



**Escuela de Medicina
Centro de Investigaciones Biomédicas**

“FUNDAMENTOS, DESARROLLO Y APLICACIONES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN TENDINITIS Y OSTEOARTRITIS EQUINA”

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular**

MARÍA IGNACIA ORTÚZAR O’RYAN

**Director de Tesis: Joan Villena
Codirector de Tesis: Sebastián San Martín
Supervisor Programa: Mario Párraga**

FECHA: 21 de Enero 2016



Escuela de Medicina
Programa de Magíster en Ciencias Médicas
Mención Biología Celular y Molecular

“Fundamentos, desarrollo y aplicaciones de células madre mesenquimales en tendinitis y osteoartritis equina”

María Ignacia Ortúzar O’Ryan

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Joan Villena, en el laboratorio de cultivos celulares, aprobado por los miembros de la Comisión.

Dr. Joan Villena
Director de Tesis

Dr. Mario Párraga
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Tomás Egaña
Comisión Evaluación Tesis

M.V. Pierpaolo Pietrantoni
Comisión Evaluación Tesis

Valparaíso, Chile 2015

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico (araquidonic acid)

AD-SVF: fracción vascular estromal de tejido adiposo (*adipose-derived stromal vascular fraction*).

AINES: antiinflamatorios no esteroideos (non-steroidal anti-inflammatory drug)

AM: membrana amniótica (*amniotic membrane*).

AT-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (*adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*).

b-FGF: factor de crecimiento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*).

BM-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (*bone marrow mesenchymal stem cells*).

BMP: proteína morfogenética ósea (*bone morphogenetic protein*).

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*calcitonin gene-related peptide*).

COMP: proteína oligomérica de la matriz del cartílago (*cartilage oligomeric matrix protein*).

EAMSCs: células madre mesenquimales derivadas de membrana amniótica equina (*equine amniotic membrane mesenchymal stem cells*).

EGF: factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*).

ES: células madre embrionarias (*embryonic stem cell*).

FC: factores de crecimiento (*growth factor*).

GAGs: glicosaminoglicanos (*glycosaminoglycans*).

GDF: factor de crecimiento y diferenciación (*growth differentiation factor*).

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*).

HA: ácido hialurónico (*hyaluronic acid*).

HGF: factor de crecimiento hepatocitario (*hepatocyte growth factor*).

HSC: células madre hematopoyéticas (*hematopoietic stem cell*).

IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina (*insulin-like growth factor-I*).

iPS: células madre pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cell*).

ISCT: sociedad internacional de terapia celular (*international society for cellular therapy*).

LS: ligamento suspensor (*suspensory ligament*).

MEC: matriz extracelular (*extracellular matrix*).

MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad clase I (*major histocompatibility complex class I*).

MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II (*major histocompatibility complex class II*).

MMPs: metaloproteinasas de la matriz (*matrix metalloproteinases*).

MO: médula ósea (*bone marrow*).

MSCs: células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells*).

NO: óxido nítrico (*nitric oxide*).

OA: osteoartritis (*osteoarthritis*).

PDGF: factor de crecimiento plaquetario (*platelet derived growth factor*).

PGA: ácido poliglicólico (*polyglycolic acid*).

PGE₂: prostaglandina E₂ (*prostaglandin E₂*).

PGs: proteoglicanos (*proteoglycans*).

PIA: presión intraarticular (*intra-articular pressure*).

PLA: ácido poliláctico (*polylactic acid*).

PMN: leucocito polimorfonuclear (*polymorphonuclear leukocyte*).

PRP: plasma rico en plaquetas (*platelet-rich plasma*).

SC: célula madre (*stem cell*).

SM-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de membrana sinovial (*synovial membrane mesenchymal stem cells*).

TFDP: tendón flexor digital profundo (*deep digital flexor tendon*).

TFDS: tendón flexor digital superficial (*superficial digital flexor tendon*).

TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β (*transforming growth factor- β*).

TH: tirosina hidroxilasa (*tyrosine hydroxylase*).

TIMPs: inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (*tissue inhibitors of metalloproteinases*).

TNF: factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*).

TSPC's: células madre/progenitoras de tendón (*tendon stem/progenitor cells*).

UCB: sangre de cordón umbilical (*umbilical cord blood*).

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (*vascular endotelial growth factor*).

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (*vascular endotelial growth factor*).

WJ: gelatina de Wharton (*Wharton's jelly*).

INDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
3. OBJETIVOS	9
4. METODOLOGÍA	9
4.1. Flujograma de búsqueda	11
5. MOTIVACIÓN.....	12
5.1. Importancia de las lesiones musculoesqueléticas.....	12
6. GENERALIDADES DE TENDONES Y ARTICULACIONES DEL EQUINO	12
6.1. Fundamentos teóricos en Tendones y ligamentos.....	12
6.1.1. Definición y función.....	13
6.1.2. Estructura Básica de tendones y ligamentos	14
6.1.3. Patogenia de la lesión.....	16
6.1.4. Reparación del tendón por mecanismos naturales.....	17
6.2. Fundamentos teóricos en Articulaciones.....	18
6.2.1. Bases anatómicas y fisiológicas de las articulaciones sinoviales.....	18
6.2.2. Fisiopatología de la osteoartritis (OA)	20
6.2.3. Reparación del cartílago por mecanismos naturales. Pronóstico	21
7. MEDICINA CONVENCIONAL	21
7.1. Terapia reparativa en tendones y ligamentos	21
7.2. Terapia reparativa en articulaciones.....	22
8. MEDICINA REGENERATIVA	22
9. CELULAS MADRE.....	26
9.1. Generalidades de las células madre	26
9.2. Clasificación de las células madre.....	28
9.3. Células madre embrionarias (ES) y adultas.....	29
9.4. Células madre mesenquimales (MSCs).....	30
9.4.1. Nomenclatura.....	31
9.4.2. Fuentes de origen de MSCs	33
9.4.2.1. MSCs de Médula ósea (BM-MSCs)	33
9.4.2.2. MSCs de Tejido Adiposo (AT-MSCs)	35
9.4.2.3. Sangre Periférica (SP)	36
9.4.2.4. Membrana Sinovial (SM) y líquido sinovial.....	37
9.4.2.5. Tejidos extraembrionarios.....	37

9.4.3. Morfología	40
9.4.4. Caracterización.....	41
9.4.5. Mecanismo de acción	44
9.4.6. Inmunogenicidad.....	45
9.4.7. Microambiente o Nicho	48
10. APLICACIONES TERAPEUTICAS DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs).....	52
10.1. Consideraciones Generales	52
10.2. En tendinitis.....	53
10.3. En osteoartritis (OA).....	57
11. CONCLUSIONES	63
12. REFERENCIAS	64

1. RESUMEN

Las enfermedades más comunes en el caballo son aquellas que afectan su aparato locomotor. Cerca del 82% de la pérdida de rendimiento en estos ejemplares es debido a estas causas, lo que se manifiesta como claudicación. Alrededor del 50% corresponden a lesiones de tendones y ligamentos. Por otro lado las lesiones articulares representan la mayor causa de retiro en el caso de los caballos deportivos y la enfermedad de mayor relevancia es la Osteoartritis (OA). La principal problemática de estas patologías en equinos es la elección del tratamiento, ya que por lo general esto se realiza basado en la experiencia clínica y muy poco en la fisiología de tendones y articulaciones. El tratamiento convencional es la elección más común e incluye la utilización de antiinflamatorios no esteroideos e inyecciones de glucocorticoides, entre otros. Además en algunos casos se complementan con reposo y fisioterapia. Sin embargo estos tratamientos sólo están dirigidos a disminuir los síntomas y mejorar la recuperación clínica, sin producir una reparación real, funcional y estructural, por lo que la reincidencia es cercana al 80%. Durante los últimos años se ha incrementado y profundizado el conocimiento sobre la fisiopatología de estas lesiones, lo que ha permitido establecer, en parte, la causa de los fracasos obtenidos con los tratamientos convencionales. Buscando alternativas a éstos, es que la medicina regenerativa se perfila como un buen candidato. **Objetivo:** realizar un análisis detallado de la literatura científica, que permita describir los fundamentos, desarrollo y aplicaciones de células madre mesenquimales (MSCs) en tendinitis y osteoartritis equina, como alternativa de tratamiento, proyecciones y posibles alcances. **Conclusión:** a diferencia de los tratamientos convencionales, la utilización de MSCs en este tipo de lesiones, ayudan al organismo para que él se encargue de regenerar y devolver las capacidades al tejido dañado, disminuyendo las probabilidades de reincidencia de la lesión. Las investigaciones clínicas de MSCs en equinos han dado lugar a muchos resultados prometedores, sin embargo, se requiere una mayor cantidad de estudios *in vivo* e *in vitro* para comprender en profundidad la biología de las MSC equinas y los mecanismos fundamentales de los efectos regenerativos de las células. Además, es importante destacar el beneficio de las ventajas únicas que el equino ofrece como modelo animal de investigación. Las terapias de MSCs deben ser complementadas con programas de rehabilitación y fisioterapia para obtener resultados exitosos.

Palabras clave: *Stem Cell - Regenerative medicine - Tendon injuries - Tendinitis - Osteoarthritis - Joint injuries - Equine.*

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades más comunes en el caballo son aquellas que afectan su aparato musculoesquelético. Estudios realizados en caballos de carreras sugieren que estas lesiones producen importantes pérdidas económicas [1] y que representan cerca del 82% de los problemas de pérdida de rendimiento manifestado clínicamente como claudicación y entre el 46 y el 53% con lesiones de tendones y ligamentos [2]. En equinos, las patologías articulares, principalmente osteoartritis (OA), representan la mayor causa de disminución del rendimiento atlético, llevando al retiro prematuro de competencia [3][4]. Uno de los principales problemas relacionados con las patologías articulares y tendinopatías del caballo es la elección del tratamiento [5][6]. En el área veterinaria se toman decisiones terapéuticas basadas en sus experiencias clínicas [7] y pocas en el conocimiento actual de la fisiopatología de tendones y articulaciones [8][5]. El tratamiento médico convencional de estas patologías en el caballo incluye la utilización de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), glicosaminoglicanos polisulfatados (PSGGs), inyección de corticosteroides (CS), ácido hialurónico (HA) [5][9][10][11]. En los casos de tendinopatía y desmopatía agudas se emplean fármacos combinados con reposo, hidroterapia y vendajes, además de monitorización ecográfica de la lesión y un programa de ejercicio controlado [12][5][9]. Sin embargo, estos tratamientos sólo están dirigidos a mitigar los síntomas o mejorar la recuperación clínica, sin inducir una regeneración real [13].

Las lesiones en tendones y ligamentos sanan muy lentamente y el tejido reparado no tiene las mismas características de elasticidad y fuerza que el tejido original [14]. Esto hace que los caballos afectados con estos problemas tengan una predisposición de recaída aproximadamente del 80% a pesar de emplear cualquier tipo de tratamientos convencionales o terapia física [1]. Esta situación no es diferente a lo que sucede en seres humanos afectados por tendinopatías y patologías articulares [15][7]. Durante los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la biología del tejido conectivo y se han podido esclarecer a nivel molecular varios procesos bioquímicos relacionados con la fisiopatología de estas lesiones [16][17][18]. Esto ha permitido esclarecer, en parte, la causa de los fracasos obtenidos con la terapéutica convencional y ha abierto una nueva era en el tratamiento de estas lesiones, la terapia regenerativa.

La solución para las tendinitis y osteoartritis sufridas por los equinos de deporte ha sido por años el dilema de los médicos veterinarios que se dedican a tratar este tipo de lesiones. La medicina regenerativa, utilizando células madre equinas, surge como un

método innovador, que permite atravesar la barrera de resolución mantenida en el tiempo y con ventajas que superan a las terapias tradicionales, que no proporcionan una recuperación total del paciente [19].

3. OBJETIVOS

Objetivo General: Realizar un análisis de la literatura científica que permita describir los fundamentos, desarrollo y aplicaciones de células madre mesenquimales en tendinitis y osteoartritis equina.

Objetivo Específico 1: Revisar anatomía, mecanismos de lesión y reparación de tendones y articulaciones equinas.

Objetivo Específico 2: Definir, clasificar y describir los mecanismos de acción y principales características de las células madre mesenquimales.

Objetivo Específico 3: Describir el uso de terapia basada en el uso de células madre en tendinitis y osteoartritis equina como alternativa terapéutica.

