inyección en cada articulación coxofemoral. Al momento de la evaluación se revisó la historia clínica y anamnesis, el examen físico, y el grado de claudicación, incluyendo movilidad articular y dolor a la manipulación. Al concluir el estudio se observó una mejoría significativa en la evaluación clínica en el grupo con tratamiento con MSC en cuanto al grado de claudicación, dolor a la manipulación y rango de movimiento a diferencia del grupo control en el cual se utilizó placebo.⁵

En otro estudio, Black *et al.* en el 2008 demostraron una mejoría estadística en los resultados obtenidos al tratar la EAD crónica en codo en perros⁶. En dicho estudio se reclutaron a 14 pacientes y se hicieron mediciones a los 30, 60, 90 y 180 días post tratamiento, a los cuales se les aplicó de 3 a 5 millones de células viables previamente cultivadas del mismo tejido adiposo del paciente en un volumen de 0.6 ml de solución PBS por articulación (vía intraarticular). Se le aconsejó a los propietarios de sacar a caminar con correa a los pacientes dos veces al día o de continuar con un programa de rehabilitación previamente prescrito. De los 14 pacientes, 11 presentaban EAD HRU

bilateral por lo que se les aplicó el tratamiento en ambas articulaciones. Los resultados obtenidos fueron los siguientes ⁶ (fig 9).

Evaluación subjetiva en pacientes con enfermedad articular degenerativa en codo

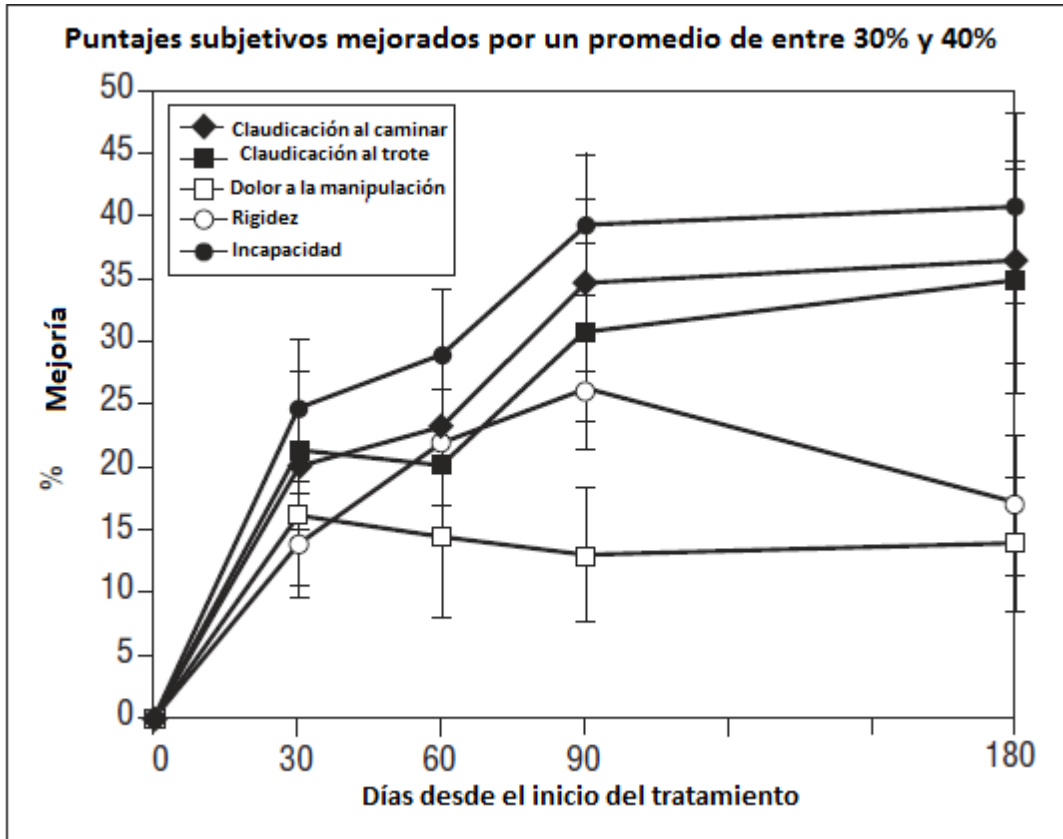


Fig.9 . Grado de mejoría a la evaluación ortopédica en perros con enfermedad articular degenerativa en codo después de la aplicación intraarticular de células troncales derivadas de tejido adiposo. Black *et al.* Stem Effect of Intraarticular Injection of Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Clinical Signs of Chronic Osteoarthritis of the Elbow Joint in Dogs. Veterinary Therapeutics Vol 9, No 3 (2008).

