



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto Angiogénico de los Medios Condicionados por Células Madre, en el trasplante de aloinjerto óseo diafisario (Modelo Animal).

Ricardo Alfonso Castro Gaona.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía
Unidad de Ortopedia y Traumatología
Bogotá D.C, Colombia

2016

Efecto Angiogénico de los Medios Condicionados por Células Madre, en el trasplante de aloinjerto óseo diafisario (Modelo Animal).

Ricardo Alfonso Castro Gaona.

Código:

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Especialista en Ortopedia y Traumatología

Director:

Dr. José Fernando Galván Villamarin.

Codirectores:

Dr. Orlando Chaparro

Dra. Gabriel Fletscher

Línea de Investigación:

Cirugía Ortopédica –Ciencias Básicas – Tecnología de Tejidos

Grupos de Investigación:

Grupo de Investigación Unidad de Ortopedia y Traumatología

Grupo de Investigación Biología de Células Madre

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía

Unidad de Ortopedia y Traumatología

Bogotá D.C, Colombia

2016

*A mi hijo Juan Alejandro y a mi esposa Luisa
Fernanda, pilares de mi felicidad...*

Resumen

INTRODUCCION:

Actualmente el manejo de los defectos óseos continua siendo un reto para el cirujano ortopedista quien a pesar de la introducción de nuevas técnicas quirúrgicas para el manejo de la patología de origen multifactorial, aun se ve limitado en los resultados postoperatorios y funcionales.

Con el progreso en el conocimiento de las células madre y el mejor entendimiento de la función y los efectos de la célula mesenquimal , sus capacidades de diferenciación y paracrinas, planteamos la posibilidad de la utilización de éstas dentro del arsenal terapéutico para el manejo de defectos óseos segmentarios.

Evaluamos el potencial de los medios condicionados CM por células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo Ad-MCS, como facilitador en el proceso de integración de aloinjertos estructurales diafisarios no vascularizados mediante la promoción de la angiogénesis y consideramos la posibilidad de su utilización dentro del arsenal terapéutico para el manejo de defectos óseos segmentarios.

METODOS:

Ocho conejos blancos de raza Nueva Zelanda fueron intervenidos quirúrgicamente para realizar la reconstrucción de un defecto óseo diafisario intercalar de 1.5 cm. El primer grupo utilizamos aloinjertos congelados (n=4) y en el segundo aloinjertos congelados + medios condicionados (MC) por células madre mesenquimales (MSC) obtenidas de tejido adiposo humano (Ad-MCS) (n=4) ; fueron observados por 12 semanas. Dos conejos fueron sacrificados al inicio del estudio para utilizar los fémures como aloinjertos donantes.

Un segmento cortical diafisario de 1.5 cm fue osteotomizado y luego fijado con ayuda de un tutor externo (diseñado por los autores) compuesto por 4 clavos roscados al hueso. Los aloinjertos fueron despojados del periostio, tejidos blandos adyacentes y del contenido medular, y luego almacenados en bolsas estériles al vacío a -4 °C durante cuatro semanas antes del trasplante. 12 ml de Hidrogel fueron preparados a partir de plasma fresco humano como andamio biodegradable del implante para contener los Medios Condicionados (MC) por Células madre mesenquimales (MCS) de tejido adiposo (Ad-MCS). El Hidrogel con los MC es implantado en el canal medular del aloinjerto y en la superficie cortical en el momento de la reconstrucción femoral del grupo correspondiente.

Los conejos fueron sacrificados a la semana 12 y los especímenes analizados macroscópicamente para valorar la integración entre huésped – injerto y la estabilidad de las uniones, también se analizó la formación de callo mediante radiografías control y finalmente practicó un estudio histológico mediante coloración básica H-E y con inmunohistoquímica CD34 y CD31 para evaluar la vitalidad del tejido óseo del huésped y el aloinjerto, la presencia de resorción ósea, neoformación de hueso y tejido fibrovascular además de la densidad de los vasos en el injerto comparándola con hueso no intervenido.

RESULTADOS.

Se valoraron los 4 especímenes de cada grupo a las 12 semanas. Se encontró formación de callo óseo redundante macroscópica y radiológicamente en la mayoría de especímenes del Grupo B (Aloinjerto + Medios Condicionados) al compararlos con las características de consolidación del Grupo A. Sin embargo, se presentó un caso de aflojamiento del material de fijación asociado a infección en un espécimen de cada grupo.

Todos los índices de vitalidad del injerto (formación de osteoide, encapsulamiento del callo y osteocitos vitales en el aloinjerto) fueron significativamente mayores en el grupo de aloinjerto con MC de Ad-MCS en la valoración histológica con H-E. La densidad de los vasos en el aloinjerto y en las zonas de consolidación no fue cuantificable, sin embargo la densidad de tejido positivo para la inmunohistoquímica con CD31 – CD34, fue significativamente mayor en el Grupo B.

CONCLUSION.

Los aloinjertos con MC de Ad-MCS aumentaron el potencial de integración con el hueso nativo y los índices de vitalidad del aloinjerto. Los marcadores de inmunohistoquímica CD31 y CD34 no permiten cuantificar la densidad vascular por falta de especificidad tisular, sin embargo la mayor captación de contraste en los casos del grupo con MC de Ad-MCS (Grupo B) indica un ambiente enriquecido por una respuesta celular mayor en el sitio de consolidación.

Key words: *biological, healing, deep-frozen, diaphyseal, allografts, experimental, stem cells.*

Abstract**Angiogenic effect of Stem Cell's Conditioned Medium in diaphyseal bone allograft's transplantation (Animal Model).****INTRODUCTION:**

Management of bone defects nowadays is still a challenge for the orthopedic surgeon, who despite of introduction of novel surgical techniques to handle the multifactorial origin disease, still have limited postoperative and functional results.

With the improvement of knowledge about stem cell and the better understanding of the effects and functioning of mesenchymal cells, their differentiation abilities and paracrine capacity, we pose the possibility of using them on the therapeutic arsenal for managing segmental bone defects.

We evaluate the potential of mesenchymal stem cells conditioned medium, coming from fat tissue, as enabling in the process of non vascularized diaphyseal structural allograft integration by promoting angiogenesis, also we consider the possibility of their use in the therapeutic arsenal for managing segmental bone defects.

MATERIALS AND METHODS:

Experimental study on animal model. Eight 8 white rabbits of New Zeland breed to make reconstruction of a diaphyseal bone defect among 1.5 centimeters, in first group we used frozen allograft (n=4) and in the second group we used frozen allograft plus Mesenchymal Stem Cell's Conditioned Medium (CM) obtained from human adipose tissue (Ad-MCS) (n=4). They were observed along 12 weeks. 2 rabbits were sacrificed at study beginning to use femurs as allograft donors.

A cortical diaphyseal segment of 1.5 cm went through osteotomy and then fixation with an external system designed by authors, constituted by four pins screwed to bone. Periosteum, soft tissue and medulla were removed from allografts, which were stored in sterile vacuum bags, at -4°C along four weeks before transplantation. 12 ml of hydrogel were made from human fresh plasma as implant's biodegradable scaffold to contain fat tissue stem cell's conditioned medium. The hydrogel and the conditioned media are placed in allograft's medullary cavity and in cortical surface at the moment of reassembling femurs in the corresponding group.

Rabbits were sacrificed at 12 week and the specimens macroscopically analyzed to evaluate host – graft integration and stability of bonding, besides, we analyzed callus formation by control x- rays and finally we made a histological study by basic eosin - hematoxylin staining and with CD31, CD34 immunohistochemistry to evaluate host bone tissue vitality, the allograft, presence of bone resorption, formation of new bone and fibrovascular tissue. We also evaluate the blood vessels density in the graft comparing with non-operate bone.

RESULTS

We assess the four specimens of each group at twelfth week. We found redundant bone callus formation macroscopically and with x- rays in most specimens of B group (allograft plus conditioned media) when comparing with characteristics of group A bone consolidation. However, we notice a case of fixation pin slackening associated to infection in one specimen of each group.

At histologic staining with eosin hematoxylin, all vitality index of graft (osteoid formation, fibrovascular tissue, bone callus encapsulation and allograft's vital osteocytes) were

significantly high in the group of fat tissue mesenchymal stem cell's conditioned medium allograft. Vascular density in the allograft and in the consolidation zones were not measurable, however, positive tissue density for immunohistochemistry with CD31 and CD34 was significantly high in group B.

CONCLUSION.

Fat tissue mesenchymal stem cell's conditioned medium allografts augmented the integration potential with native bone and allograft vitality indexes. Immunohistochemistry markers CD31 and CD34 don't allow to quantify vascular density due to lack of tissue specificity, however, the increased capture of contrast in cases with Fat tissue mesenchymal stem cell's conditioned medium (group B) indicates an enriched environment allowing an increased cell response in consolidation site.

Key words: biological, healing, deep-frozen, diaphyseal, allografts, experimental, stem cells.