4. METODOLOGÍA

Durante el desarrollo de esta tesis bibliográfica fueron recopilados artículos relacionados directamente con las siguientes palabras claves:

- *Regenerative medicine*
- *Stem Cell*
- *Tendon Injuries (tendinitis)*
- *Osteoarthritis (Joint injuries)*
- *Equine*

La estrategia utilizada para identificar los estudios se basó en los siguientes criterios de selección:

- Fueron buscados artículos publicados desde el año 1964 hasta Agosto del 2015.
- Fueron consideradas revisiones, ensayos clínicos, estudios experimentales y libros.
- Fueron incorporados publicaciones de investigación realizadas en animales y humanos.
- No fueron usados filtros de sexo ni edad.

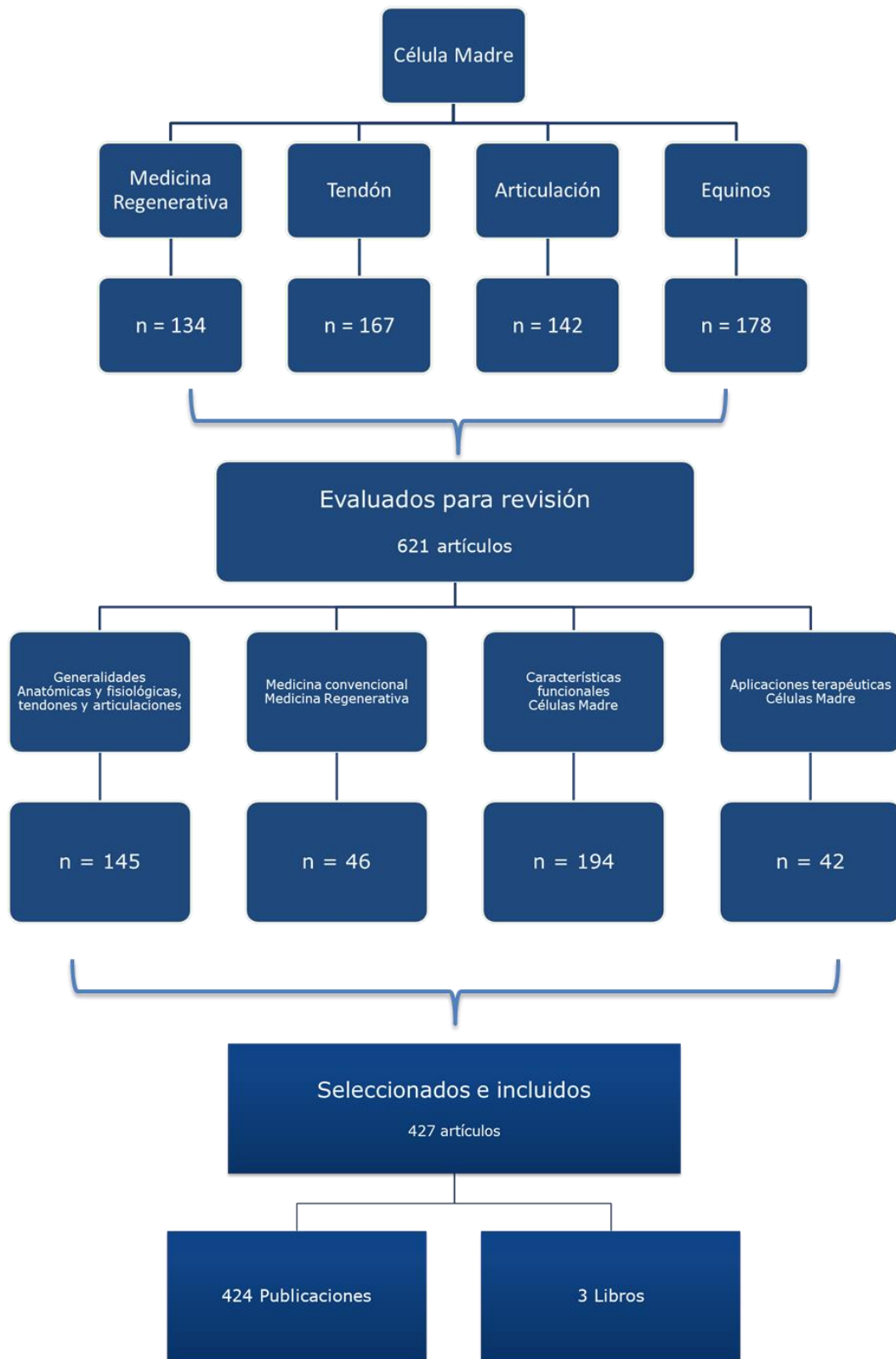
- El idioma de búsqueda fue inglés.

Además para la elección de la información fueron seleccionados artículos mediante la lectura de los resúmenes y títulos de los trabajos que contenían los siguientes criterios de inclusión:

- Artículos relacionados con generalidades anatómicas y fisiopatológicas de tendones y articulaciones.
- Artículos relacionados con medicina convencional y medicina regenerativa.
- Artículos relacionados con las características y funcionalidad de las células madre.
- Artículos relacionados con las aplicaciones terapéuticas de células madre mesenquimales en tendinitis y osteoartritis.

Para la recopilación de la información fue utilizado MEDLINE como base de datos y PubMed como buscador, utilizando el Proxy de la Universidad de Valparaíso. Además se usó el programa Mendeley® como organizador bibliográfico. Se sumaron diversas combinaciones de las palabras claves antes mencionadas, pero para lograr un enfoque relacionado con el tema de investigación se utilizó *Stem Cell*, como palabra clave inicial y posteriormente el resto de ellas, obteniéndose con los siguientes resultados: *Regenerative medicine*, 134 artículos; *Tendon injuries (tendinitis)*, 167 artículos; *Osteoarthritis (Joint injuries)*, 142 artículos; *Equines*, 178 artículos. La suma total de ellos fue de 621 artículos, datos obtenidos a fines de Agosto 2015. Sobre estos se aplicaron criterios de selección para finalmente identificar aquellos que no cumplían con éstos límites y sólo trabajar con los que sí se incluirían en el trabajo. Todo esto, en conjunto con los capítulos de tres libros, arrojó un resultado total 427 artículos, cifra final incorporada en esta tesis (Ver flujograma de búsqueda).

4.1. Flujograma de búsqueda



5. MOTIVACIÓN

5.1. Importancia de las lesiones musculoesqueléticas

Estudios epidemiológicos demuestran que las lesiones musculoesqueléticas son una de las causas más importantes de un rendimiento deportivo pobre o de la retirada prematura de los caballos de la competición. Se sabe que, considerando todos los tipos de caballos de deporte en su conjunto, la claudicación aparece con más frecuencia en la extremidad anterior que en la posterior (60% vs 40%), probablemente debido a que el centro de gravedad del caballo está situado más cerca de las extremidades anteriores [20][21]. En general, en la extremidad anterior, hasta el 95% de las lesiones se localizan en las partes distales al carpo y, entre estas, casi la mitad (46%) corresponden a lesiones de tejidos blandos (TB): ligamento suspensor (LS), tendón flexor digital superficial (TFDS), tendón flexor digital profundo (TFDP) [14][22].

Aparte de las lesiones de los tejidos blandos, el otro gran capítulo que integra el conjunto de lesiones musculoesqueléticas se refiere a la patología articular. Algunos estudios señalan que el 60% de las claudicaciones están relacionadas con la osteoartritis (OA)[21][23][24].

Frente a este panorama, existe un creciente interés en el área de la medicina veterinaria por los resultados de las investigaciones que se están realizando en el campo de la medicina regenerativa, especialmente en tratamientos con células madre equinas.

En teoría, las células madre pueden actuar mejorando las condiciones extra celulares en el lugar de la injuria, o bien pueden diferenciarse y reemplazar las células dañadas [25]. En equinos, el resultado que se obtiene luego del tratamiento en la gran mayoría de los casos, es un tejido completamente sano o muy similar al original, sin la presencia de cicatrices que se generan con tratamientos convencionales y que provocan la pérdida de elasticidad de los tejidos llevando a reincidencia [26][27][28].

6. GENERALIDADES DE TENDONES Y ARTICULACIONES DEL EQUINO

6.1. Fundamentos teóricos en Tendones y ligamentos

Las lesiones en tendones y ligamentos son frecuentes en caballos y representan un reto terapéutico. A pesar del esfuerzo de mentalización y difusión cultural realizado

entre todas las personas dedicadas a la medicina veterinaria del caballo sobre la importancia de la detección precoz de la lesión, de la tecnología orientada al diagnóstico por imagen y del rango de tratamiento disponibles [29], el porcentaje de reincidencia es muy alto, variando según la especialidad deportiva entre un 43% y 93% [9][12].

La incidencia de lesiones en tendones y ligamentos se ha estimado entre un 11% y un 46%. Concretamente en caballos Fina Sangre de Carrera, las lesiones de tendones constituyen la causa más importante de retirada de las carreras. Las lesiones del tendón flexor digital superficial (TFDS) son las más frecuentes entre los tejidos blandos distales al carpo [29]. En otras disciplinas deportivas tales como doma, salto, polo, enduro, se observa un incremento de lesiones del ligamento suspensor (LS), TFDS y el ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo (TFDP). En teoría, el TFDS y el LS son más propensos a las lesiones que el TFDP porque los primeros reciben la carga en el momento del apoyo, mientras que el TFDP interviene algo más tarde. Cada especialidad deportiva conlleva un escenario propio donde el caballo, el hombre y el terreno interactúan de forma particular, requiriendo esfuerzos anatómicos específicos, predisponiendo a determinadas lesiones [30].

6.1.1. Definición y función

La distinción entre tendones y ligamentos normalmente se ha basado en aspectos anatómicos; los tendones se interponen en la unión músculo-hueso, mientras que los ligamentos intervienen en la unión hueso-hueso. Las investigaciones sobre la topografía, la biomecánica y la composición de la matriz han revelado una combinación de estas dos estructuras en una serie de tendones y ligamentos anatómicamente "puros" [16][14]. Los tendones y ligamentos pueden tener una función meramente "posicional", tal es el caso del tendón extensor digital común, o actuar como elementos "elásticos que almacenan energía" para lograr una locomoción más eficiente, como es el caso del tendón flexor digital superficial (TFDS), tendón flexor digital profundo (TFDP) y el ligamento suspensor (LS). La energía acumulada se libera durante la fase de propulsión. Estos tendones "acumuladores de energía" cuentan con unos ligamentos accesorios que unen el tendón directamente al hueso, brindando un soporte en los momentos de carga máxima [16][9][14]. (Ver figura 1)

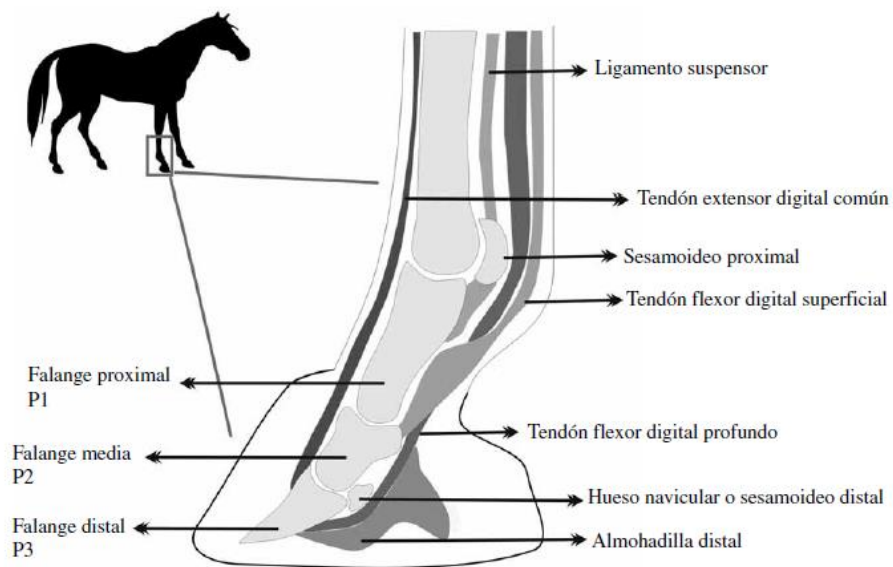


Figura 1. ESQUEMA ANATOMÍA DISTAL DEL PIE EQUINO. Smith et al. (2004).

Los ligamentos están sujetos a fuerzas con múltiples vectores direccionales dependiendo del grado de movilidad de la articulación [31], por ejemplo, los ligamentos periarticulares se alinean y estabilizan huesos adyacentes y proporcionan una resistencia pasiva frente al movimiento. Estas distintas funciones parecen tener algunas especificidades de la composición química y en la estructura de estos tejidos [32].