Los resultados obtenidos observados por los propietarios y los veterinarios fueron similares y se demostró mejoría en los signos clínicos de los pacientes comparándolos con los presentados al inicio del tratamiento.

En medicina humana no solo se ha planteado la utilización de células troncales en el tratamiento de enfermedades articulares y musculoesqueléticas, Karussis *et al.* comentaron que se han tenido resultados favorables en el tratamiento de enfermedades neurológicas, tales como procesos isquémicos, compromisos cerebrovasculares, entre otros ⁴² .

Limitaciones del uso de células troncales como tratamiento en enfermedades articulares y musculoesqueléticas

A pesar de los diversos estudios realizados in vitro y en animales, existe limitada evidencia que demuestre los beneficios en humanos. Los diseños de los estudios, los métodos de seguimiento y los criterios utilizados para la evaluación y reporte de los resultados varía significativamente entre estudios tal como lo menciona Pastides *et al.*⁴³.

En dicho estudio se realizó una búsqueda exhaustiva en distintos buscadores médicos y/o científicos de internet, distintos artículos relacionados con células troncales en la reparación de enfermedades articulares. Después de hacer un primer filtro, se obtuvieron 105 estudios los cuales se consideraron como potencialmente relevantes. Posteriormente se realizó otro filtro en el cual se excluyeron 93 estudios debido a la

falta de participantes humanos *in vivo*. Posteriormente de los 12 restantes, se excluyó 1 más debido a que era un estudio de revisión colectiva previamente utilizada en el mismo artículo por lo que finalmente quedaron 11 artículos apropiados ⁴³.

De los 11 artículos restantes, ninguno mostró un estudio controlado aleatorio. 3 de los artículos incluían pacientes que no fueron tratados con MSC. La mayoría de los estudios involucra procedimientos adicionales además de aquellos directamente relacionados con la reparación de defectos articulares, tales como menisectomías, reconstrucciones de ligamentos anteriores cruzados, entre otros; por lo que los resultados posteriores puedan ser parcial o totalmente atribuidos a dichos procedimientos secundarios ⁴³.

Es precisamente por lo que mencionan Pastides *et al.* en el 2013 que si se busca traspolar lo que se ha documentado y establecido en medicina veterinaria a medicina humana los resultados puede que no sean los mismos, ya que los resultados obtenidos en medicina veterinaria están perfectamente bien establecidos en modelos *in vivo*, mientras que ya sea por cuestiones éticas o de los modelos de estudio *per se*, la medicina tisular regenerativa humana se encuentra todavía en los inicios de su desarrollo máximo y potencial ⁴³.

No obstante, los costos de la terapia celular en medicina veterinaria no son muy accesibles para los diversos estratos poblacionales, por lo que muchas veces los propietarios no pueden costear dicho tratamiento. Por otra parte, no existe como tal un protocolo establecido el cual especifique cuantas dosis son necesarias como tratamiento óptimo para pacientes con EAD, o bien para la resolución de diversas

fracturas. De la misma manera, otro problema al cual se enfrenta comúnmente en medicina veterinaria es el no poder comprobar la viabilidad de las células que otorgan los laboratorios que comercializan este tipo de tratamiento, por lo que sería de gran utilidad que posteriormente se puedan resolver este tipo de problemas para poder utilizar este tipo de medicina regenerativa como un complemento establecido en forma para el tratamiento y la mejor resolución en enfermedades articulares y musculoesqueléticas.

Conclusión

El interés creciente en las células troncales indudablemente puede servir para incrementar la comprensión de sus características biológicas y su potencial aplicativo en la medicina regenerativa. Sin embargo su utilización de manera inmediata en la clínica de pequeñas especies en el tratamiento de lesiones articulares y ortopédicas, representa un desafío muy grande que requiere una mayor cantidad de estudios clínicos y aplicativos, además de contar con mayores herramientas tecnológicas. Así mismo, es necesario explorar más a fondo las cualidades de plasticidad y transdiferenciación de las células troncales mesenquimales para conocer de manera más estricta sus mecanismos de regulación y los estímulos (endógenos y exógenos) necesarios para poder guiar *in vivo* a dichas células a un destino deseado que cumpla con los requerimientos necesarios para poder reparar y regenerar los tejidos deseados para poder entonces utilizar dicha terapia como una alternativa razonable a la utilización de injertos óseos en algunos casos.