Contenido

Resumen.....	IV
Lista de figuras.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XIII
Introducción.....	1
1. Objetivos	2
1.1 Objetivo Geneal.....	2
1.2 Objetivos Específicos	2
2. Marco Teórico	4
2.1 Aloinjertos estructurales no vascularizados	4
2.2 Medios Condicionados (MC) por Células madre mesenquimales (MSC)	5
3. Metodología	7
3.1 Estudios previos:	7
3.2 Diseño del estudio	7
3.2.1 Tipo de Estudio.....	7
3.2.2 Especie animal.....	8
3.2.3 Tamaño de la muestra.....	8
3.3 Fases del proyecto	9
3.3.1 Fase I: Adquisicion del Aloinjerto.....	9
3.3.2 Fase II: Segundo tiempo quirúrgico.....	11
3.3.3 Fase III: Interpretación de resultados. Evaluación radiológica.....	15
3.3.4 Fase III: Interpretación de resultados. Evaluación Macroscopica e Histologica.....	16
4. Consideraciones éticas	18
5. Resultados	19

5.1	Fase I	19
5.2	Fase II	19
5.3	Fase III:	21
5.3.1	Evaluacion Radiologica. Lectura convencional:.....	21
5.3.2	Evaluacion Macroscopica:.....	21
5.3.3	Evaluacion Histologica:.....	22
5.3.4	Evaluación Inmunohistoquímica CD31 y CD34.....	25
6.	Discusión.....	27
6.1	Técnica de trasplante aloinjerto óseo diafisario congelado en Conejos	27
6.2	Medios condicionados MC producidos por células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo por MSC-Ad y angiogénesis en el trasplante de aloinjertos óseos diafisarios.	27
7.	Conclusiones y recomendaciones	29
7.1	Conclusiones	29
7.2	Recomendaciones	30
8.	Bibliografía.....	31

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
<u>Figura 1:</u> Pieza anatómica fémur de conejo. Fijador Externo para investigación animal en conejos.	8
<u>Figura 2:</u> Procedimiento quirúrgico fase I.....	9
<u>Figura 3:</u> Esquema de Metodología.....	11
<u>Figura 4:</u> Procedimiento quirúrgico Fase II. Tutor.....	13
<u>Figura 5:</u> Procedimiento quirúrgico Fase II. Hidrogel.....	14
<u>Figura 6:</u> Procedimiento quirúrgico Fase II. Grupo B.....	14
<u>Figura 7:</u> Procedimiento quirúrgico fase III. Evaluación Radiológica.....	15
<u>Figura 8:</u> Procedimiento quirúrgico fase III. Evaluación Macroscópica.....	16
<u>Figura 9:</u> Procedimiento quirúrgico Fase III. Valoración Histológica.....	17
<u>Figura 10:</u> Procedimiento quirúrgico Fase II. Radiografía Postoperatoria.....	20
<u>Figura 11:</u> Evaluación Histológica. Sitio de interés (SDI).....	23

<u>Figura 12:</u>	Evaluación Histológica. Magnificaciones. Sitio de interés (SDI).....	23
<u>Figura 13:</u>	Evaluación Histológica. Grupo A.....	24
<u>Figura 14:</u>	Evaluación Histológica. Casos de Infección.....	25
<u>Figura 15:</u>	Evaluación Inmunohistoquímica. Caso Grupo B.....	25
<u>Figura 16:</u>	Evaluación Inmunohistoquímica. Comparación Grupos A y B.....	26

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

MSC	Célula madre Mesenquimal
MSC -Ad	Célula madre Mesenquimal derivada del tejido adiposo
MC	Medios Condicionados
HBPH	Hidrogel del Plasma Sanguíneo Humano
cm	Centímetro
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
TGF	Factor de crecimiento transformante
H-E	Tinción Básica con Hematoxilina Eosina

Introducción

Actualmente el manejo de los defectos óseos continua siendo un reto para el cirujano ortopedista quien a pesar de la introducción de nuevas técnicas quirúrgicas para el manejo de la patología de origen multifactorial, aun se ve limitado en los resultados postoperatorios y funcionales del paciente. Con el progreso en el conocimiento de las células madre y el mejor entendimiento de la función y los efectos de la célula mesenquimal y sus capacidades de diferenciación y paracrina, se plantea la posibilidad de la utilización de éstas dentro del arsenal terapéutico para el manejo de defectos óseos segmentarios.

En este estudio se evalúa el potencial de los medios condicionados CM por células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo Ad-MCS, como facilitador en el proceso de integración de aloinjertos estructurales diafisarios no vascularizados mediante la promoción de la angiogénesis [34 -35]. Se utiliza hidrogel de plasma sanguíneo humano HBPH como sistema de administración. Los geles obtenidos a partir de plasma humano se han utilizado en la ingeniería de tejidos para proporcionar un andamio biodegradable, mínimamente invasivo e histocompatible para la expansión celular in vitro y para la implantación celular in vivo. [45].

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar de forma experimental la utilización de medios condicionados producto de la secreción paracrina de células madre mesenquimales como potenciador angiogénico en el uso de aloinjerto óseo no vascularizado.

1.2 Objetivos Específicos

- Estudiar los aspectos biológicos y moleculares de la expansión y diferenciación de las células madre mesenquimales in vivo (modelo animal) en la búsqueda de estrategias terapéuticas para tratamiento de defectos óseos estructurales en huesos largos.
- Determinar la calidad radiológica e histológica del tejido obtenido en área unión posterior a la utilización de medios condicionados con el uso de aloinjertos estructurales no vascularizados.
- Determinar el potencial angiogénico de los medios condicionados en el uso de aloinjerto estructural no vascularizado, mediante la utilización de inmunohistoquímica en espécimen animal.
- Continuar como unidad de investigación en patología ortopédica en el campo de la biología molecular y el uso de células madre con el fin de buscar estrategias

terapéuticas en el manejo de defectos óseos estructurales en huesos largos en los cuales las técnicas disponibles actualmente a nivel mundial no solucionan de forma satisfactoria la patología del paciente.

2. Marco Teórico

2.1 Aloinjertos estructurales no vascularizados.

La osteointegración se consigue cuando no hay movimiento progresivo entre el injerto y el hueso que está en contacto directo con él. [1], y es el resultado de dos etapas complejas: osteoinducción, el proceso por el cual se induce la osteogénesis y osteoconducción, que implica el crecimiento de hueso en una superficie [2].

La Osteoinducción es parte del proceso de curación normal del hueso y es responsable de la mayoría de la neoformación ósea. La Osteoconducción también ocurre durante la remodelación ósea normal y depende no únicamente de factores biológicos sino también de la respuesta a material extraño. [2].

Gran cantidad de sustitutos óseos son utilizados frecuentemente en la práctica clínica [3], pero ninguno cumple todos los requerimientos de un implante ideal. Teóricamente, para obtener una adecuada osteointegración, los implantes óseos deben proporcionar cuatro elementos: integridad estructural; una matriz osteoconductiva como un andamio que permita el crecimiento interno del hueso; células osteogénicas, que ofrezcan el potencial de diferenciarse y facilitar varios estadios de la regeneración ósea; y factores osteoinductivos, como mediadores de los diferentes estadios de la regeneración y reparación ósea. [3]

Los factores de crecimiento son expresados durante diferentes fases de la cicatrización del tejido y son por lo tanto pieza clave en promover a regeneración tisular [4]; de hecho, factores de crecimiento transportados en dispositivos ortopédicos han sido reportados como potenciadores de la actividad osteoblástica y a favor de la integración del implante. [5,6].

Las opciones para manejar defectos óseos amplios incluyen autoinjertos vascularizados [7], autoinjertos no vascularizados [8], aloinjertos [9], prótesis anatómicas [10], y

biocerámicas [11]. El uso de aloinjertos tiene las ventajas de menor morbilidad quirúrgica y reducción en tiempos quirúrgicos y costos hospitalarios, pero involucra el riesgo de transmisión de enfermedades [12], no unión [13] y falta de incorporación biológica [14].

En un estudio en gatos, la incorporación biológica de autoinjertos corticales no vascularizados fue buena, con una tasa de resorción ósea del 13 % a las 12 semanas, una tasa de neoformación ósea cortical de 4.3% a las 16 semanas y una tasa de encierro del callo de 8 % a las 16 semanas [15,16]. Por el contrario, la actividad reparadora fue mínima en los aloinjertos corticales, con una tasa de resorción ósea de 1.8 % a 9 meses, y una tasa de neoformación ósea cortical de 0.74 % a los 9 meses [14]. Además, los aloinjertos pueden perder gran parte de su fuerza con el tiempo [17]

Para optimizar la remodelación y la incorporación de los aloinjertos, se han utilizado factores de crecimiento recombinante como la proteína morfogenética formadora de hueso (BMPs) [18-20], plasma rico en plaquetas (PRP) [21], células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (MCS) [22-25] y una combinación de estas [26].

2.2 Medios Condicionados (MC) por Células madre mesenquimales (MSC)

El uso de las células madre y particularmente las células madre mesenquimales (MSC) en la práctica clínica ha aumentado considerablemente en la última década. Durante este tiempo, la comunidad científica ha tratado de entender sus mecanismos biológicos en la reparación y regeneración de tejidos y desvelar su potencial en la terapia celular y la medicina regenerativa. [27].

Aunque MSC fueron inicialmente aisladas de la médula ósea, la MSC de tejido adiposo (Ad-MSC) se perfila como la mejor opción para aplicaciones clínicas [28]. Desde su descripción en 2001 [28], los datos recogidos hasta el momento sugieren que el tejido adiposo es una fuente abundante de MSC, y debido a su amplia distribución corporal hace que sea accesible por métodos mínimamente invasivos. Estos MSC son también fáciles de aislar y expandir in vitro [29,30].

El enfoque inicial de tratamiento de lesiones musculoesqueléticas mediante MSC se basa en su capacidad de diferenciarse en varios tipos de células [31,32]. En esencia, la expectativa ha sido que al implantar o inyectar MSC, las células colonizan y se diferencian

en el sitio de la lesión a lo largo de un linaje MSC apropiado. Este mecanismo de acción de MSC actualmente es controvertido, cambiando el paradigma actual para extenderlo a un mecanismo alternativo llamado efecto paracrino, donde MSC secretan moléculas biológicamente activas que ejercen efectos beneficiosos sobre los tejidos lesionados [33] mediante la promoción de la angiogénesis y la regeneración de tejidos y la inhibición de fibrosis, apoptosis y la inflamación [34,35].

Dado que la supervivencia y la diferenciación de MSC en el sitio de la lesión es limitada, se propone que la señalización paracrina es el mecanismo primario de sus efectos terapéuticos [36]. Esta hipótesis está apoyada por estudios *in vitro* e *in vivo* evidenciando que muchos tipos de células responden a la estimulación paracrina mediada por señalización de MSC, provocando la modulación de un gran número de respuestas celulares, tales como la supervivencia, proliferación, migración y expresión de genes [37]. La secreción de factores bioactivos se cree desempeña un papel crítico en la actividad paracrina mediada por MSC. Estos factores y citoquinas pueden recogerse en lo que se han denominado medios condicionados (CM), que cuando se trasplantan en modelos animales con diferentes enfermedades logran tener efectos similares a los ejercidos por las propias células, aumentando el proceso de reparación tisular en infarto agudo de miocardio [38,39], la curación de heridas [40,41], como un agente neuroprotector [42] y su habilidad para reparar defectos óseos gracias a su efecto paracrino en modelos *in vivo* [43,44].