6.1.2. Estructura Básica de tendones y ligamentos

El tendón sano es un tejido altamente especializado diseñado para resistir enormes fuerzas unidireccionales. Está compuesto principalmente por una densa matriz extracelular (MEC), sintetizada por algunos de los fibroblastos residentes en el propio tendón. El principal componente de la matriz extracelular es colágeno tipo I, el cual se organiza en fibrillas, fibras y fascículos, de acuerdo a la dirección de la fuerza aplicada. La existencia de entrecruzamientos intermoleculares entre las moléculas de colágeno tipo I, refuerzan la resistencia a la tensión de la matriz del tendón. Otros componentes de la matriz como otros tipos de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos ricos en leucina parecen estar involucrados en la fibrilogénesis y la regulación de la organización de la matriz [33][34].

Los tendones y ligamentos son tejidos conectivos fibrosos caracterizados por una precisa organización de fibroblastos concentrados en una matriz extracelular (MEC) rica en colágeno. Las fibras de colágeno guardan una disposición en fascículos paralelos a lo largo de las líneas de tensión. Los fibroblastos también se disponen

longitudinalmente entre las fibras de colágeno y sus citoplasmas se extienden transversalmente, envolviendo las fibras de colágeno, creando una red tridimensional de uniones GAP célula-célula y célula-MEC [34][33].

El conjunto de células que conforman el tendón, se les denomina tenocitos. Se han identificado cuatro grupos: I, II, III y IV, este último es el endotendón. Se desconoce su actividad individual porque no hay marcadores específicos para cada tipo ni procedimientos para el aislamiento específico. Los tenocitos están relacionados con los fibroblastos pero no se sabe hasta qué punto [16].

Además, hay otras células: los fibroblastos del endotendón, epitendón y paratendón y células de tipo sinovial del epitendón en aquellas zonas en las que el tendón está incluido en la vaina [35].

En los tendones el 95% del colágeno total es colágeno tipo I, mientras que en los ligamentos el porcentaje es menor (85%). El resto del colágeno total está constituido por colágeno tipo III y, en menor proporción, por otros tipos de colágeno. El colágeno tipo I es el que predomina en el cartílago articular, pero también se detecta su presencia en las uniones tendón-hueso y en las zonas de compresión del tendón. El colágeno tipo III se detecta sobretodo en el endotendón y ligamentos [33][34].

La estructura del colágeno se asienta en la organización jerarquizada de subunidades de tamaño decreciente; tropocolágeno, microfibrillas, subfibrillas, fibrillas, fibras, fascículos y unión de fascículos por el endotendón. El endotendón se continúa hacia la periferia del tendón, envolviéndolo con lo que se conoce como epitendón. En las zonas en las que el tendón no está incluido en la vaina sinovial, alrededor del epitendón se localiza otra capa fibrosa conocida como paratendón [36][35].

El endotendón contiene vasos y nervios, en él residen tipos celulares que se sospecha poseen características mesenquimáticas. Alrededor del epitendón, en las zonas sin vaina sinovial, existe una envoltura fibrosa y elongable, el paratendón, el cual aporta vasos sanguíneos y elementos celulares para la reparación [31][34][33].

En aquellas zonas donde la trayectoria del tendón cambia de dirección, el tendón queda envuelto en una vaina que contiene líquido sinovial para facilitar el deslizamiento del tendón. En el interior de la cámara sinovial se encuentra el mesotendón, a modo de tabique que puede dividir la vaina en dos compartimentos completamente separados o no [34] [33]. (Ver Figura 2)

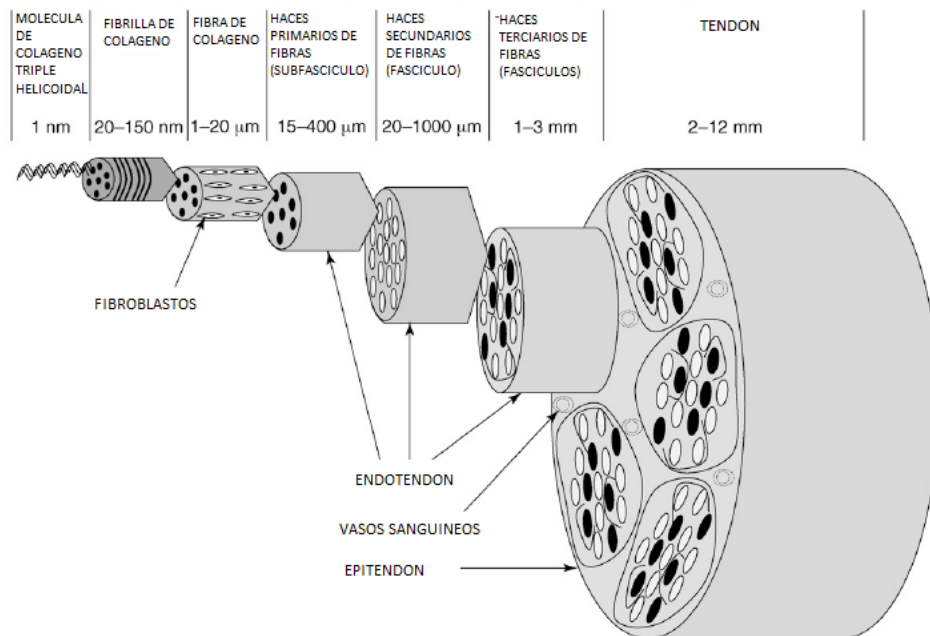


Figura 2. ESTRUCTURA JERARQUICA DEL TENDON. El tejido del tendón tiene varias subunidades compuestas esencialmente por fibras formadas por moléculas de colágeno tipo I, las cuales están organizadas dentro de subfascículos y fascículos individuales separados por la MEC del epitendón. Grupos de fascículos forman el cuerpo funcional del tendón, dentro del cual se encuentra la MEC altamente vascularizada e innervada. La MEC es sintetizada y sustentada por los fibroblastos del tendón, los cuales se alinean longitudinalmente en filas a lo largo de las fibras de colágeno. Richardson et al. (2007).

6.1.3. Patogenia de la lesión.

Existen tres teorías que explican la patogenia de la lesión en equinos; la teoría del sobreesfuerzo o sobreestimulación, la teoría de la estimulación insuficiente y la teoría bioquímica.

La primera teoría explica que los tendones pueden lesionarse bien por “sobreesfuerzo” o como consecuencia de un traumatismo percutáneo, lacerante o penetrante. Se cree que las lesiones por sobreesfuerzo se producen como consecuencia de dos posibles situaciones; por una sobrecarga repentina que excede la capacidad de resistencia biomecánica o por la existencia de una fase de degeneración previa a la lesión. Con el primer supuesto se explicaría que todos los tendones y ligamentos tienen propiedades viscoelásticas, lo que significa que sus propiedades mecánicas varían a medida que se tensan [22][16].

La segunda teoría, de estimulación insuficiente, intenta explicar la cascada de sucesos degenerativos en base a los estudios experimentales que muestran que la falta de estímulos sobre las células tendinosas puede ser la responsable de la expresión génica catabólica que deriva en la degradación de la MEC y pérdida de función [37][38][39].

La falta de cargas equivale a la privación de estrés lo cual, experimentalmente, conduce a un incremento de la expresión génica de MMPs y de inductores de apoptosis [40][41]. Por otra parte, la aplicación de un estrés cíclico inhibe la apoptosis y la expresión de MMPs [41]. Esta teoría recibe apoyo adicional con los trabajos que muestran que la privación de estrés disminuye la expresión de TIMP y que la aplicación de un estrés cíclico conduce a un incremento de la expresión de TIMP en los fascículos del tendón [41].

La tercera teoría, bioquímica, nace a partir de un estudio reciente sobre tendinopatías humanas, este estudio ha evidenciado la producción localizada y de origen no neuronal, de sustancias "señales" tradicionalmente confinadas a las neuronas en los tenocitos [42]. Estas sustancias incluyen acetilcolina, catecolaminas, sustancia P y glutamato. Además, los receptores para estas sustancias se han encontrado en fascículos nerviosos y en las paredes de los vasos sanguíneos del tejido tendinoso, así como en los propios tenocitos. Estos hallazgos ayudarían a entender la influencia de estas señales en el dolor, la regulación vascular y/o los cambios tisulares en las tendinopatías [42].

6.1.4. Reparación del tendón por mecanismos naturales

En respuesta a una lesión aguda, ocurre una reacción inflamatoria acompañada de hemorragia intratendínea y edema, además de infiltración de macrófagos para remover el tejido necrótico [43][16][44][45]. Esta respuesta inflamatoria es de corta duración, clínicamente se observa un evidente aumento de tamaño en la zona, acompañada de dolor. Factores de crecimiento y citoquinas liberadas por macrófagos y plaquetas que llegan a la zona, generando una respuesta quimiotáctica y proliferativa en los fibroblastos, provocando la síntesis de colágenos tipo I, III y V característicos del tejido cicatricial [46].

El nuevo colágeno formado en el tejido cicatricial es altamente reticulado y presenta en mayor proporción colágeno tipo III. Este colágeno a diferencia del colágeno tipo I, es una fibra de corta longitud, lo que provee gran elasticidad pero otorga poca fuerza. Mientras más aumenta de tamaño y madura la cicatriz, más reticulado y estable se vuelve el tejido [12].

Después de la lesión, el tendón se recupera bien, pero el tejido cicatricial, que constituye al tendón dañado es menos funcional que el tejido del tendón normal, lo que se traduce en menor rendimiento y un riesgo sustancial de una nueva lesión [12].

Las propiedades mecánicas de los ligamentos y tendones cicatrizados, no son comparables con las del tejido normal [47]. Tras la ruptura, las fases de reactivación de la inflamación, proliferación, remodelación y maduración no necesariamente reconstituyen la estructura y función normal del tejido, lo que a largo plazo resulta en persistencia del tejido cicatricial y reincidencia de lesiones [48][6]. La tensión inducida por el tendón lesionado, es una consecuencia común del esfuerzo atlético tanto en caballos como en seres humanos, comprometiendo el retorno al nivel anterior de actividad [49]. Además, la recurrencia de tendinitis después de retornar a la competencia puede ser tan alta como 43% [9]. La reparación requiere factores de crecimiento que estimulen la angiogénesis, mitogénesis y la formación de matriz [50].

Décadas de experiencia han demostrado in vivo, que la regeneración y reparación de tendones y ligamentos es lenta y poco eficaz después de la lesión [49]. La reparación de tendones lesionados, sigue siendo un gran desafío, en gran parte debido a la falta de profundidad en la caracterización de las células del tendón y sus precursores [51].

6.2. Fundamentos teóricos en Articulaciones

6.2.1. Bases anatómicas y fisiológicas de las articulaciones sinoviales

El correcto funcionamiento de las articulaciones sinoviales depende de la integridad anatómica y de la función celular de cada uno de sus componentes: el hueso, el cartílago articular, el líquido sinovial, la membrana sinovial, la cápsula articular fibrosa y las estructuras ligamentosas. El hueso subcondral de los extremos óseos que conforman la articulación está recubierto por cartílago articular que proporciona una superficie de contacto de baja fricción. La membrana sinovial y la cápsula fibrosa articular rodean el perímetro cartilaginoso y se insertan en el hueso proporcionando cierta estabilidad articular y un receptáculo para el líquido sinovial. Los ligamentos y estructuras musculares periarticulares contribuyen a la estabilidad articular. Frente a la disfunción de alguno de estos componentes se presentará la patología articular [30][3].

La membrana sinovial está formada por dos capas, la íntima y la subíntima. La íntima, a su vez, tiene un espesor equivalente al de 1 a 5 estratos de células y carece de membrana basal. Estas células se clasifican en sinoviocitos A, responsables de la fagocitosis, y sinoviocitos B, que secretan proteínas. Es posible que un tercer tipo, los sinoviocitos C, sean un tipo celular que represente una fase de transición entre A y B [52].

La función de la membrana sinovial es decisiva en el mantenimiento de la homeostasis articular porque permite el intercambio de nutrientes y subproductos metabólicos entre la sangre de los capilares de la membrana y los tejidos articulares. La eficiencia de este intercambio depende de la densidad y buen estado de la red capilar y de la circulación sanguínea [53].