Abreviaturas

Células troncales mesenquimales	MSC
Enfermedad articular degenerativa	EAD
Unidades formadoras de colonias celulares fibroblásticas	CFU-F
Proteínas morfogénicas óseas	PMO
Factor de crecimiento endotelial	FCE
Factor de crecimiento de fibroblastos básico – 2	FGF 2
Antiinflamatorios no esteroideos	AINES
Linfocitos T	LT
Células dendríticas	DC
Dexametasona	Dex
Médula ósea	MO
Células troncales hematopoyéticas	HSC
Sangre del cordón umbilical	SC
Tejido del cordón umbilical	TC
Tejido adiposo	TA
factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF
Factor de crecimiento epidermal	EFG
Interferon alfa	INF - α
Interleucina 4	IL-4

Bibliografía

1. Pelayo R, Santa – Olalla J. Células troncales y medicina regenerativa. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2011.
2. Kim SJ, Ananthram A. Stem Cell Research in Orthopaedic and Trauma Surgery. *Orthopaedics and Trauma*, 2011;25:3: 168 - 173
3. Oreffo R, Cooper C, Maso C, Clements M. Mesenchymal Stem Cells: Lineage, Plasticity, and Skeletal Therapeutic Potential. *Stem Cell Reviews*, 2005, Vol 01:169 – 178
4. Milner *et al.* Stem Cell – based Therapies for Bone Repair. *Stem Cells and Bone Repair*, *Vet Clin Equine*, 2011, No. 27: 299 – 314.
5. Black *et al.* 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. *Veterinary Therapeutics*, 2007, Vol 8, No. 4: 272- 284
6. Black *et al.* Effect of Intraarticular Injection of Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Stem Cells on Clinical Signs of Chronic Osteoarthritis of the Elbow Joint in Dogs. *Veterinary Therapeutics*, 2008, Vol 9, No. 3: 192- 200
7. MacPhail C, Treatment of Canine Osteoarthritis. *Waltham Focus*, 2000, Vol 10, No 2: 25
8. Csaki C, Schneider P, Shakibaei. Mesenchymal Stem Cells as a Potential Pool for Cartilage Tissue Engineering. *Annals of Anatomy*, 2008, 190: 395-412

9. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*,2007,Vol. 25:2739 – 2749
10. Milner P, Clegg P, Stewart M. Stem Cell- based Therapies for Bone Repair. *Vet Clin Equine*, 2011,Vol. 27: 299- 314
11. Ding D, Shyu W, Lin S. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*, 2011,Vol. 20: 5 – 14.
12. Minguell *et al.* Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine*, 2001,Vol. 226:507-520.
13. Kono S, Kazama T. Phenotypic And Functional Properties of Feline Dedifferentiated Fat Cells And Adipose – derived Stem Cells. *Veterinary Journal*, 2014, Vol. 199: 88-96. Borjesson D, Peroni J. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. *Clin Lab Med*, 2011,Vol. 31:109-123.
14. Alderman D, Alexander R. Stem Cell Prolotherapy in Regenerative Medicine Background, Theory and Protocols. *Journal of Prolotherapy*, 2011,Vol. 3: 689-708.
15. Marion N, Mao J. Mesenchymal Stem Cells and Tissue Engineering. *Methods in Enzymology*, 2006,Vol. 420:339-361.
16. Nestic D, Whiteside R. Cartilage Tissue Engineering for Degenerative Joint Disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006,Vol. 58: 300-322.
17. Krampera M, Pizzolo G. Mesenchymal Stem Cells for Bone, Cartilage, Tendon and Skeletal Muscle Repair. *Bone*, 2006, Vol. 6: 678-683.

18. Barry F, Murphy J. Mesenchymal Stem Cells: Clinical Applications and Biological Characterization. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2004, Vol. 36: 568- 584.
19. Vaughan- Scott T, Taylor J. The Pathophysiology and Medical Management of Canine Osteoarthritis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 1994, Vol. 68: 21-25.
20. Brusa M, Boccia F. Enfermedad articular degenerativa canina: consideraciones sobre el manejo médico terapéutico. ¿Son los condroprotectores una alternativa?. *Analecta Veterinaria*, 2000, Vol 20: 5-13.
21. Bockstahler B, Levine D. Feline Rehabilitation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2015, Vol. 45: 185-201.
22. Kerwin S. Osteoarthritis in Cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 2010, Vol. 25: 218-223.
23. Boyd S, Leonard T. Long- Term Periarticular Bone Adaptation in a Feline Knee Injury Model for Post- Traumatic Experimental Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage/ OARS, Osteoarthritis Research Society*, 2005, Vol. 13: 235-242
24. Lafforgue P. Mesenchymal Stem Cells: A New Biotherapy for Bone Disease? *Joint, Bone, Spine: revue du rhumatisme*, 2010, Vol. 77: 99-101.
25. Kono S, Kazama T. Phenotypic and Functional Properties of Feline Dedifferentiated Fat Cells and Adipose – derived Stem Cells. *Veterinary Journal*, 2014, Vol. 199: 88-96.
26. Woodbury D, Reynolds K. Adult Bone Marrow Stromal Cells Express Germline, Ectodermal, Endodermal and Mesodermal Genes Prior to Neurogenesis, *Journal of Neuroscience Research*, 2002, Vol. 69: 908-917.