En este estudio se evalúa el potencial de los medios condicionados CM por células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo Ad-MCS, como facilitador en el proceso de integración de aloinjertos estructurales diafisarios no vascularizados mediante la promoción de la angiogénesis [34 -35]. Se utiliza hidrogel de plasma sanguíneo humano HBPH como sistema de administración. Los geles obtenidos a partir de plasma humano se han utilizado en la ingeniería de tejidos para proporcionar un andamio biodegradable, mínimamente invasivo e histocompatible para la expansión celular *in vitro* y para la implantación celular *in vivo*. [45].

3. Metodología

3.1 Estudios previos:

Se adelantó una búsqueda en diferentes bases de datos electrónicas (EMbase, PubMed, Science Direct, Scielo) utilizando los términos: Allograft, fresh-frozen allografts, Mesenchymal Stem Cell, mesenchymal stem cell-conditioned medium y en términos MESH: cell, mesenchymal stem unidos por conectores booleanos AND, OR sin encontrar ningún artículo en el cual se combinaran las dos técnicas para la reconstrucción ósea en huesos largos.

Se encuentra un gran número de publicaciones que combinan el uso de células madre derivadas de médula ósea y el uso de aloinjertos para el manejo de defectos óseos en huesos largos [22-25]. En estos estudios se busca enriquecer con medios celulares osteoinductores los aloinjertos estructurales.

Consideramos este estudio es el primero en indagar por el potencial osteoinductor y angiogénico de los Medios condicionados por células madre (acción paracrina con medios acelulares) derivadas de tejido adiposo humano (células madre alogénicas) sin la necesidad de terapia inmunosupresora [44], en la integración de aloinjertos estructurales en el manejo de defectos óseos diafisarios.

3.2 Diseño del estudio

3.2.1 Tipo de Estudio:

Estudio experimental en modelo animal.

3.2.2 Especie animal:

Conejos de raza nueva Zelanda peso entre 2000 y 3000 gramos.

En un estudio experimental previamente realizado por los autores, aun sin publicar, por facilidad técnica para la realización de la osteotomía y facilidad técnica para la colocación de un fijador externo, se escogió al fémur como pieza anatómica.

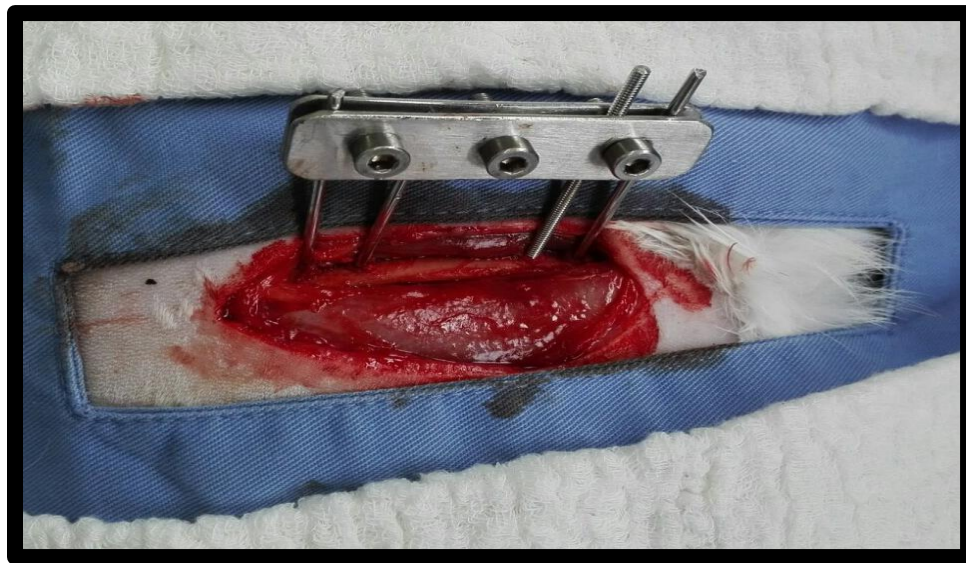


Figura 1: Pieza anatómica fémur de conejo. Fijador Externo para investigación animal en conejos.

3.2.3 Tamaño de la muestra

Cumpliendo con las recomendaciones de las 3R en investigación animal: reemplazar, reducir y refinar¹, se diseñaron dos grupos de comparación para lo cual se define una muestra de 8 conejos. Se utilizaron 2 Conejos al inicio del estudio como donantes de los aloinjertos, para un total de 10 diez conejos.

3.3 Fases del proyecto

Se realizó un proceso de investigación de tres fases, las dos iniciales correspondientes a la intervención experimental en el modelo animal propuesto y una tercera fase de evaluación, la cual finalizó con la ejecución de los documentos para publicación y divulgación ante sociedades científicas en el ámbito nacional e internacional.

3.3.1 Fase I: Adquisición de Aloinjerto.

Aloinjerto óseo estructural de la diáfisis del fémur bilateral de # 2 conejos donantes.

Con ayuda de cámara de flujo laminar, los aloinjertos (diáfisis femoral completa) se despojaron del periostio, tejidos blandos y contenidos medulares, se lavaron con solución salina, se realizaron osteotomías con sierra oscilante obteniendo dos injertos de 1.5 cm por cada fémur, los cuales se almacenaron en un congelador a -4°C . Todos los aloinjertos fueron congelados durante 4 semanas antes del trasplante para estandarizar la técnica.

Los conejos donantes fueron sacrificados.



Figura 2. Procedimiento quirúrgico fase I

1. El animal se manipula procurando evitar al máximo producirle estrés, se dosifica 15 mg/ Kg de peso de Euthanex (pentobarbital sódico), se suministra por vía endovenosa por vena periférica de la oreja, efecto instantáneo, se asegura el deceso del animal con no reversibilidad y asegurándose de la ausencia de reflejo alguno.
2. Preparación de las extremidades inferiores para realización de procedimiento quirúrgico (Rasurado).
3. Asepsia y antisepsia de campo operatorio con clorhexidina. Colocación de campos quirúrgicos estériles.
4. Incisión longitudinal sobre cara lateral del muslo, disección tejido celular subcutáneo, apertura de fascias y musculatura hasta exposición del fémur.
5. Desarticulación femoral a nivel de la cadera y la rodilla.
6. Exéresis de la pieza quirúrgica. (Fémur total de forma bilateral)
7. Las piezas quirúrgicas son despojadas de contenido endomedular y de tejidos blandos incluyendo periostio e inserciones musculares.
8. Osteotomía con sierra oscilante para obtener un aloinjerto estructural de 1.5 de longitud por cada fémur (8 injertos estructurales en total).
9. Se lavan aloinjertos con solución salina y se empaacan al vacío en bolsas estériles después del secado.
10. Congelación a - 4° centígrados durante 4 semanas.

3.3.2 Fase II: Segundo tiempo quirúrgico

Para la fase II se definen dos grupos, (Figura 3):

- a. Aloinjerto estructural congelado.
- b. Aloinjerto estructural congelado + Medios Condicionados MC (DMEM: medio de cultivo con citoquinas secretadas por MSC, no contiene células).

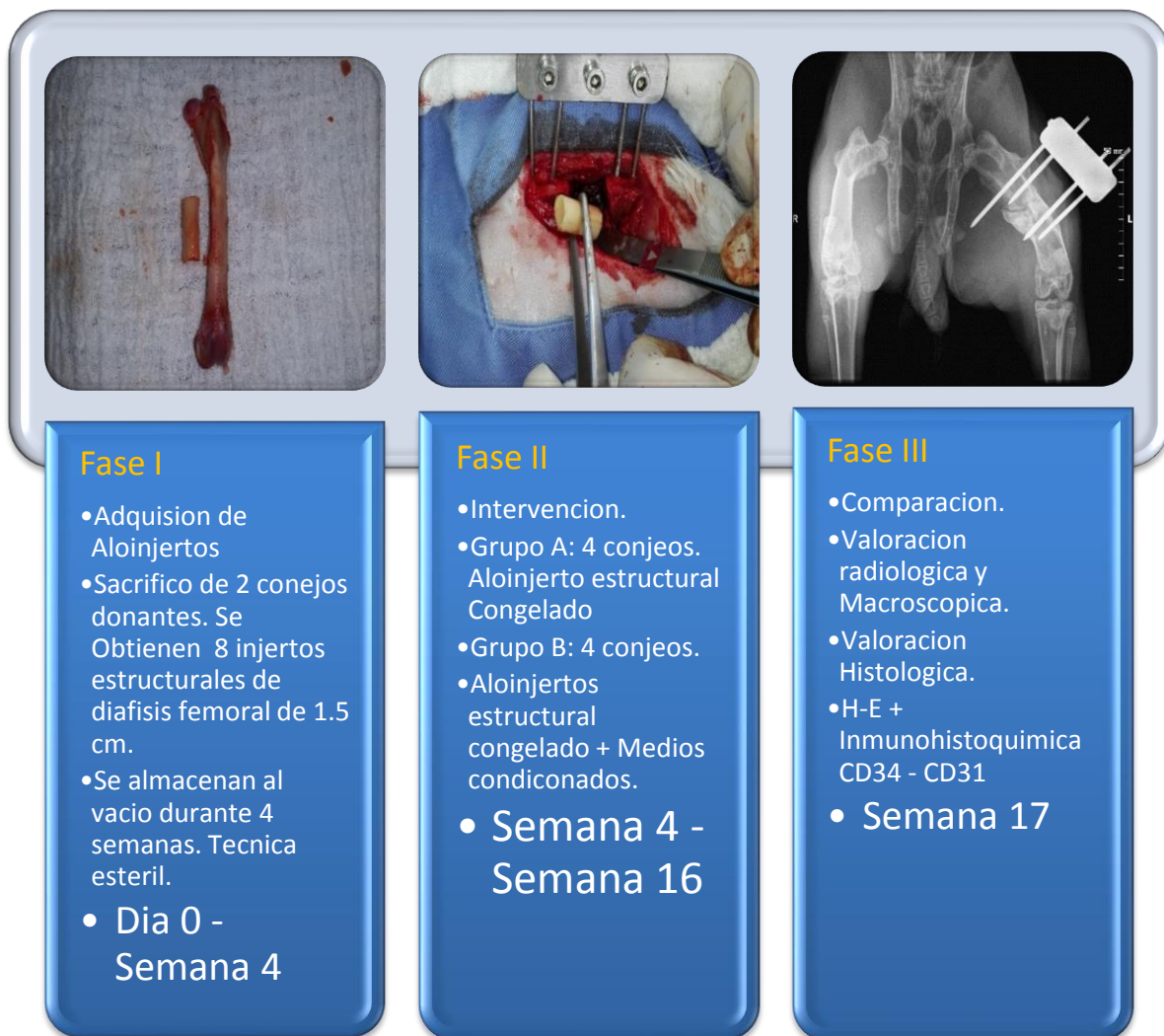


Figura 3: Esquema metodología.