Los ligamentos periarticulares y la cápsula articular proporcionan estabilidad a la articulación. En las zonas proximales de las extremidades, las masas musculares que rodean las articulaciones también son imprescindibles para lograr esta estabilidad.

El hueso subcondral proporciona un soporte estable al cartílago articular. La placa subcondral consiste en hueso cortical con el sistema de canales haversianos dispuesto paralelamente a la superficie articular. Es más deformable que la cortical de la diáfisis y experimenta remodelaciones como respuesta al ejercicio [54][55].

Los condrocitos representan entre el 1% y el 12% del volumen del cartílago, siendo el resto matriz extracelular (MEC) que, a su vez, está compuesta por tres componentes principales: agua, colágeno y proteoglicanos (PGs). El contenido de agua varía entre el 70% y 80%, siendo mayor en animales jóvenes. En términos de materia seca, la MEC está compuesta por un 50% de colágeno, un 35% de proteoglicanos, un 10% de glicoproteínas (factores de crecimiento, COMP, proteinasas), un 3% de minerales, un 1% de lípidos y un 1% de otras sustancias [56]. (Ver figura 3)

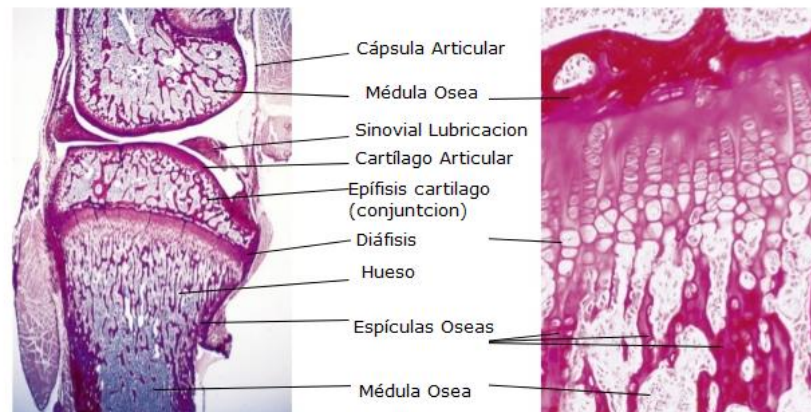


Figura 3. CORTE HISTOLÓGICO CARTÍLAGO: *Izquierda:* Corte de rodilla en el que se muestran sus principales componentes. La presencia de cartilago de crecimiento indica que se trata de un animal joven en fase de crecimiento. Tinción de picrosirio y hematoxilina. *Derecha:* Obsérvese el aspecto seriado del cartilago cuyas células aumentan progresivamente de tamaño, siendo destruidas, finalmente, y quedando únicamente la matriz extracelular cartilaginosa (en azul) sobre la que se desarrolla el proceso de osificación endocondral. Tinción de picrosirio y hematoxilina. *Junqueira et al. Histología básica (2005).*

6.2.2. *Fisiopatología de la osteoartritis (OA)*

Existen varias corrientes de opinión para explicar la fisiopatología articular. Algunos investigadores han propuesto varios mecanismos específicos en la patogénesis de la OA, por ejemplo: como consecuencia de la existencia de un cartílago defectuoso con propiedades biomecánicas anormales, o de la presencia de cambios anormales en el hueso subcondral, o de la exposición del cartílago normal a cargas anormales [57]. Otros autores, aun reconociendo que a veces el proceso que conduce a la OA puede tener origen en algún tejido concreto de los que componen la articulación, prefieren mantener una visión más integral, ya que en la enfermedad clínica suelen estar involucrados varios de los tejidos articulares y, a medida que la OA progresa, puede generalizarse a todos ellos [58][59][60].

El desequilibrio puede iniciarse como consecuencia de cargas mecánicas anormales, de presentación progresiva o repentina, o como consecuencia de un fallo metabólico tisular [60]. La fibrosis de la cápsula articular puede reducir la movilidad articular y dificultar el riego sanguíneo de la articulación, afectando a la homeostasis de la membrana sinovial, líquido sinovial y cartílago articular. La membrana sinovial y el cartílago pueden producir sustancias catabólicas (prostaglandinas, citoquinas, TNF y MMPs) que degradan el colágeno II, el agrecano y otras glicoproteínas de la matriz cartilaginosa [58]. El exceso de líquido sinovial puede contribuir a la inestabilidad articular y a elevar la presión intraarticular (PIA). El hueso subcondral puede intervenir como causa primaria [61]. Algunas situaciones metabólicas sistémicas, como la obesidad, también podrían estar involucradas en la OA [62][63].

En el cartílago, los condrocitos actúan como sensores que responden a la presión. Bajo condiciones normales, responden produciendo componentes de la MEC, tales como agrecano y colágeno tipo II. Sin embargo, un estrés mecánico anormal, tal como ocurre en la OA, altera el metabolismo de los condrocitos e induce la producción de proteasas y mediadores de la inflamación. Estos procesos conducen a una elevación de los niveles de IL-1 y TNF- α que, a su vez, disminuyen la síntesis de colágeno e incrementan las proteasas y otros mediadores de la inflamación como IL-8, IL-6, IL-17, IL-18, PGE₂ y óxido nítrico (NO). Por otra parte, como consecuencia de los procesos oxidativos, los condrocitos sufren un proceso que ha sido demostrado histológicamente: la senescencia o apoptosis [64]. El estrés oxidativo causa un acortamiento de los telómeros y una disminución del número y de las funciones de las mitocondrias, con la subsiguiente disminución de la producción de ATP [65].

6.2.3. Reparación del cartílago por mecanismos naturales. Pronóstico

El modelo de reparación del cartílago equino se parece mucho al modelo humano [66]. A partir de esto, se puede aseverar que "una vez que el cartílago se destruye, nunca se cura", entendida la curación como regeneración [67]. Aún existen muchos obstáculos para la regeneración del cartílago basada en tratamientos celulares. Las lesiones cartilaginosas son reparadas por medio de tejido fibrocartilaginoso, con mayor o menor éxito en función de la superficie y espesor afectados. Las propiedades funcionales y las características histológicas del fibrocartílago neoformado son de inferior calidad que las del tejido original. Las lesiones que afectan a todo el espesor del cartílago, lo que incluye el cartílago calcificado pero no el hueso subcondral, y que ocupan una superficie superior a 5 mm², tienen un peor pronóstico [68]. Se han descrito mecanismos de reparación intrínsecos, basados en la limitada capacidad de los condrocitos para multiplicarse y reparar las lesiones. Dentro de los mecanismos intrínsecos aparece el fenómeno "matrix flow", el cual describe la propagación de condrocitos y matriz cartilaginosa desde la periferia de la lesión hacia el centro de la misma en un intento de rellenar el defecto; se considera que este efecto reparador se limita a lesiones de pequeño tamaño. Los mecanismos extrínsecos se basan en la aportación de células y otros factores no procedentes del cartílago, sino del hueso subcondral; una forma de implementar este mecanismo natural es, por ejemplo, la reactivación del hueso subcondral mediante la perforación o microfractura quirúrgica para poder aportar células indiferenciadas y factores de crecimiento que estimulen la reparación [30].

7. MEDICINA CONVENCIONAL

7.1. Terapia reparativa en tendones y ligamentos

Algunos tratamientos básicos de la medicina convencional que se aplican actualmente en tendones y ligamentos incluyen flebotomía, aplicación de frío local, vendaje y reposo [69]. Durante las últimas cuatro décadas se han ensayado numerosos tratamientos y pocos han evidenciado una eficacia superior al simple reposo prolongado [12]. Con esta metodología solo el 40-50% de los caballos vuelve a competición y las recaídas, según las modalidades deportivas, pueden fluctuar desde el 43% al 93% [70][9][71].

La escasa eficacia de estos tratamientos se explica por la fisiopatología de la reparación del tendón; el tejido cicatricial resultante carece de las propiedades

funcionales del tendón original [9][72][73]. Existen evidencias de que el tendón se repara en base a la producción de un tejido cicatricial fibrocondrogénico con propiedades funcionales inferiores a las del tejido original normal [74][75][72], llevando a una disminución del rendimiento del animal y el riesgo de reincidencia de la lesión [12].

7.2. Terapia reparativa en articulaciones

Los tratamientos que abordan la patología articular, con independencia de la causa, consideran objetivos primordiales el retorno de la articulación a su situación normal en el menor tiempo posible y la prevención y minimización de la gravedad de la osteoartritis (OA). Por tanto, cualquier situación patológica, desde una sinovitis aguda que pueda producir inestabilidad articular por exceso de líquido sinovial y derivar en OA, hasta aquellas situaciones que requieren intervenciones quirúrgicas, deberían ser tratadas en el momento más adecuado de manera de prevenir o minimizar la OA [23].

Sin considerar ahora las técnicas quirúrgicas, la medicina reparativa ha abordado esta patología mediante diversos tratamientos médicos (AINES, corticoides, hialuronato sódico, glicosaminoglicanos polisulfatados, pentosán, suplementos nutracéuticos a base de glucosamina y/o condroitín sulfato) que muchas veces solo tienen efecto paliativo transitorio, dependiendo de la gravedad de la lesión.

Llegados a este punto, podemos establecer una analogía con respecto a lo dicho en tendones y ligamentos. La baja eficacia de estos tratamientos se explica por la fisiopatología de la curación de la articulación; el tejido cicatricial resultante del proceso de curación es un tejido fibrocartilaginoso de inferior calidad porque carece de las características histológicas y propiedades funcionales del cartílago original y algo parecido ocurre en el hueso subcondral [68].

8. MEDICINA REGENERATIVA

Ante la perspectiva que ofrecen los tratamientos convencionales, una parte de la comunidad científica se encuentra inmersa en la transición de una medicina reparativa a una medicina regenerativa [76][77]. Es en la medicina regenerativa, donde la ingeniería en tejidos juega un rol fundamental. La ingeniería en tejidos aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de substitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos o de un órgano completo [78]. La ingeniería en tejidos conjuga los campos de la medicina

regenerativa con la biología de las células madre desde el momento en que son necesitadas las técnicas de estas dos disciplinas para diferenciar las células en fenotipos que puedan ser ensamblados en los distintos diseños de las estructuras biológicas [30].

Actualmente la ingeniería en tejidos aplicada al tratamiento de lesiones tendinosas se encuentra menos desarrollada que la aplicada a las lesiones articulares y esto se debe a varios motivos. En primer lugar, los conocimientos sobre la biología del desarrollo del tendón no son suficientes y aún no se entiende cómo intervienen las señales y las células en la formación y desarrollo de este tejido; este conocimiento resulta fundamental para que las técnicas y procedimientos de la medicina regenerativa puedan mimetizarlo [79]. Por otra parte, tampoco se han diseñado buenos modelos *in-vivo* e *in-vitro* que permitan el estudio de la diferenciación de las células del tendón y ensayar técnicas de reparación; además, dichos modelos tampoco recrean o reproducen la forma natural de la lesión [30]. Probablemente el caballo sea una de las mejores especies para estudiar las lesiones tendinosas e intentar extrapolar los resultados a otras especies, pero resulta un modelo caro y con inconvenientes de tipo ético. Por otra parte, la información que llega desde la investigación en medicina humana también es mucho más extensa en lo que concierne a la patología articular, ya que la osteoartritis sustenta una morbilidad mucho más alta que la patología de los tendones [30].

Actualmente, las estrategias de ingeniería tisular incluyen la utilización de una o varias de las siguientes aproximaciones; soportes o biomateriales (scaffolds), factores de crecimiento (FC) y células madre [80][81][76].

Los biomateriales son sustancias que actúan como soporte o andamiaje, así por ejemplo, en ingeniería tisular, las células se siembran o fijan sobre una estructura artificial capaz de permitir el desarrollo tridimensional del tejido. Algunas de las funciones de los biomateriales son simular las características espaciales y biomecánicas del tejido que se pretende curar, permitir la fijación, diferenciación, multiplicación y migración de células y la síntesis de matriz extra celular (MEC), tanto en los cultivos como en la lesión tratada. Además los biomateriales favorecen la difusión de nutrientes celulares vitales y productos expresados, pero no deben modificar el fenotipo celular que se pretende implantar [82].

Los retos en el diseño de estos biomateriales se centran en sincronizar la degradación polimérica del biomaterial con la formación de matriz extracelular del tejido lesionado, producir biomateriales con la suficiente resistencia mecánica y que ésta se mantenga durante las fases iniciales de la curación, es decir, hasta que el nuevo tejido formado asuma las cargas biomecánicas [83].