27. Kamoun-Goldrat A, Le Merrer M. Animal Models of Osteogenesis Imperfecta and Related Syndromes. *J Bone Miner Metab*, 2007, Vol. 25: 211- 218.
28. Horton W, Hall J. Achondroplasia. *Lancet*, 2007, Vol. 370: 162- 172.
29. Ferguson C, Alpern E, Miclau T. Does Adult Fracture Repair Recapitulate Embryonic Skeletal Formation? *Mech Dev*, 1999, Vol. 87: 57-66.
30. Elefteriou F, Yang X. Genetic Mouse Models for Bone Studies – Strengths and Limitations. *Bone*, 2011, Vol.49: 1242-1254.
31. Shwartz Y, Farkas Z. Muscle Contraction Controls Skeletal Morphogenesis Through Regulation of Chondrocyte Convergent Extension. *Developmental Biology*, 2012, Vol. 370: 154- 163.
32. Chen Y, Whetstone H. Beta- Catenin Signaling Plays a Disparate Role in Different Phases of Fracture Repair: Implications for Therapy to Improve Bone Healing. *PLoS Medicine*, 2007, Vol. 4: 249.
33. Day T, Guo X, Garret- Beal L. Wnt/beta – catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation During Vertebrate Skeletogenesis. *Developmental Cell*, 2005, Vol. 8: 739- 750.
34. Gerstenfeld L, Cho T. Impaired Intramembranous Bone Formation During Bone Repair in the Absence of Tumor Necrosis Factor- alpha Signaling. *Cells Tissues Organs*, 2001, Vol. 169: 285- 294.
35. Seke P, Etet L, Vecchio P. Normal Hematopoiesis and Hematologic Malignancies: Role of Canonical Wnt Signaling Pathway and Stromal Microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, Vol. 1835: 1- 10.
36. Einhorn T, Majeska R, Rush E. The Expression of Cytokine Activity by Fracture Callus. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1995, Vol. 10: 1272- 1281.

37. Kon T, Cho T, Aizawa T. Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activation of NF- kappaB ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, Vol. 16: 1004- 14.
38. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P. Molecular Aspects of Fracture Healing: Which Are the Important Molecules? *Injury*, 2007, Vol. 38: 11- 25.
39. Jackson R, Nurcombe S, Cool S. Coordinated Fibroblast Growth Factor and Heparan Sulfate Regulation of Osteogenesis. *Gene*, 2006, Vol. 379: 79- 91.
40. Connolly J. Clinical Use of Marrow Osteoprogenitor Cells to Stimulate Osteogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998, Vol. 355: 257- 266.
41. Heringou P, Poignard A, Beaujean F. Percutaneous Autologous Bone- marrow Grafting for Nonunions: Influence of the Number and Concentration of Progenitor Cells. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2005, Vol. 10: 1430-1437.
42. Karussis D, Petrou P, Kassis I. Clinical Experience With Stem Cells and Other Cell Therapies in Neurological Diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 2013, Vol. 324: 1- 9.
43. Pastides et al. Stem Cell Therapy for Human Cartilage Defects: A Systematic Review. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, Vol. 21: 646- 654.
44. DeChellis D, Cortazzo M. Regenerative Medicine in the Field of Pain Medicine: Prolotherapy, Platelet-rich Plasma Therapy, and Stem Cell Therapy-Theory and Evidence. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management*, 2011, Vol. 15: 74- 80.

45. Koch G, Heerkens T, Thomsen P. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Equine Umbilical Cord Blood. *Biotechnology*, 2007, Vol. 7: 26.
46. Yoshimura K et *al.* Characterization of Freshly Isolated and Cultured Cells Derived from the Fatty and Fluid Portions of Liposuction Aspirates. *Journal of Cellular Physiology*, 2006, Vol. 208: 64- 76.