Ocho 8 conejos fueron sometidos a un segundo procedimiento quirúrgico, Grupo A (Conejos 1 – 4) fueron intervenidos en el miembro inferior izquierdo y el Grupo B (Conejos 5 – 8) en el miembro inferior derecho, siguiendo el siguiente protocolo (Figura 4):

1. El animal se manipula correctamente buscando evitar algún grado de estrés y que el medicamento surta efecto eficazmente, es puesto en premedicación con acepromacina 2mg/kg de peso, 10 minutos después se le suministra 60 mg/Kg de peso de ketamina y 2 mg/kg de xilacina por vía intramuscular, para que el animal quede en estado de anestesia profunda.
2. Preparación de la extremidad a intervenir siguiendo el mismo protocolo de asepsia y antisepsia utilizado en la fase I.
3. Anestesia local con 5 cc de Lidocaína subcutánea al 1 % sin epinefrina.
4. Incisión longitudinal sobre cara lateral sobre muslo a través de incisión quirúrgica previa, disección tejido celular subcutáneo, apertura de fascias y musculatura hasta exposición del fémur.
5. Se realiza montaje de fijador externo con ayuda de 4 clavos Steinman roscados de 2.0 bicorticales con ayuda de perforador manual.
6. Con sierra eléctrica oscilante se crea un defecto óseo de 1.5 cm además de resección de periostio remante en zona expuesta.
7. Según la aleatorización correspondiente a cada conejo se coloca:
 - a. Aloinjerto estructural congelado de fémur de 1.5 cm
 - b. Aloinjerto estructural congelado de femur de 1.5 cm + Hidrogel con medios condicionados (DMEM: medio de cultivo con citoquinas secretadas por MSC, no contiene células).

Para la preparación del hidrogel con medios condicionados se utilizaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano con un 80% de confluencia, las cuales fueron lavadas 3 veces con PBS pH 7.4 (GIBCOTM) para eliminar restos de DMEM + SFB 10%. Posteriormente se adicionó 3ml de medio libre de suero bovino fetal (Opti-MEM® marca GIBCOTM) con penicilina 100U/mL, estreptomina 100µg/mL y se

cultivo por 24h a 37°C, con una atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) al 5%. Pasadas las 24h se recuperó el medio de cultivo y se centrifugó a 3000g por 10min en centrifuga refrigerada para eliminar restos celulares. Finalmente se adicionó un coctel de inhibidores de proteasas, se realizaron las diluciones necesarias para que todos los medios condicionados quedaran a la misma concentración de proteína total (134µg/mL, cuantificada con el método de Bradford) y se almacenó a -20°C hasta el día de su implementación.

8. En el Grupo B el Hidrogel es cargado en el canal medular del aloinjerto y el sobrenadante se aplica alrededor de los sitios de osteotomía.
9. Lavado de Campo quirúrgico con solución salina.
10. Cierre de fascia y piel. Colocación de gasas alcoholadas sobre heridas quirúrgicas.
11. Seguimiento posoperatorio de cada uno de los animales hasta la semana 16, registrando posibles complicaciones como infección, aflojamiento del fijador externo o muerte de los especímenes.

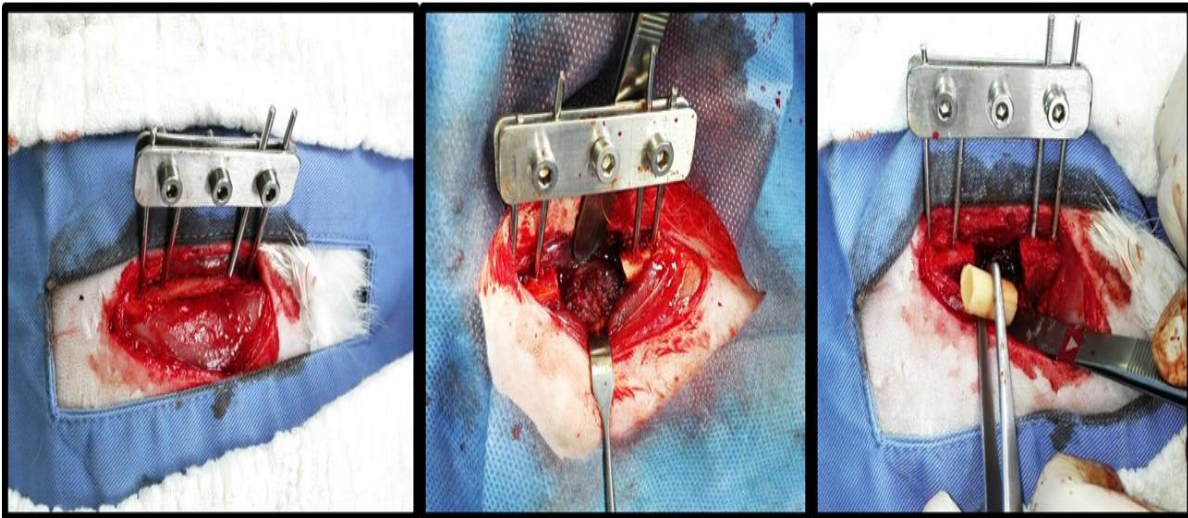


Figura 4: Procedimiento quirúrgico fase II.

Un segmento cortical diafisario de 1.5 cm fue osteotomizado y previamente fijado con ayuda de un tutor externo (diseñado por los autores) compuesto por 4 clavos roscados al hueso, dos láminas de acero y tres tornillos con rosca de seguridad para el posterior trasplante del aloinjerto.

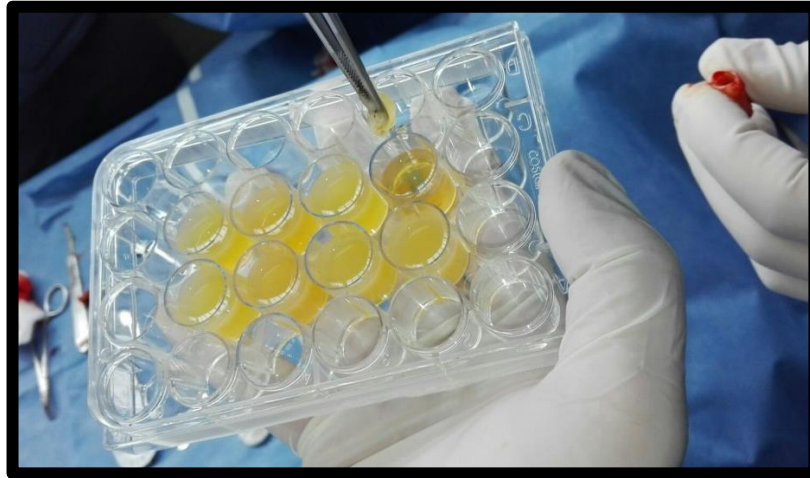


Figura 5: Procedimiento quirúrgico fase II.

12 ml de Hidrogel fue preparados a partir de plasma fresco humano como andamio biodegradable del implante para contener los Medios Condicionados (MC) por Células madre mesenquimales (MCS) de tejido adiposo (Ad-MCS).

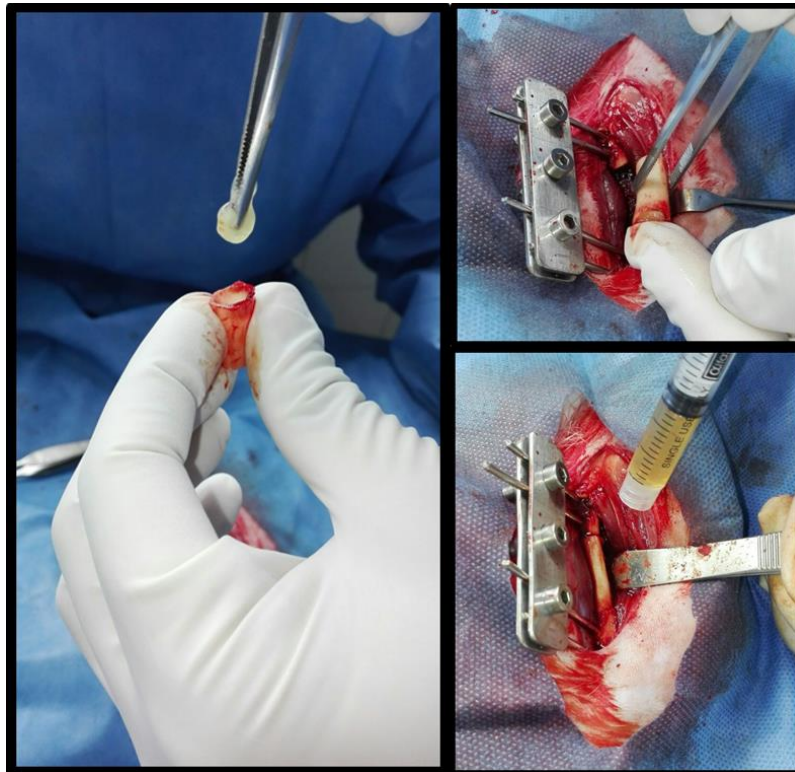


Figura 6: Procedimiento quirúrgico fase II.