Los biomateriales que han sido diseñados hasta ahora apenas mimetizan la morfología del tejido natural a nivel estructural. Este mimetismo es muy importante cuando se trata de intervenir en tejidos que tienen una estructura con una orientación direccional muy definida, como es el caso de los tendones. Se están desarrollando biomateriales a base de fibrillas de diámetro y orientación controlables [83]. En la actualidad, aún no se ha producido ningún material con estas características para ser utilizado en los tendones a nivel clínico.

Algunos de los biomateriales utilizados en tendones incluyen fibras reabsorbibles implantadas longitudinalmente de ácido poliglicólico (PGA) o ácido poliláctico (PLA). Mientras que en el tratamiento de patologías articulares se utilizan hidrogeles, estructuras esponjosas y mallas de polímeros naturales (alginato, agarosa, fibrina, gel de plasma rico en plaquetas (PRP), colágeno, gelatina, quitosan, condroitín sulfato y celulosa) o sintéticos (PGA, PLA, polidioxanona, fosfato tricálcico o de biohueso). El inconveniente de los naturales reside en el potencial efecto inmunogénico, mientras que los sintéticos no favorecen la relación célula-soporte y los productos de su degradación pueden resultar tóxicos [84].

Nuevos tratamientos para las tendinitis/desmitis y algunos problemas articulares se basan en la administración de uno o varios factores de crecimiento (FC) en el lugar de la lesión. Los FC, también llamados citoquinas anabólicas, son moléculas proteicas que regulan el metabolismo celular. Aceleran la curación tisular por medio de la estimulación de la proliferación celular, el incremento de la síntesis de matriz extracelular y estimulando la neovascularización. Además de los efectos anabólicos, los FC inhiben las citoquinas catabólicas que degradan la matriz, tales como las interleuquinas y las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Por ello, los FC constituyen un área de creciente interés en las estrategias de ingeniería tisular. Los más estudiados en el área de la regeneración músculo-esquelética son; factor de crecimiento plaquetario (PDGF), proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico básico

(b-FGF), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), factor de crecimiento hepatocitario (HGF), factor de crecimiento y diferenciación (GDF).

Resulta esencial conocer la secuencia de efectos de los FC, sinergias y cascadas bioquímicas que ocurren en los tendones y ligamentos para poder intervenir en el curso de la enfermedad [85][14][86][87][88]. Se sabe que IGF-I se expresa sobre todo en la fase temprana de la inflamación, manteniendo niveles superiores a los normales entre la 2ª y 8ª semanas y con un pico máximo alrededor de las 4 semanas, e interviene en la proliferación y migración de fibroblastos y tenocitos y, por tanto, en la síntesis de colágeno de la matriz extracelular [85][89][90][91]. TGF- β 1 interviene durante la fase inflamatoria, elevándose la expresión génica a partir de la primera semana y manteniéndose alta durante 24 semanas y máxima a las 4 semanas [90][91]. TGF- β tiene varios efectos sobre la migración y proliferación celular y las uniones de fibronectina. TGF- β estimula la síntesis de la proteína de la matriz oligomérica cartilaginosa (COMP) y también actúa como antiinflamatorio ya que neutraliza o inhibe la expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, y la actividad de MMPs [90][91][92][93][94]. Estas citoquinas catabólicas están ausentes en el tendón sano [95]. VEGF se produce sobre todo después de la fase inflamatoria, que es cuando estimula la angiogénesis; tiene cierto efecto estimulante sobre la expresión de TGF- β pero no sobre los genes del colágeno [90][96]. El PDGF se produce poco después de la lesión y estimula la producción de otros FC, incluyendo IGF-I y TGF- β [91]. El b-FGF es un potente estimulador de la angiogénesis y un regulador de la migración y proliferación celular y la síntesis de colágeno [90][91].

Los factores de crecimiento pueden clasificarse, según su procedencia, en sintéticos o heterólogos y autólogos. En el campo de la patología articular los FC sintéticos o heterólogos se están empleando sobre todo para el estudio de sus efectos *in vitro* sobre cultivos de condrocitos y hueso subcondral o en cirugía experimental [87]. Se sabe que IGF-I estimula la producción de MEC y la proliferación de los condrocitos, pero que este efecto se reduce en sujetos de edad avanzada y en caso de articulaciones con osteoartritis [97][66][98][99]. Así como IGF-I tiene escaso efecto sobre los condrocitos alterados, TGF- β actúa como antiinflamatorio ya que neutraliza o inhibe la expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, y puede estimular la reparación del cartílago lesionado mediante el estímulo de los condrocitos y la síntesis de COMP [93][100]. BMP-2 puede estimular la síntesis de proteoglicanos por parte de los condrocitos si IL-1 no está presente [100]. TGF- β y BMP-2 estimulan la formación de

condrocitos en los márgenes articulares y la consiguiente formación de osteofitos en articulaciones artríticas [100]. Es necesaria la acción conjunta sinérgica de TGF- β y IL-1 para inducir la expresión de los genes del colágeno tipo II y del agregano de los condrocitos humanos [88].

Los preparados con FC autólogos, se pueden obtener a partir de aspirados de medula ósea, por punción de las esternebras o de la tuberosidad coxal, o bien de plasma rico en plaquetas (PRP). Con respecto al PRP, existen algunos estudios *in vitro* que valoran sus efectos sobre tendones y ligamentos equinos y muy pocos que analicen el efecto del PRP a nivel articular o sobre cultivos de condrocitos [101][102][103][104]. Las investigaciones realizadas *in vivo* en equinos son también muy escasas y se han llevado a término con un pequeño número de casos clínicos, pero ya advierten de las posibilidades terapéuticas del PRP [19][105].

En lo que concierne a las células madre, aún hoy, resulta difícil definir que es una célula madre (SC), resultando más difícil hablar de algunas de sus características o capacidades como son; autorenovación, diferenciación y estabilidad lo largo del tiempo [106]. Bajo este concepto es que las células madre son inducidas a diferenciarse en uno o varios tipos de celulares específicos requeridos para reparar los tejidos o poblaciones celulares dañadas. Es importante mencionar que las células se localizan en un entorno, ambiente o nicho, ya sea *in vivo* o *in vitro*, que condiciona o influye en su evolución. Así pues, en un determinado nicho, se habla de diferenciación y de señales reguladoras [107][108]. Estas últimas incluyen aquellos factores internos (genes) y externos (sustancias secretadas por otras células, contacto físico con otras células, nutrientes y FC) que controlan los cambios estructurales y funcionales de las células y la matriz extracelular (MEC) [109][106][110].

Dada la profundidad y complejidad de este apartado se desarrollará en el capítulo siguiente.

9. CELULAS MADRE

9.1. Generalidades de las células madre

El concepto de células madre hace referencia a una minoría celular con alto poder de diferenciación, capaces de autorenovarse durante toda la vida del individuo [111]. A pesar del alto poder de proliferación, están la mayor parte del tiempo en estado quiescente (fase G0 del ciclo celular) [112][113]. Ciertas señales aún no descifradas

provenientes del nicho celular, estimularían a estas células para entrar a su ciclo de división. Luego mediante mitosis asimétricas cada una generaría por una parte a una célula madre idéntica a la original y por otra a una célula con menor capacidad proliferativa que la inicial, llamada célula de amplificación transitoria [108]. Esta última entrará en limitadas mitosis generando finalmente células bien diferenciadas y de escaso poder replicativo [112].

Una célula Madre o troncal es una célula indiferenciada con dos propiedades; autorregeneración y capacidad de dar lugar a diferentes líneas de células especializadas. Es decir, tienen capacidad de división asimétrica: pueden producir una réplica celular exacta de sí mismas y una célula más especializada [25].

Las células madre pueden diferenciarse en otras células, como las que componen el tejido adiposo, hueso, cartílago, ligamentos, tendones, tejido nervioso y piel, entre otras [114][82].

La capacidad de diferenciarse es conocida como potencial, este puede ser clasificado como; uni, multi, pluri y totipotencial dependiendo del número o diferentes tipos de tejido que la SC puede producir [115]. SC unipotentes se encuentran generalmente en algunos tejidos adultos en órganos específicos (piel, hígado, intestino), son responsables de renovar esos tejidos. SC multipotentes pueden dar lugar a la diferenciación celular múltiple o tejidos. SC tienen variables grados de potencial de diferenciación, los cuales pueden ser descritos mediante un modelo jerárquico [116]. (Ver Figura 4)

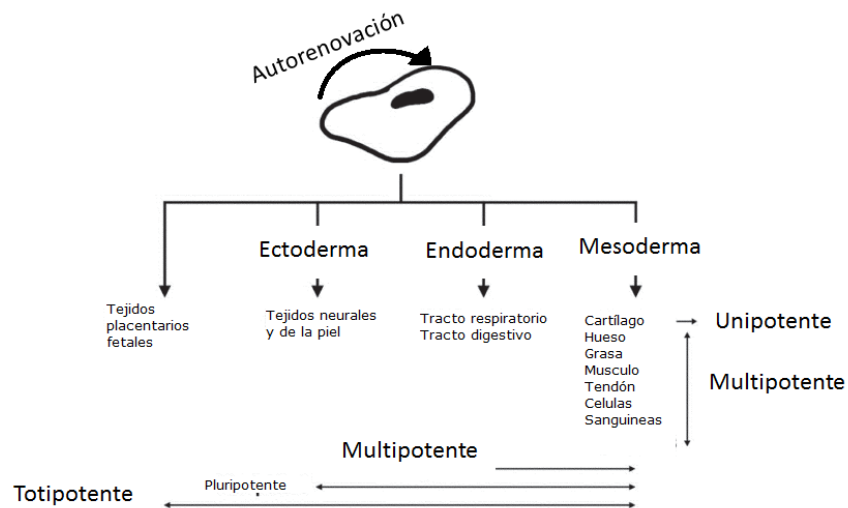


Figura 4. MODELO JERÁRQUICO: Las células madre se caracterizan por su capacidad de autorrenovación (división celular asimétrica), alto poder proliferativo *in vitro* y de diferenciación en uno o más tejidos. Dependiendo de la capacidad para dar origen a tejidos provenientes de 2 o 3 capas germinativas y de tejidos extraembrionarios son llamadas multipotentes, pluripotentes y totipotentes respectivamente. Sin embargo, el término multipotente es comúnmente usado para describir la capacidad de las células madre para dar origen a cualquier tejido que provenga de una misma capa germinativa. Si las células madre dan origen sólo a un tipo de tejido son llamadas unipotentes. Koch *et al.* (2008).

9.2. Clasificación de las células madre

Las células madre se pueden clasificar jerárquicamente según su grado de potencialidad, propiedad que dará la capacidad de diferenciarse a otro tipo de tejido [117]

El oocito fertilizado o cigoto es la base de este modelo. Los cigotos son totipotentes, debido a que tienen la capacidad de formar todos los tejidos, el embrión mismo al igual que la placenta [117].

Luego siguen las células madre embrionarias (ES), son células pluripotentes ya que pueden originar cualquier componente embrionario, pero no tejido extraembrionario, es decir, puede dar lugar a tejidos provenientes de cualquiera de las tres capas germinativas (endodermo, mesodermo y ectodermo) [118]. Proviene del macizo celular interno o embrioblasto del blastocisto encontrado el 5° día de gestación y corresponden en estricto rigor a las células madre embrionarias (ES) [119] [118]. En el mismo nivel se encuentran las células madre pluripotentes inducidas (iPS), son células somáticas adultas que son inducidas para expresar genes de pluripotencia [120]. Para evitar el uso controversial de las células ES, se realizan esfuerzos para identificar posibles alternativas comparables. Las recientemente descritas células iPS, podrían representar una opción prometedora. Las células iPS son generadas al transfectar células somáticas adultas con factores de transcripción pluripotentes; Oct3/4, c-Myc, Sox-2 y Klf4 [120]. Takahashi et al, reportó en el 2007 que las células iPS humanas son idénticas a las ES en morfología, proliferación, expresión génica, diferenciación *in vitro* y formación de teratomas.

Después de ocurrida la embriogénesis temprana, las células madre pluripotenciales desaparecen probablemente por su elevado poder tanto de diferenciación como regenerativo y por la complejidad requerida para su correcta coordinación. En su reemplazo aparecen células madre multipotenciales específicas para cada tejido que serán distribuidas en distintas partes del organismo con el objetivo de renovar células, tejidos u órganos dañados durante el transcurso de la vida [118]. Las células madre multipotenciales, por ende, son aquellas que pueden dar origen a cualquier tipo celular que provenga de una misma capa germinativa [118]. Estudios han demostrado que a partir de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, es decir, que provienen del mesoderma embrionario, han dado origen *in vitro* a osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos, cardiomiocitos y células endoteliales [121][122].