En el Grupo B el Hidrogel es cargado en el canal medular del aloinjerto y el sobrenadante se aplica alrededor de los sitios de osteotomía.

3.3.3 Fase III: Interpretación de resultados. Evaluación radiológica.

El día 120 postquirúrgico a la Fase II (Semana 17), se realizó el sacrificio de los 8 ocho especímenes intervenidos, según protocolo descrito en la Fase I. Se realizó desarticulación de cadera de las extremidades intervenidas para evaluación radiológica. Se tomaron proyecciones anteroposterior (AP) y laterales del segmento anatómico correspondiente al muslo de cada conejo previamente intervenido y rotulado. Se valoró la calidad del callo y el aflojamiento del material.

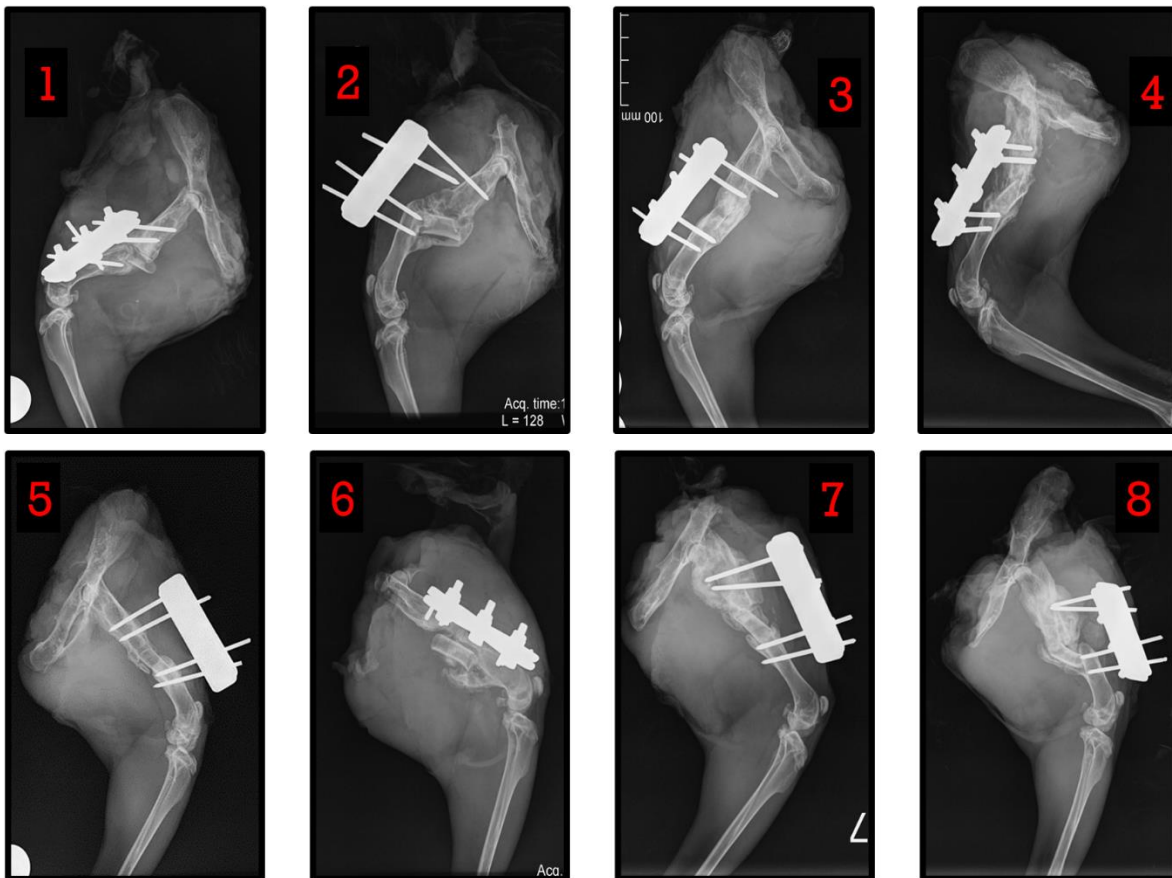


Figura 7: Procedimiento quirúrgico fase III.

Evaluación Radiológica postoperatoria. (Grupo A Conejos 1-4 y Grupo B Conejos 5-8)

3.3.4 Fase III: Interpretación de resultados. Evaluación Macroscópica e Histológica.

Las extremidades desarticuladas son despojadas de las inserciones musculares y demás tejidos blandos adyacentes conservando el callo óseo conformado. Se valora la estabilidad en la consolidación, mediante la percepción de movilidad en los sitios de unión aloinjerto - huésped con la manipulación del fémur total, se describen las características del callo y posición del aloinjerto. Figura 8.

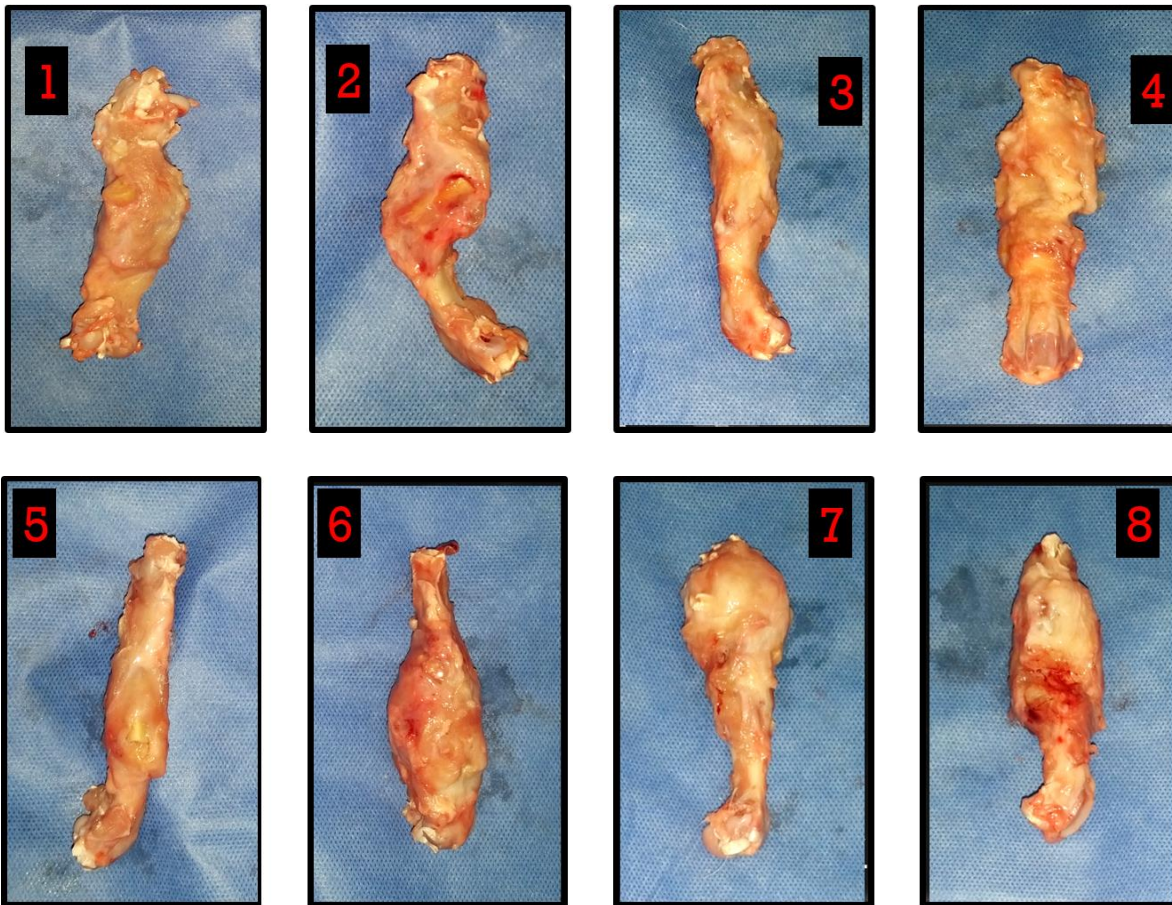


Figura 8: Procedimiento quirúrgico fase III.

Evaluación Macroscópica postoperatoria. (Grupo A Conejos 1-4 y Grupo B Conejos 5 -8)

El espécimen es fijado en formalina al 10%. Luego decalcificado en ácido fórmico al 30%. Después de la decalcificación se toma una tira longitudinal de 2 mm de espesor que contiene el aloinjerto y las interfaces proximal y distal de la porción central del fémur, denominando las zonas como Sitio de Interés (SDI). Estas tiras se bloquean en parafina y cortes de 10 micras son utilizados para tinción histológica con tinción básica que evaluara

el encierro del callo y con inmunohistoquímica marcador CD31 y CD34 que evaluará la angiogénesis local. Figura 9.

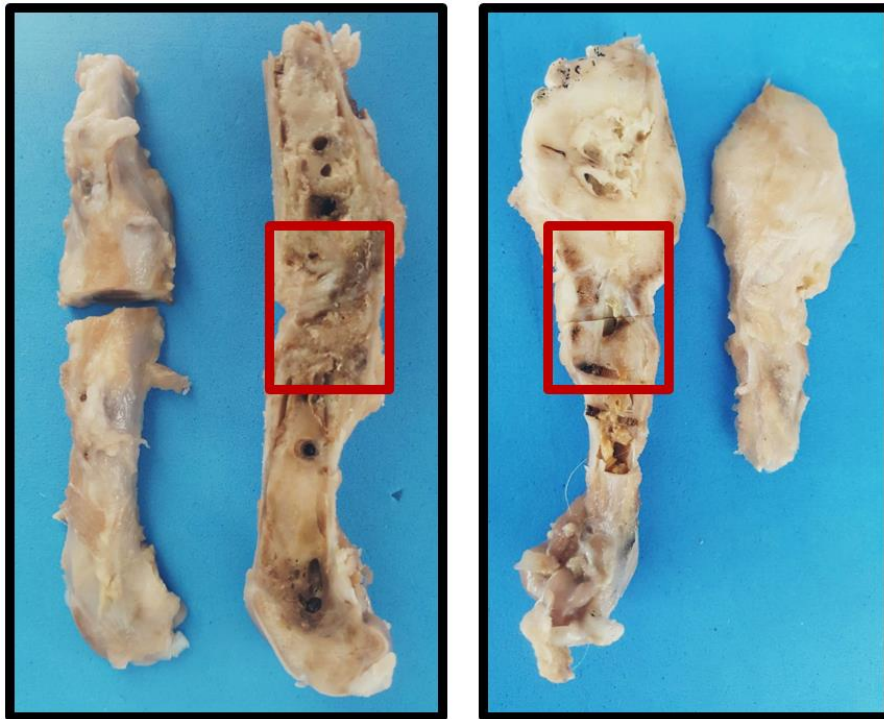


Figura 9: Procedimiento quirúrgico fase III.
Evaluación Histológica. (Grupo A SDI y Grupo B SDI)

4. Consideraciones éticas

Este estudio se realiza dentro de las normas éticas y los principios de bioética sugeridos por la UNESCO y la ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD para la experimentación en animales. Y la normatividad nacional descrita para tal fin incluida en la Ley No. 84 de 1989. "Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales", con especial énfasis al Capítulo Sexto: *Del Uso de Animales Vivos en Experimentos e Investigación.*

La investigación y los aportes que esta pueda generar son avalados por el grupo de investigación y su propiedad intelectual será determinada de acuerdo con la ley y los reglamentos expedidos por la universidad a este respecto; así mismo la autoría del presente trabajo será de los investigadores relacionados en la ficha inicial.

5.Resultados

5.1 Fase I

Durante la fase I se sacrificaron 2 conejos siguiendo el protocolo previamente establecido.

Se lograron recolectar en total 8 injertos estructurales cilíndricos diafisarios de fémur con técnica estéril, sin complicaciones. Se almacenaron al vacío en bolsas en un congelador a -4° durante 4 semanas. Después de este tiempo no se encontraron anomalías estructurales ni físicas macroscópicas de los aloinjertos, a la hora del trasplante.

5.2 Fase II

Durante la fase II se intervinieron 8 conejos (4 conejos del Grupo A y 4 conejos del Grupo B) siguiendo el protocolo previamente establecido sin presentarse complicaciones intraquirúrgicas ni postquirúrgicas. Las radiografías control mostraron adecuada posición del material de fijación y del aloinjerto en todos los casos, aunque con el hallazgo inesperado de presencia de fisura abierta en los especímenes.

No se documentaron manifestaciones sistémicas sugestivas de un proceso infeccioso o de dolor asociado a complicaciones mecánicas con el dispositivo de fijación.

Todos los conejos mantuvieron nivel de consumo líquido y sólido además de la capacidad de apoyo y deambulación durante las 12 semanas de observación.

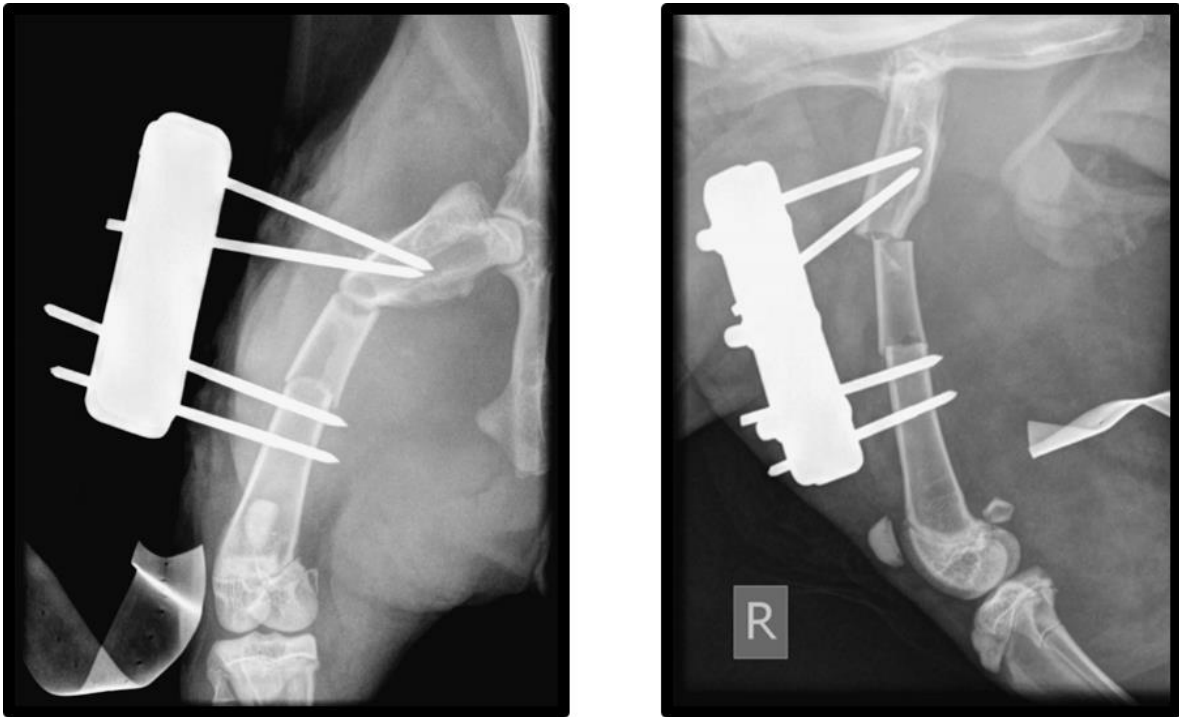


Figura 10: Procedimiento quirúrgico fase II.

Radiografía control postoperatoria que muestra adecuada colocación de material de fijación y la presencia de fisis abierta.

5.3 Fase III:

5.3.1 Evaluación Radiológica. Lectura convencional:

Se realizó evaluación de todas las radiografías a las 12 semanas de la fase II y después del sacrificio de los especímenes. Encontrando que todos los animales alcanzaron la madurez esquelética durante el estudio, determinada por el cierre de las fisas.

Se encontró una tendencia hacia la formación de callo óseo hipertrófico en los sitios de unión aloinjerto - huésped predominantemente en el Grupo B (Aloinjerto Congelado + Medios Condicionados) en comparación al callo visualizado en los sitios de unión del grupo A. De hecho en el Grupo B se observa callo óseo hipertrófico en sitios distales a la transición aloinjerto – huésped. El dispositivo de fijación externa se visualizó en adecuada posición en estos casos.

Se presentó un caso de aflojamiento del material de fijación en un espécimen de cada grupo asociado a la formación de callo óseo insuficiente, mala orientación del aloinjerto y deformidad angular. (Casos 2 y 6). Ver Figura 7.

5.3.2 Evaluación Macroscópica.

Se realizó valoración macroscópica de todas las piezas de fémur mediante inspección, verificación de la estabilidad del fijador externo, la presencia de signos de infección y movilidad en los sitios de unión aloinjerto – huésped.

A la inspección se encontró callo óseo hipertrófico en la mayoría de los especímenes del Grupo B en comparación los visualizados del Grupo A, lo que dificulto distinguir con facilidad los sitios de transición aloinjerto - huésped. Mediante palpación se encontró estabilidad (ausencia de movilidad) en los sitios de unión y adecuada fijación del tutor externo en ambos grupos.

En los casos 2 y 6 (Grupo A y Grupo B respectivamente), se encontró la formación de una colección caseosa en el tejido celular subcutáneo y en comunicación directa con los sitios de inserción del fijador asociada a movilidad en los sitios de unión, inadecuada orientación del aloinjerto, apariencia necrótica del aloinjerto, deformidad angular e inestabilidad a la manipulación en los sitios de consolidación. Estos hallazgos fueron compatibles con un proceso infeccioso. Ver figura 8.

5.3.3 Evaluación Histológica.

Todos los índices de vitalidad del injerto (formación de osteoide, encapsulamiento del callo y osteocitos vitales) fueron significativamente mayores en el grupo de aloinjerto con MC de Ad-MCS (Grupo B) en la valoración histológica con H-E. En el Grupo A no fue posible identificar con claridad el aloinjerto lo que dificultó su valoración descriptiva específica. La densidad de los vasos en el aloinjerto y en las zonas de consolidación no fue cuantificable, sin embargo la densidad de tejido positivo para la inmunohistoquímica con CD31 – CD34, fue significativamente mayor en el Grupo B.

Hallazgos Grupo A: Islotes de cartílago con osificación endocondral discreta en la periferia y en medio de las trabéculas de hueso neoformado hay lagunas de linfáticos. No parece haber mayor cantidad de vasos. En la periferia de los núcleos de osificación hay tejido fibroso. Las trabéculas de hueso son muy escasas y dispersas.

Hallazgos Grupo B: En la mayoría de casos se identifica el aloinjerto, parcialmente reabsorbido y aunque la mayoría de las trabéculas de hueso están desvitalizadas, es posible aún observar algunos osteocitos en las lagunas y del mismo modo en varias de ellas hay ribete osteoblástico activo y bien definido con medular vascularizada, fibrosa, vital. La neoformación de trabéculas de hueso es definitivamente más abundante, compacta y homogénea que en el Grupo A.