Estas células están diversamente distribuidas y han sido aisladas de varios tejidos incluyendo médula ósea, tejido adiposo, músculo, hígado, cerebro, sangre de cordón umbilical, gelatina de Wharton en cordón umbilical, membrana amniótica, sangre periférica y páncreas[123][114][124][125][126][127][128], estas células son capaces de diferenciarse hacia diferentes linajes como cartílago, músculo y células tipo neuronales[129][130].

En la punta de la pirámide jerárquica se encuentran las células unipotentes, las cuales tienen menor poder de diferenciación y solo son capaces de producir su mismo tipo celular [131]. Al igual que el resto, tienen la facultad de autorenovarse durante toda la vida; también son llamadas células progenitoras [118]. Estas junto a las células madre multipotenciales corresponden a células madre adultas y son consideradas la principal fuente celular reparadora de tejidos [132].

9.3. Células madre embrionarias (ES) y adultas

Las ES y adultas han demostrado ser en los últimos años una gran herramienta terapéutica en medicina regenerativa, ya que su potencial permite mejorar significativamente los resultados clínicos en patologías músculo-esqueléticas del equino [116]. Las ES humanas fueron descubiertas por primera vez el año 1998 y si bien son atractivas desde el punto de vista terapéutico, existen ciertos aspectos que obstaculizan su progreso y han limitado su uso en clínica: destacan las consideraciones éticas, el riesgo de rechazo por provenir de distintos individuos, la posible transmisión de infecciones y la eventual formación de teratomas, dado por la difícil regulación de su tasa proliferativa [133][134][135][119]. Con respecto a las consideraciones éticas que han surgido desde su descubrimiento, estas han estado constantemente presentes dado que su origen es a partir de blastocistos humanos. El tema de debate se centra en que para poder obtener estas ES, es necesario destruir un embrión humano y así aislarlas directamente del embrioblasto [136]. Por todo lo anterior han surgido nuevas investigaciones que utilizan células madre adultas autólogas, las que pueden provenir de tejido adiposo, médula ósea, tejido de cordón umbilical, ayudando al proceso regenerativo [82]. Con el fin de ampliar el campo de la biología de las células madre y poder superar los obstáculos que se han presentado, los investigadores han descubierto nuevas fuentes celulares mediante la reprogramación genética de células diferenciadas adultas, dando origen a las células madre pluripotenciales inducidas (iPS)[120]. A pesar que son fenotípicamente y funcionalmente similares a las células ES, existen ciertos impedimentos que deberán superarse para ser utilizadas de manera

segura en la práctica clínica. Sin embargo el ritmo de avance que tiene la investigación en este campo hace que las células iPS probablemente sean candidatas a uno de los instrumentos más poderosos en el futuro de la medicina regenerativa [137].

De manera de poder aprovechar de manera eficiente el potencial regenerativo y la alta capacidad de diferenciación que tienen las células madre, se debe comprender el funcionamiento y la influencia que tiene el ambiente natural sobre ellas. Las células madre se encuentran en un nicho celular específico que además de ser el sitio anatómico que aloja estas células, tiene la característica de interactuar de manera activa con ellas para mantener un funcionamiento adecuado y lograr una respuesta armónica frente a daños y estrés tisular. De esta forma la comunicación entre ambas partes crearía un sistema dinámico necesario para la mantención, reparación, y generación del tejido, logrando un balance equilibrado entre la proliferación y depleción de estas células madre [110].

9.4. Células madre mesenquimales (MSCs)

Las MSCs constituyen una fuente importante para ser utilizada como terapia celular en medicina regenerativa [138][139][140]. Proviene principalmente de la médula ósea y tejido adiposo, ambas poblaciones con características muy similares [141][142]. Las MSCs reciben su nombre debido a la semejanza con el tejido mesenquimal del embrión [143]. En cultivo *in vitro*, las MSCs presentan adherencia a los recipientes de material plástico en que se realizan, además pueden ser inducidas hacia nuevas líneas celulares, que se diferenciarán en nuevos tejidos [143].

El descubrimiento de las MSCs o células estromales, data del siglo 19 con los estudios de Julius Friedrich Cohnheim, pero los trabajos más importantes con estas células han ocurrido en las últimas décadas [144]. Células estromales de médula ósea fueron aisladas por primera vez y descritas en estudios de Alexander Friedenstein alrededor de 1960. En 1970, Friedenstein aisló células tipo fibroblastos a partir de médula ósea basado en su adherencia al plástico [145]. Otros estudios de Friedenstein y Owen demostraron el potencial osteogénico y adipogénico de las células estromales provenientes de médula ósea [146][147].

Luego Caplan en 1991, acuñó el término célula madre mesenquimal para referirse únicamente a células madre derivadas de la médula ósea, sin embargo otros autores utilizan el término para referirse a células madre derivadas del tejido adiposo y

aquellas células de soporte vascular o pericitos [148]. Además se han considerado otras fuentes donde es posible obtener este tipo de células madre como, por ejemplo, sangre periférica, tejido de cordón umbilical, entre otros [149][150].

9.4.1. Nomenclatura

Las MSCs, son poblaciones celulares con capacidad de adherencia al plástico y que expresan marcadores específicos de superficie y tienen la capacidad de autorenovarse y diferenciarse en hueso, cartílago, grasa, músculo y células neurales en condiciones adecuadas [151]. Son las responsables de la regeneración de tejidos adultos [152]. Tienen el potencial de generar varios tejidos *in vitro* y responden en vivo a estímulos bioquímicos y/o mecánicos [153][154][155]. MSCs tienen tres características principales: son capaces de autorenovarse, son células no especializadas y pueden dar lugar a otros tipos celulares especializados. Estas células son aisladas de varios tejidos incluyendo tejido adiposo y médula ósea, pueden diferenciarse en varias líneas tisulares [155][156].

Desde el punto de vista de su capacidad reproductiva y funcional, las MSCs se han definido como aquellas que pueden dividirse simultáneamente para mantener por un lado su auto-renovación, con producción de más MSCs semejantes a ella, y por otro lado, generar células hijas comprometidas con diferentes linajes celulares que se diferencian en diversos tipos de células especializadas, no solo morfológicamente sino también funcionalmente [157].

La nomenclatura de Stem Cell (SC) ha sido cambiada muchas veces desde que fue introducido. Si bien el término célula madre mesenquimal (MSCs) fue popularizado por Caplan [158] cerca de los años noventa, algunos investigadores ya han optado por omitir la referencia de células madre al publicar estudios preclínicos [159][160] o clínicos [161][162] con MSCs. El término MSCs ha sido reservado para denominar células que muestran en vivo supervivencia a largo plazo, con capacidad de autorenovarse y repoblar tejidos mediante diferenciación a otras líneas celulares [156]. SC se caracterizan por su habilidad para autorenovarse, proliferar en forma extensiva y diferenciarse en uno o más tipos celulares o tejidos [129] [163][133]. En teoría, estas células podrían ser implantadas y recuperar el tejido después de un periodo de tiempo cuando muestre el mismo potencial de diferenciación.

El interés biológico y clínico por las MSCs ha aumentado de forma clara en las últimas dos décadas como se muestra por el número creciente de equipos e investigadores

estudiando estas células. No sólo se establecen laboratorios centrados en MSCs pero los nuevos investigadores están siendo rápidamente atraídos por el campo, lo que sin duda va a acelerar el descubrimiento científico y el desarrollo de nuevas terapias celulares. Sin embargo, este interés ha generado algunas ambigüedades e inconsistencias en el área [144].

Las características que definen las MSCs son inconsistentes entre los investigadores. Algunos laboratorios han desarrollado métodos de aislamiento y expansión de MSCs, que invariablemente tienen diferencias sutiles y en ocasiones muy significativas. Además investigadores han aislado MSCs de una variedad de tejidos aparentemente con propiedades similares [164]. Estas fuentes variadas de tejidos y metodologías de aislamiento de las células, deja la interrogante, si las células aisladas son suficientemente similares para permitir la comparación directa de las propiedades biológicas y los resultados experimentales reportados, especialmente en el contexto de la terapia celular. Esta interrogante acerca de la equivalencia celular es en parte el motivo de la falta de un criterio universal para definir MSCs. Más importante aún, es la incapacidad para comparar y contrastar estudios de diferentes grupos que lleva a obstaculizar el progreso en el campo [144].

Durante la reunión anual de la Sociedad internacional de terapia celular (ISCT), el año 2000, fue declarado que las células estromales mesenquimales pluripotentes es la designación actualmente recomendada [158] para las células plástico-adherentes aisladas desde médula ósea y otros tejidos que a menudo han sido descritas como células madre mesenquimales [156]. Además el término célula madre mesenquimal debiera ser usado solo en células con que han demostrado actividad de célula madre mediante un criterio estandarizado, sin embargo el termino célula madre mesenquimal puede ser utilizado para cualquier tipo de células, siempre y cuando el significado está claramente definido [116].

Para direccionar este problema la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso criterios estándar para definir MSCs humanas para los laboratorios basados en investigaciones científicas y para estudios preclínicos. Estos criterios de identificación no deben confundirse con las especificaciones publicadas para los estudios clínicos, como la actual propuesta pretende ser únicamente la identificación de criterios para fines de investigación. El objetivo es proporcionar a la comunidad científica un conjunto de criterios estándar basados en mejores datos disponibles actualmente para

identificar las MSCs reconociendo y que probablemente exigirán una revisión de los criterios al surgir nuevos datos [144].

9.4.2. Fuentes de origen de MSCs

La búsqueda de nuevas técnicas, métodos de extracción y aislamiento de células madre mesenquimales a partir de un tejido, es un campo que va en avance junto con las terapias regenerativas y reconstructivas con células madres. Las técnicas modernas han permitido obtener células madre y aislarlas desde diversos tejidos como; médula ósea, tejido adiposo, músculo esquelético, cordón umbilical y placenta entre otros [128][165].

Luego de la identificación de muchos tejidos como fuente de MSCs en mamíferos adultos, algunas investigaciones se han focalizado en la búsqueda de potenciales fuentes de MSCs de más fácil acceso para aplicaciones clínicas [166][124][167].

En medicina veterinaria, lo que define a una buena fuente de MSCs no es sólo el potencial rendimiento de las MSCs, sino también los procedimientos de colección y los costos asociados. Además es importante considerar que algunos estudios muestran la existencia de diferencias significativas entre las diferentes fuentes de MSCs [168][141][167].

9.4.2.1. MSCs de Médula ósea (BM-MSCs)

La primera fuente reportada como contenedora de células progenitoras multipotentes fue la médula ósea (MO)[169][129]. Es por esta razón que la MO es la fuente de MSCs mejor investigada, proporcionando mucha información sobre las características de las células [82].

La médula ósea es un tejido complejo, sinusoidal y bien organizado que se encuentra en la cavidad medular de huesos largos, esternón, huesos de la cadera y vértebras esponjosas, constituyendo uno de los mayores tejidos del cuerpo, cuya función principal es la de promover la hematopoyesis [143]. Las BM-MSCs son un grupo celular heterogéneo que se encuentran en el estroma de la MO, son capaces de diseminarse de manera local o sistémica hasta alojarse en el tejido lesionado para repararlo [170][140][171][172][173].

Las BM-MSCs en condiciones de cultivo se presentan como una población homogénea de células con adherencia al plástico, con una uniformidad morfológica del 98% [143].

Un cultivo de células adherentes derivadas de MO, en ausencia de células hematopoyéticas y estímulos de diferenciación, da lugar a una población de células con características fenotípicas y funcionales de progenitores mesenquimales [174]. Se autorenewan de manera ilimitada y son de carácter multipotente, por lo que pueden dar origen a cualquier tipo celular derivado del mesoderma embrionario, logrando mantener este potencial cuando son replicadas *in vitro* [129][159].

La mayoría de los ensayos clínicos, han utilizado células de MO, que sólo están disponibles en cantidades limitadas y no se pueden amplificar fácilmente [175]. Las BM-MSCs pueden ser aisladas y amplificadas más de 1 billón de veces en cultivo celular y transcribir los genes sin que afecten su capacidad de células madre [47]. En cultivo, las BM-MSCs tienen la capacidad de expandirse, duplicando varias veces su número preservando su pluripotencialidad e indiferenciación [143].

Si bien las BM-MSCs son estudiadas hace varios años, se describen potenciales inconvenientes en el uso de aspirados de médula ósea para propósitos terapéuticos, los cuales incluyen dolor asociado al proceso de recolección, bajo rendimiento celular y laceraciones pericárdicas durante la obtención de médula ósea de esternón [176]. Vidal *et al.* (2007), sostienen que la técnica de recolección de médula ósea esternal usada comúnmente con caballos sedados de pie, los expone a posibles complicaciones como neumotórax y pneumopericardio. Por ende, el uso clínico de MO puede ser perjudicial debido al procedimiento invasivo del donante y la disminución potencial en número y diferenciación de BM-MSCs con el aumento de la edad [177]. Las BM-MSCs se encuentran en menor cantidad, 1 célula madre por 100.000 células de médula ósea [77]. La separación por Ficoll, de aspirados de MO recogidos de caballos adultos, resultó en una obtención de $6.4 + 3.4 \times 10^6$ células nucleadas / ml de aspirado [83]. La viabilidad celular después de la descongelación del almacenado primario de nitrógeno líquido de las MSCs de potro, fue de $64 + 6 \%$ [83]. Sin embargo, los procedimientos de adquisición tradicional de médula ósea, pueden ser dolorosos, a menudo requieren anestesia general o raquídea y pueden dar bajo número de MSCs a la transformación, alrededor de 1×10^5 MSCs adherente del estroma celular [164].

En general, existen muchas limitaciones en la utilización de MSCs para aplicaciones clínicas, incluyendo la baja eficiencia de las BM-MSCs en la diferenciación de líneas celulares adultas [178]. Además el procedimiento que permite su obtención resulta doloroso para los pacientes [179], requiriendo a veces el uso de anestesia general o espinal [164], la cantidad recolectada es escasa, representando aproximadamente 1

en 100.000 células dentro del aspirado de la médula ósea total, lo que las hace difícil de estudiar y limita su potencial utilidad clínica [180][176]. Esto, sumado a su heterogeneidad hace que resulte bastante compleja para obtenerlas de manera pura [106].

9.4.2.2. MSCs de Tejido Adiposo (AT-MSCs)

Otro grupo de células madre adultas que ha sido estudiado para usos con fines regenerativos corresponde a las AT-MSCs. El tejido adiposo, al igual que el tejido encontrado en médula ósea proviene del mesoderma embrionario, pero el primero es fácilmente aislable [142]. Las AT-MSCs fueron inicialmente descritas por Zuk *et al.* (2001) motivados por la idea de identificar un grupo de células madre autólogas multipotenciales con características similares a las BM-MSCs, pero que fueran más fáciles de obtener. Esta facilidad de obtención debía significar: local, de bajo costo, capaz de obtener grandes cantidades de células y evitando así su expansión en laboratorio con todo el riesgo de contaminación que esto conlleva [181]. Por todas estas razones el tejido adiposo ha sido reconocido como una de las mejores fuentes celulares para la obtención de células madre mesenquimales [182][183][184][72].

Rehman *et al.* (2004), examinaron células no adipocíticas del estroma de la grasa subcutánea como una nueva fuente de células terapéuticas. A su vez, Vidal *et al.* (2007) sostienen que el tejido adiposo, es una fuente potencial de células madre adultas para la aplicación en la ingeniería de tejidos en la medicina veterinaria equina. El tejido adiposo es un mezcla compleja consistente en adipocitos, fibroblastos, células de músculo liso vascular, células endoteliales, y células inmune, así como células madre [185]. El tejido adiposo representa una fuente accesible de MSCs, con características similares a las células madre derivadas de médula ósea [186][187]. El tejido adiposo contiene una fracción vascular estromal (FVE), que es una fuente rica de AT-MSCs [188]. Sin embargo, Oedayrajsingh y col (2007), en su estudio, evidenciaron que caracterizada fenotípicamente un aislado de AT-MSCs de la FVE, demostraron que son ligeramente diferentes en inmunofenotipo de las que se someten a cultivo, pero mantienen las mismas características para diferenciarse en la línea deseada [188].

El tejido adiposo, como la médula ósea, es derivado del mesénquima embrionario y contiene un estroma que es fácilmente aislado [142]. Las AT-MSCs, pueden ser fácilmente disponibles en grandes cantidades con una mínima morbilidad y malestar asociado a su recolección [164]. La grasa coccígea, en la base de la cola, representa el

sitio más accesible en caballos de musculatura firme y se puede extirpar quirúrgicamente en equinos, administrando sedantes y anestesia local [176].

Las AT-MSCs autólogas, son relativamente de rápido aislamiento de tejido adiposo por la digestión de colagenasa [187]. El aislamiento de la fracción de células nucleadas desde la grasa, provee un pool de células para su inmediata inyección dentro de los sitios de la lesión o para uso futuro en cultivos de propagación para producir aislamiento de células madres de derivados adiposos [176]. El rendimiento de células de tejido adiposo puede ser influenciado por la edad y el sitio de recolección de tejido [187]. El rendimiento de MSCs derivadas de tejido adiposo osciló desde 1.47×10^6 células/ g a 2.71×10^6 células/ g (media + SD, $2.30 + 0.57 \times 10^6$ células/ g) [176]. La viabilidad de las células después de abundante digestión, osciló desde 83% a 91% (media, 87.5%) [176].

La extracción de tejido adiposo generalmente se hace bajo anestesia local y mediante una técnica electiva llamada liposucción, es posible aspirar grandes cantidades de tejido adiposo conformado por múltiples tipos celulares, el que posteriormente es sometido a técnicas de procesamiento [187]. De hecho, se pueden obtener aproximadamente 1 billón de células a partir de 1 litro de aspirado [187][188]. Luego es sometido a lavados intensos, a digestiones enzimáticas utilizando colagenasa para remover la MEC y finalmente centrifugado hasta obtener lo que se denomina lipospirado procesado o fracción vascular estromal (SVF) [187][175][188].

9.4.2.3. *Sangre Periférica (SP)*

El uso de sangre periférica como fuente no invasiva de recolección de MSCs parece ser una buena alternativa en comparación a fuentes como médula ósea y tejido adiposo. Sin embargo, resultados respecto a la disponibilidad de MSCs en sangre periférica es controversial. El éxito en el aislamiento frecuente de MSCs en conejos, ratones y conejillos de indias contrasta con el pobre aislamiento en humanos, perros y equinos [189][124][190][191][192]. La diferenciación de MSCs derivadas de sangre periférica equina en adipocitos, condrocitos y osteocitos se pudo observar sólo después de la inducción mediante protocolos modificados o tiempos prolongados de incubación [192][191]. Adicionalmente, la alta fragilidad de estas células durante el cultivo, descongelación y los continuos pasajes han sido reportados, limitando el uso experimental y comercial en equinos [192].

9.4.2.4. *Membrana Sinovial (SM) y líquido sinovial*

Resultados prometedores se lograron en una investigación de membrana sinovial y de líquido sinovial como potencial fuente de MSCs [193]. Si bien la recolección de la muestra mediante un procedimiento levemente invasivo es posible, la cantidad inicial de células obtenidas de líquido sinovial son extremadamente bajas. MSCs de membrana sinovial (SM-MSCs) han sido aisladas y analizadas en ratas, conejos, cerdos y bovinos [167][194][195][196]. Además se han realizado muchos estudios utilizando muestras humanas debido al fácil acceso a este tejido [167][197][198][199][200][201]. Las SM-MSCs probablemente residen dentro de las pocas capas de células que tiene la membrana sinovial. Las MSCs que se encuentran en el líquido sinovial podrían representar las células progenitoras que entran en el espacio articular provenientes de la circulación sistémica o podrían derivar de la población de células que reside dentro del cartílago articular [202][203].

El aislamiento de SM-MSCs parece ser superior a otro tipo de MSCs en cuanto a la capacidad de diferenciación y el potencial proliferativo [167][204]. El interés en esta fuente de MSCs está basado en la repetida observación que las SM-MSCs tienen mayor potencial condrogénico que las BM-MSCs, AT-MSCs u otra fuente de MSCs, sugiriendo que esta fuente de MSCs es particularmente relevante en la reparación del cartílago [205][206][167]. En un estudio *in vivo* realizado en cartílago de conejo demostró la efectiva regeneración del cartílago luego de realizar un implante de SM-MSCs [204].

9.4.2.5. *Tejidos extraembrionarios*

Debido al hecho que el rendimiento y el potencial de diferenciación de las MSCs disminuyen con el aumento en la edad del donador [177][207], es que los tejidos extraembrionarios como; sangre de cordón umbilical (UCB), tejido de cordón umbilical o también llamada gelatina de Wharton (WJ), fluido amniótico y tejidos placentarios como membrana amniótica (AM) son fuentes especialmente prometedoras de MSCs.

Estas MSCs pueden ser recolectadas al momento del nacimiento y criopreservadas para aplicaciones futuras [207][208], además parecen mostrar capacidades para diferenciarse no sólo en linajes de origen mesodérmico, sino también en linajes de origen endodérmico y ectodérmico [209][210]. La exitosa recolección no invasiva de MSCs desde gelatina de Wharton (WJ), acompañada de una capacidad de diferenciación multipotencial, hace que califique como una prometedora fuente de

MSCs [209][150]. Aún las MSCs aisladas de WJ representan una población celular bastante heterogénea.

El aislamiento de MSCs de sangre y tejido del cordón umbilical equino podría proporcionar una fuente no invasiva de SC con características celulares potencialmente superior a otras SC equinas con respecto a la tolerancia inmune, potencial proliferativo y potencial de diferenciación. Algunos estudios reportan el aislamiento, criopreservación y descongelamiento de MSCs a partir de sangre de cordón umbilical y de tejido de cordón umbilical (WJ) equino con diferenciación *in vitro* hacia linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico [211][150]. La eficiencia del aislamiento y la formación de colonias a partir de UCB parece ser menor que las BM-MSCs y AT-MSCs, pero las MSCs de UCB presentan una proliferación alta y rangos de proliferación más sostenidos que otras fuentes de MSCs [177][212][213].

La membrana amniótica (AM) o amnios, tanto equina como humana, es un tejido de interés dado que sus células poseen características de células madre con capacidad de diferenciación pluripotente [214][215] o multipotente, baja inmunogenicidad y fácil obtención desde la placenta; ya que es un tejido de desecho posterior al parto [25][126]. Por lo tanto el uso de membrana amniótica es hoy propuesta como un buen candidato para ser usada en terapia celular y medicina regenerativa [25][215]. Se ha comprobado que es factible la obtención de MSCs a partir de placenta equina, pues los tejidos que la conforman son formados en las etapas más tempranas del desarrollo embrionario [215], además la placenta es fundamental para la tolerancia inmune feto-maternal lo que claramente implica una inmunomodulación por parte de la misma [216].

La placenta es descartada luego del parto y es considerado un desecho biológico. Entre los tejidos que conforman la placenta se encuentra la membrana amniótica (AM), una membrana fetal delgada, avascular, traslúcida y semipermeable, unida a la membrana coriónica en el caso de los humanos, mientras que en equinos se encuentra unida al Alantoides [25][215][126]. Está compuesta por células epiteliales cúbicas que se encuentran en contacto con el líquido amniótico por el lado externo y por el lado interno unida a la lámina basal, donde además se encuentra el mesénquima amniótico o matriz. Para ambas especies, humanos y equinos, el amnios es la capa más interna de las membranas fetales y puede ser separada mecánicamente de la placenta [215].

En la matriz o mesénquima de la membrana amniótica equina se encuentran las células mesenquimales (EAMSCs), teniendo en cuenta la composición de esta membrana los protocolos descritos se organizan en cuatro etapas generales; lavados iniciales, luego una pre-digestión, luego la digestión principal para finalizar con el cultivo en placa para finalmente realizar un análisis de las células [217].

La etapa de lavado inicial se realiza para eliminar restos de tejidos y coágulos de sangre presentes luego de la separación mecánica de la membrana amniótica desde la placenta, generalmente se utiliza buffer fosfato salino (PBS) con o sin solución de antibióticos-antifúngicos. Estas soluciones además de facilitar el lavado, mantiene un pH controlado gracias a los fosfatos y otras sales presentes en solución (pH 7-8) que permite mantener equilibrado el microambiente sin afectar a las células y otros componentes [218].

La siguiente etapa considera una pre-digestión de la membrana amniótica que permite eliminar las células que forman el epitelio de la membrana, utilizando comúnmente la tripsina y se realiza para evitar la contaminación de células epiteliales en la muestra final. La tripsina es una enzima endopeptidasa que rompe las uniones entre células hidrolizando los enlaces peptídicos de estas proteínas de unión a una temperatura óptima de 37°C, lo que separa a las células epiteliales de la MA [219][217].