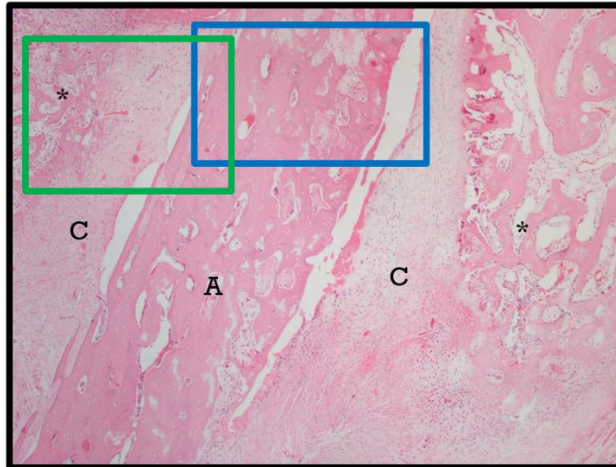
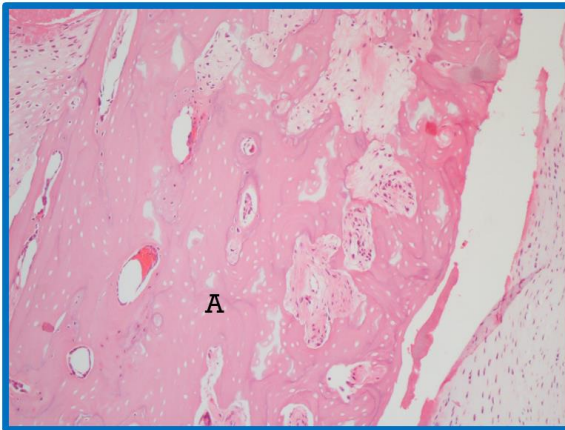


Figura 11: Evaluación Histológica.

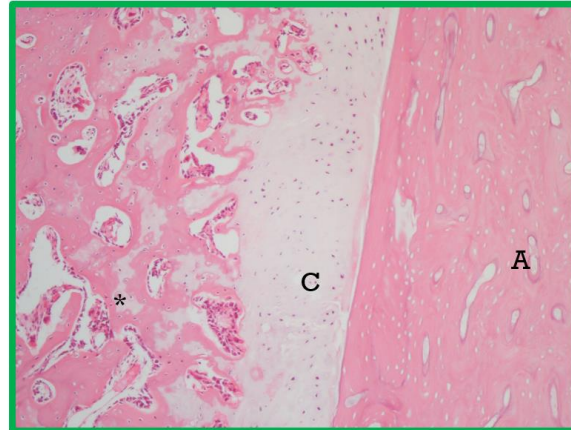
Sitio de Interés SDI. Grupo B. A: Cortical Aloinjerto, C: Cartílago, *: Osificación endocondral.
Cuadros Verde y Azul: Sitios de Magnificación. Ver Figura 12.



SDI: Tinción básica con Hematoxilina – Eosina.

Acercamiento Aloinjerto.

Aloinjerto, parcialmente reabsorbido y aunque la mayoría de las trabéculas de hueso están desvitalizadas, es posible aún observar algunos osteocitos en las lagunas y del mismo modo en varias de ellas hay ribete osteoblástico activo y bien definido con medular vascularizada, fibrosa, vital.



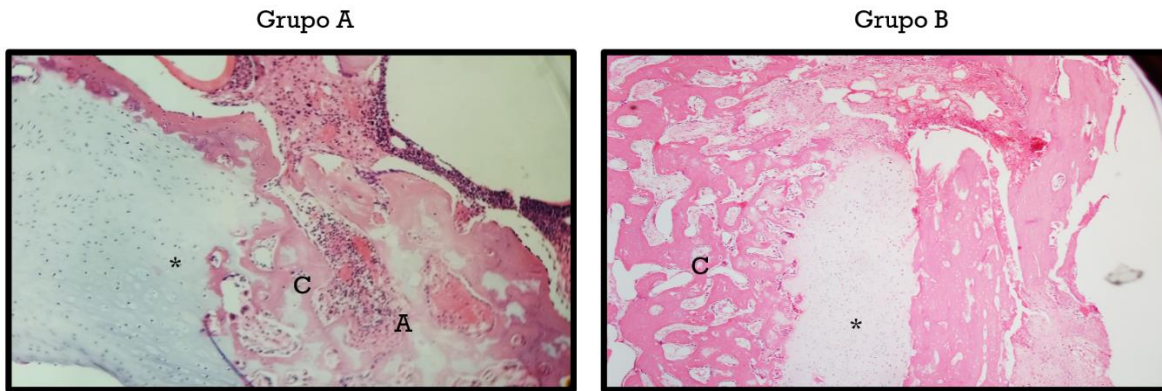
SDI: Tinción básica con Hematoxilina – Eosina.

Acercamiento Osificación Endocondral.

Banda de cartilago con osificación endocondral. La neoformación de trabéculas óseas es más abundante, compacta y homogénea que en el Grupo A.

Figura 12: Evaluación Histológica.

Magnificaciones Sitio de Interés (SDI)



SDI: Tinción básica con Hematoxilina – Eosina. Comparación Grupos A y B.

Figura 13: Evaluación Histológica.

Grupo A: Aloinjerto no identificable con islotes de cartílago con osificación endocondral discreta en la periferia. En la periferia los núcleos de osificación hay tejido fibroso. Las trabéculas de hueso son muy escasas y dispersas.

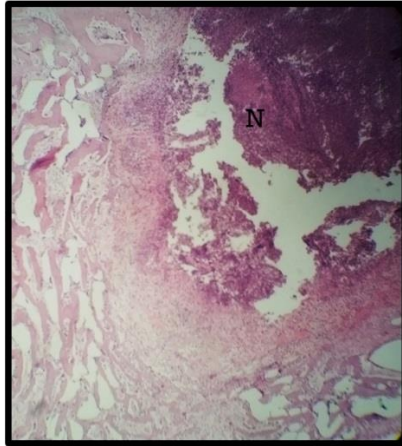
Casos de Infección Macroscópica (Caso 2 y 6).

Se realizó tinción básica con Hematoxilina y Eosina en los dos casos que se encontró aflojamiento del material, inadecuada posición del aloinjerto y movilidad en los sitios de unión para establecer características de la respuesta inflamatoria.

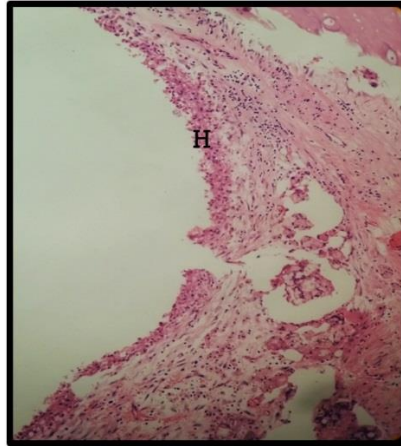
Hallazgos Grupo A (Caso 2): No se define el aloinjerto. Hay múltiples abscesos con material necro inflamatorio rico en neutrófilos. No es posible evaluar el material ya que el proceso inflamatorio estimula la producción de hueso. Compatible con proceso infeccioso bacteriano.

Hallazgos Grupo B (Caso 6): Respuesta inflamatoria granulomatosa con la presencia de ribete de histiocitos con tejido fibroso. Compatible con respuesta inflamatoria crónica como reacción a cuerpo extraño.

Grupo A: Caso 2



Grupo B: Caso 6



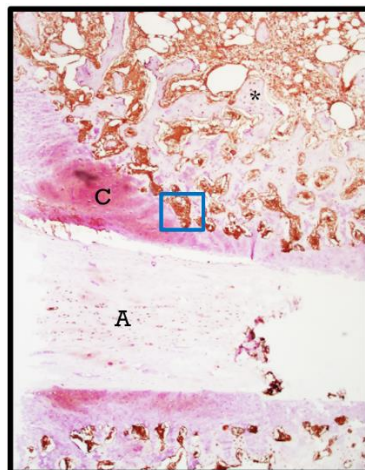
Tinción básica con Hematoxilina – Eosina. Casos de infección.

En el Caso 2: se encuentra la formación de múltiples abscesos con material necro inflamatorio rico en neutrófilos (N). En el Caso 6: Respuesta inflamatoria granulomatosa con la presencia de ribete de histiocitos (H) con tejido fibroso.

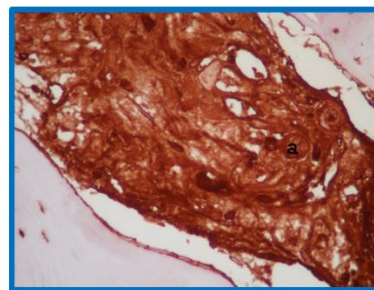
Figura 14: Casos de Infección.

5.3.4 Evaluación Inmunohistoquímica CD31 y CD34.

Los marcadores de inmunohistoquímica CD31 y CD34 no permitieron cuantificar la densidad vascular por falta de especificidad tisular, sin embargo se encontró mayor captación de contraste en los casos del grupo con MC de Ad-MCS (Grupo B), lo que puede indicar un ambiente enriquecido por una respuesta celular mayor, en el sitio de consolidación.



Caso Grupo B.



Las tinciones con CD31 y CD34 no permitieron hacer un conteo vascular.

En el Grupo A no se identificó con claridad el aloinjerto. Estos marcadores no son completamente específicos ni es posible diferenciar los capilares de otras estructuras.
a: Arteriola.

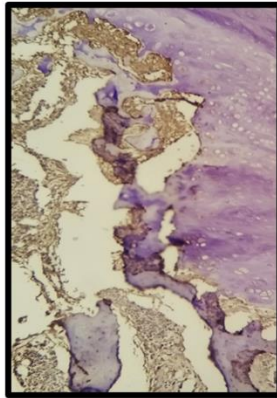
Figura 15: Evaluación Inmunohistoquímica.

Caso Grupo B con magnificación de las zonas de tinción. Se evidencian algunas arteriolas (a) pero no es posible identificar vasos menores como capilares.

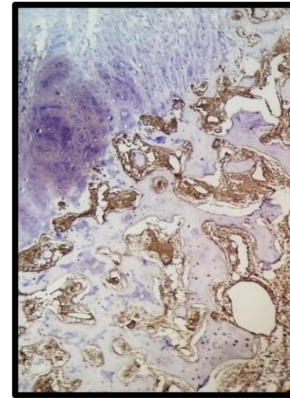
CD 31 y CD 34 positivos para Células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos, pero también:

- Células hematopoyéticas.
- Células madre mesenquimales.
- Plaquetas
- Megacariocitos
- Macrófagos.
- Osteoclastos .
- Linfocitos T y NK

Caso Grupo A.



Caso Grupo B.



Se presentó una mayor captación de contraste de forma generalizada, con CD31 y CD34, en el tejido de los casos del Grupo B.

Figura 16: Evaluación Inmunohistoquímica.

Captación de inmunomarcadores de forma comparativa Grupo A y Grupo B.

6. Discusión

6.1 Técnica de trasplante aloinjerto óseo diafisario congelado en Conejos

Con el presente trabajo se reprodujo la técnica de trasplante de aloinjerto óseo congelado para manejo de defectos óseos en espécimen animal utilizando como dispositivo de fijación un tutor externo diseñado por los autores. Sin embargo la cantidad de muestra fue limitada y los hallazgos macroscópicos, radiológicos e histológicos son de corte trasversal. Se deben realizar estudios que permitan valorar de manera secuencial en el tiempo los diversos puntos evaluados y permitan establecer una tendencia de evolución.

6.2 Medios condicionados MC producidos por células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo por MSC-Ad y angiogénesis en el trasplante de aloinjertos óseos diafisarios.

Las Células madre derivadas del tejido adiposo son similares a las derivadas de la Medula ósea dado que son capaces de madurar a través de múltiples tejidos mesodérmicos, incluyendo hueso, cartílago y grasa; estas son inmunosupresoras y expresan marcadores de superficie similares. Las Células madre derivadas de tejido adiposo son únicas porque se pueden obtener fácilmente en una forma mínimamente invasiva cosechadas a través de una liposucción o biopsia grasa en una cantidad significativa sin la necesidad de expansión en cultivos. Por esta razón son atractivas para las terapias celulares basadas en la regeneración de tejidos.

Las características de las MCS-Ad incluyen la secreción de factores de crecimiento reparadores, capacidad de diferenciación multilineaje, inmunosupresión de células inmunes activadas y rastreo de áreas de lesión.

Secreción de factores de crecimiento: el secretoma de las MCS-Ad consiste en factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de matriz extracelular, proteasas, hormonas y

mediadores lipídicos. La expresión de proteínas derivadas de MCS-Ad es dirigida por estímulos locales dentro del ambiente y es influenciada por el estado de diferenciación celular.

De las proteínas descritas secretadas por las MCS-Ad, varias tienen aplicaciones en la regeneración tisular y pueden ser benéficas si se utilizan apropiadamente. Factores como el Factor de crecimiento endotelial, Factor de crecimiento hepático y factor de crecimiento Transformante Beta promueven la angiogénesis y la cicatrización de heridas potenciando el desarrollo y crecimiento de nuevo tejido. Factores como la prostaglandina E2 y la Interleuquina 10, son inmunosupresores y reducen la maduración de células dendríticas y la consecuente activación de linfocitos T helper, reduciendo la inflamación y formación de tejido de granulación.

El CD31 y CD34 son inmunomarcadores para células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos por lo que son utilizados para valorar la angiogénesis de algunos tumores en asociación con el factor de Von Willebrand. Por esta razón se planteó su utilización para intentar cuantificar la densidad vascular en las porciones centrales del aloinjerto como prueba del efecto angiogénico de los Medios Condicionados. Sin embargo, el CD31 es normalmente observado en las células endoteliales, reacciona además con plaquetas, megacariocitos, macrófagos, granulocitos, linfocitos T y NK, osteoclastos y neutrófilos. Por su parte el CD34 marca normalmente en el cordón umbilical, células hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células endoteliales progenitoras y maduras pero no es tan homogéneo como el CD31 en linfáticos. Igualmente en mastocitos, en algunas células dendríticas, en el intersticio y alrededor de los anexos cutáneo dérmicos [46]. De tal manera que son marcadores inespecíficos y aún más cuando se interpretan en el contexto de un proceso de consolidación como la integración de aloinjertos vasculares. La mayor cantidad de captación de los marcadores en el Grupo B puede estar determinada por la presencia aumentada de varios de los grupos celulares para los cuales estos marcadores son positivos.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

- Es posible la utilización de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales, basado en su efecto paracrino, como potenciador de la integración de aloinjertos estructurales congelados no vascularizados en conejos para el tratamiento de defectos óseos en huesos largos.
- La principal limitación del estudio radica en el pequeño tamaño de la muestra de animales de experimentación y los hallazgos encontrados son puramente descriptivos y a partir de ellos no se pueden hacer conclusiones generalizadas.
- Se encontró formación de callo óseo redundante macroscópica y radiológicamente en la mayoría de especímenes del Grupo B (Aloinjerto + Medios Condicionados) al compararlos con las características de consolidación del Grupo A.
- Todos los índices de vitalidad del injerto (formación de osteoide, encapsulamiento del callo y osteocitos vitales en el aloinjerto) fueron significativamente mayores en el grupo de aloinjerto con MC de Ad-MCS en la valoración histológica con H-E.
- La densidad de los vasos en el aloinjerto y en las zonas de consolidación no fue cuantificable, sin embargo la densidad de tejido positivo para la inmunohistoquímica con CD31 – CD34, fue significativamente mayor en el Grupo B.

7.2 Recomendaciones

Los hallazgos encontrados plantean una alternativa para el tratamiento de defectos óseos en huesos largos. Estos hallazgos deben ser evaluados con nuevos estudios en los cuales se aumente la muestra estudiada y con un diseño de corte longitudinal que permita realizar observaciones en diferentes tiempos de la integración. Adicionalmente es importante la realización de estudios con marcadores metabólicos que precisen otros mecanismos de acción de los Medios Condicionados.

Bibliografía

1. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC: Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009, 9(2):61–71.
2. Albrektsson T, Johansson C: Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001, 10(Suppl 2):S96–101.
3. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA: Alternatives to autogenous bone graft efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995, 3(1):1–8.
4. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA: The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002, 84-A(6):1032–1044.
5. Liu Y, de Groot K, Hunziker EB: BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone* 2005, 36(5):745–757.
6. Wang W, Ouyang Y, Poh CK: Orthopaedic implant technology: biomaterials from past to future. *Ann Acad Med Singapore* 2011, 40(5):237–244.
7. Weiland AJ, Daniel RK. Microvascular anastomoses of bone grafts in the treatment of massive defects in bone. *J Bone Joint Surg Am* 1979;61:98–104.
8. Campanacci M, Costa P. Total resection of distal femur or proximal tibia for bone tumours. Autogenous bone grafts and arthrodesis in twenty-six cases. *J Bone Joint Surg Br* 1979;61:455–63.
9. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 1996;324:86–97.
10. Sim FH, Beauchamp CP, Chao EY. Reconstruction of musculoskeletal defects about the knee for tumor. *Clin Orthop Relat Res* 1987;221:188–201.
11. Yamamuro T. Bone bonding behavior and clinical use of A-W glass-ceramic. In: Urist MR, O'Connor BT, Burwell G, editors. *Bone grafts, derivatives, and substitutes*. Great Britain: Butterworth-Heinemann; 1994:245–59.

12. Yusof N, Hilmy N. Need for radiation sterilization of tissue grafts. In: Nather A, Yusof N, Hilmy N, editors. Radiation in tissue banking. Basic science and clinical applications of irradiated tissue allografts. Singapore: World Scientific; 2007:11–21.
13. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumours. *Clin Orthop Relat Res* 1996;324:86–97.
14. Nather A. Healing of large diaphyseal deep-frozen cortical allografts. In: Nather A, editor. Bone grafts and bone substitutes. Basic science and clinical applications. Singapore: World Scientific; 2005:227–41.
15. Nather A, Balasubramaniam P, Bose K. Healing of non-vascularised diaphyseal bone transplants. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:830–4.
16. Nather A. Healing of large, non-vascularised, cortical autologous bone transplants: an experimental study in adult cats. In: Nather A, editor. Bone grafts and bone substitutes. Basic science and clinical applications. Singapore: World Scientific; 2005:119–36.
17. Wheeler DL, Enneking WF. Allograft bone decreases in strength in vivo over time. *Clin Orthop Relat Res* 2005;435:36–42.
18. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 1993;293:317–26.
19. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998;16:247–52.
20. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83(Suppl1):S1–6.
21. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638–46.
22. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:985–96.
23. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. 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* 2000;49:328–37.

-
24. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385–6.
 25. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004;10:955–64.
 26. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res* 2005;435:62–8.
 27. Salem HK, Thiemermann C (2010) Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28: 585-596.
 28. Im GI, Shin YW, Lee KB (2005) Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13: 845-853.
 29. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295.
 30. Monaco E, Bionaz M, Hollister SJ, Wheeler MB Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology* 75: 1381-1399.
 31. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100: 1249-1260.
 32. Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J (2010) Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int* 2010: 215625.
 33. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, et al. (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101: 3722-3729.
 34. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR (2008) Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 815-820.
 35. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 419-427.

36. Hocking AM, Gibran NS (2010) Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 316: 2213-2219.
37. Horie M, Choi H, Lee RH, Reger RL, Ylostalo J, et al. (2012) Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1197-1207.
38. Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gnecci M, Dzau VJ (2011) Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 50: 280-289.
39. Timmers L, Lim SK, Hofer IE, Arslan F, Lai RC, et al. (2011) Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res* 6: 206-214.
40. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE (2010) Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res* 316: 1271-1281.
41. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3: e1886.
42. Horn AP, Frozza RL, Grudzinski PB, Gerhardt D, Hoppe JB, et al. (2009) Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Res* 63: 35-41.
43. Linero I, Chaparro O (2014) Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue in Bone Regeneration. *PLoS ONE* 9(9): e107001. doi:10.1371/journal.pone.0107001
44. Fletscher G, Castro R, Linero I, Chaparro O. (2014). Modificación experimental de la técnica de membrana inducida (Masquelet) mediante uso de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales. Grupo de investigación de Biología de células Madre Universidad Nacional de Colombia.
45. Bryan N, Rhodes NP, Hunt JA (2009) Derivation and performance of an entirely autologous injectable hydrogel delivery system for cell-based therapies. *Biomaterials* 30: 180-188

46. Miettinen M1, Lindenmayer AE, Chaubal A. (1994) Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens--evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor
Mod Pathol. 7(1):82-90.

.