La etapa más importante dentro del protocolo es la digestión que considera enzimas capaces de romper las fibras que componen la matriz donde se encuentran las MSCs [128][220]. Para esta etapa generalmente se utiliza colagenasa I o IV las cuales rompen el colágeno I o IV, que se encuentra en gran cantidad y son los encargados de darle estructura a la matriz. De esta forma al romper estas fibras, las células se liberan y puedan ser separadas por filtros, columnas de densidad, centrifugación entre otras técnicas [221] [128].

Finalmente, la etapa que permite analizar las células obtenidas o incluso generar una nueva fuente disponible de células madre es la de cultivo, en donde se define un número de células a cultivar, el tipo y tamaño de la placa y la cantidad de medio con nutrientes que se les va a entregar [217].

Tras el aislamiento celular es necesario facilitar el mantenimiento y crecimiento de estas células, para ello se dispone de diferentes sistemas de cultivo celular que proveerán un ambiente que permitirá mantener las células por un tiempo determinado.

Éstas se cultivan y mantienen a una temperatura y mezcla de gases (37°C, 5% CO₂ y 95% O₂) apropiados en un incubador [217]. Las condiciones de cultivo varían ampliamente dependiendo del tipo celular, y estas variaciones en las condiciones para un tipo celular concreto, pueden dar lugar a la expresión de diferentes fenotipos para un mismo tipo celular [222]. Además de la temperatura y la mezcla de gases antes mencionadas, es importante el medio de crecimiento para cultivo celular. La composición de estos medios varían en pH, concentración de glucosa, factores de crecimiento y la presencia de otros componentes nutritivos [223][224]. Los factores de crecimiento usados para suplementar a los medios derivan a menudo de sangre animal, como el suero fetal bovino [217].

Las células pueden crecer en suspensión (crecen en medio líquido en superficie) o de manera adherente (adheridas al fondo de la placa) y esto dependerá del tipo de células. Por ejemplo las células aisladas de la sangre crecen en suspensión, mientras que las células aisladas de tejido se adhieren a placas [217].

Es importante mencionar que la dificultad del trabajo de células MSCs no sólo está asociada al aislamiento, sino que una vez extraídas las células deben mantenerse viables e indiferenciadas por el mayor tiempo posible para hacer factible su posterior uso [108].

Para el caso de las MSCs, su ecosistema es primordial para mantener sus características, este les permite mantener sus propiedades de autorenovación, mediante divisiones controladas, las dirige hacia donde es necesario que estén presentes o las guía en su diferenciación en células especializadas tanto en el embrión en desarrollo como en el individuo adulto [108][107][225]. (Ver Tabla 1)

9.4.3. Morfología

Las MSCs se caracterizan por presentar una morfología espigada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo alargado, central, que contiene de dos a tres nucléolos [226]. Vidal *et al.* (2006), explican que la morfología celular de las células primarias incluye grandes, amplias y en ocasiones, células multinucleadas, así como en forma de huso y células mononucleares. El grado de heterogeneidad disminuye con el consiguiente paso a pequeños fibroblastos en forma de huso que comienza a predominar [83].

Las MSCs también son descritas como células de pequeño tamaño (<6 μm), presentan una alta relación citoplásmica/nuclear y contienen eucromatina primitiva desorganizada [227]. En cultivo de células MSCs equinas, proliferan uniformemente, manteniendo una morfología homogénea como fibroblastos, con una apariencia en forma de huso y hacia el exterior en un patrón de "remolino de fibroblastos" [49]. El crecimiento celular confluye en un crecimiento en múltiples capas, indicando una falta de inhibición de contacto [83]. En los siguientes pasajes, las células con apariencia fibroblastoide se separan más fácilmente durante la tripsinización, llevando a una población celular morfológicamente homogénea [83]. (Ver Figura 5)



Figura 5. BM-MSCs, AT-MSCs, UCB-MSCs, durante el cultivo celular muestran $\geq 80\%$ de confluencia: BM-MSCs (A), AT-MSCs (B) y UCB-MSCs (C), con aproximadamente un 80% de confluencia luego de 11 días, 7 días y 15 días respectivamente. (A) y (B) están amplificadas 100x y (C) 200x.

En cultivo, tienen un tiempo de duplicación de la población de 33 horas, un amplio potencial expansivo y características del ciclo celular incluyendo un subgrupo (20%) de células quiescentes (inactivas) [170]. La existencia de un subconjunto de células en reposo en cultivos de MSCs de médula ósea, parece ser muy significativo, ya que su número y propiedades deben ser suficientes para mantener un suministro constante de células que a la proliferación y entrega puedan servir como precursores de una serie de tejidos no hematopoyéticos [174]. En muchos tejidos, el subconjunto de células que se reproducen con poca frecuencia y son quiescentes, muestran un potencial de autorenovación [174].

9.4.4. Caracterización

Las MSCs son poblaciones celulares que expresan marcadores específicos en la superficie con capacidad de autorenovación y de diferenciación a distintas líneas celulares en condiciones adecuadas [228][151].

Para identificar MSCs *in vitro*, las células deben tener tres características específicas [144][174][185]. La sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propone tres criterios de identificación de MSCs; adherencia al plástico, expresión de antígenos de superficie específicos y potencial de diferenciación multipotente.

La primera característica es la capacidad de las MSCs de adherirse al plástico de cultivo y formar colonias tipo fibroblastos [229], por lo tanto el término unidad fibroblástica formadora de colonia está aplicado a los cultivos de MSCs que no han sido inducidas a un linaje específico [229][230]. El análisis inmunohistoquímico de células tipo fibroblastos muestran tinción positiva para fosfatasa alcalina, colágeno III y fibronectina [229]. La adherencia al plástico es una propiedad bien descrita de las MSCs, incluso en pequeños grupos de MSCs ha sido descrita esta propiedad [231][166]. Mientras MSCs pueden ser mantenidas en expansión sin adherencia, requieren condiciones de cultivo muy específicas, y si son mantenidas en condiciones estándar pueden llegar a demostrar adherencia aunque no sean consideradas una población de MSCs [232].

En segundo lugar, las MSCs deben expresar marcadores de superficie específicos, también llamados "cluster" de diferenciación. Este sistema de nomenclatura es usado con el objetivo de poder clasificar los marcadores de superficie de la célula (antígenos de superficie). Los antígenos de superficie permiten la rápida identificación de poblaciones celulares [144]. Los marcadores de superficie de las MSCs en cultivo han sido identificados por medio de inmunohistoquímica y citometría de flujo.

La sociedad internacional de Terapia Celular (ISCT) propone los marcadores específicos que deben expresar las MSCs para ser identificadas [144]. Un porcentaje mayor al 95% de la población de MSCs deben expresar CD105, CD73 y CD90, medidos por citometría de flujo. Adicionalmente estas células no deben expresar CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD109 o CD19a y HLA Tipo II [233][234][235][236][106][138][188][237][141][238].

La expresión de marcadores de superficie celulares puede variar debido a las diferentes técnicas de aislamiento y a los tiempos de cultivo [239][240]. Incluso existen variaciones asociadas a las especies, origen celular (embrionaria o adulta) y sitio de origen. Está demostrado que los marcadores de superficie difieren entre AT-MSCs y BM-MSCs. Mientras que las AT-MSCs son positivas a CD49d ($\alpha 4$ integrina) y a CD106 (molécula de adhesión celular vascular), las BM-MSCs no expresan CD49d [142].

Marcadores de pericitos como CD146 (Muc18) han sido identificados en la superficie de BM-MSCs y de AT-MSCs con citometría de flujo [235][241][242]. Hasta el momento no existe un solo marcador o conjunto de marcadores que permitan identificar de manera categórica una población de MSCs *in vivo*, por lo que se recomienda utilizar más bien una combinación de ellos [243][244].

Extensos estudios han sido dedicados para el aislamiento y la caracterización fenotípica de MSCs en varias especies incluidas bovino, perros, equinos, gatos, humanos, primates, ratones y ratas [129][245][246][184][169][247][248][249][250]. Las BM-MSCs tienen un fenotipo morfológico heterogéneo, presentan forma fibroblastoide en distintas colonias. Luego de la expansión el fenotipo se vuelve una población celular homogénea con forma fibroblastoide. Muchas especies tienen diferencias morfológicas entre AT-MSCs y de BM-MSCs. Las AT-MSCs y BM-MSCs en caninos y equinos comparten alguna morfología fenotípica similar, pero existen diferencias entre los pasajes celulares [187][83]. Morfológicamente, primariamente AT-MSCs forma poblaciones celulares con forma fibroblastoide más homogéneas. Esta morfología homogénea de células con forma fibroblastoide es mantenida a través de la expansión. Aún se encuentran en estudio los métodos para caracterizar morfológica y citoquímicamente las propiedades de MSCs [116].

Finalmente, la propiedad biológica que identifica de forma única la mayoría de las MSCs es la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones de diferenciación de cultivo estándar *in vitro* [129]. La diferenciación hacia los distintos linajes puede ser demostrada mediante el uso de diversas tinciones; así por ejemplo la diferenciación a osteoblastos puede ser demostrada mediante tinción con Alizarin Red, la diferenciación a adipocitos es demostrada con tinción Oil Red y la diferenciación a condroblastos es demostrada por medio de la tinción con Alcian Blue o tinción inmunohistoquímica para colágeno II [116][211].

Mientras la adherencia al plástico y la diferenciación en las tres líneas celulares son características de células de otras especies por ejemplo en MSCs de ratón, la expresión de antígenos de superficie no está universalmente bien caracterizada y los antígenos recomendados no podrían ser aplicados en modelos no humanos [144]. Hasta el momento no existe un marcador que por sí solo sea capaz de identificar de manera categórica una población de células madre mesenquimales *in vivo*, por lo que se recomienda utilizar más bien una combinación de ellos [243].

9.4.5. Mecanismo de acción

Se ha observado que las MSCs, dada su multipotencialidad, tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de tejidos de origen mesodérmico, ayudando a reemplazar de esta forma a las células dañadas [129]. Además se ha descubierto que este tipo de células tendrían otra forma de actuar y no es necesariamente mediante la diferenciación *in vivo* en tejidos sino a través de la liberación de péptidos bioactivos que actuaran de forma directa o indirecta en las células circundantes a la lesión, ejerciendo efectos autocrinos y paracrinos [251][173]. De este modo las células madre mesenquimales participarían como mediadores tróficos, mediante la liberación local de factores de crecimiento y citoquinas para atraer macrófagos y células del linaje endotelial, estimulando así la reparación del tejido por las propias células afectadas [251][252]. Sin embargo, esta capacidad va decreciendo en pacientes añosos, dado que el número de células madre mesenquimales también disminuye con el paso del tiempo secundariamente a una pérdida progresiva en la masa ósea [251].

Las células madre derivadas de tejidos adultos pueden participar en la regeneración de daños tisulares mediante dos mecanismos distintos; la contribución directa, a través de la diferenciación fenotípica de células del tejido específico y la evidente generación del producto de matriz extracelular del tejido apropiado [176]. El trasplante de MSCs en diferentes tejidos dañados ha mostrado promover la reparación [253][254][255]. Se describe que las MSCs tienen la capacidad de movilizarse hasta el sitio de la lesión y contribuir a la regeneración del tejido [256]. Así por ejemplo en tendón, se cree que las MSCs pueden cumplir dos roles; ya sea diferenciándose en células capaces de sintetizar matriz de tendón o secretando factores que inducen a las células colindantes a sintetizar matriz de tendón [251][257].

Potencialmente, las células madre derivadas de tejidos adultos contribuyen a la recuperación indirecta, por la producción de proteínas bioactivas, tales como factores de crecimiento, factores antiapoptóticos y agentes quimiotácticos [175]. Estas proteínas ocultas tienen un profundo efecto en la dinámica celular local, estimulando el crecimiento interno vascular y el reclutamiento de células madres adicionales capaces de estimular una mayor recuperación [176]. Además ha sido informado que las MSCs tienen un marcado potencial proangiogénico *in vivo* [175].

En BM-MSCs, se ha descrito que además de la capacidad que tienen de migrar desde su nicho habitual hasta el área comprometida para diferenciarse en un fenotipo

idéntico a las células del tejido afectado, tienen la facultad de inducir localmente un ambiente reparador liberando citoquinas y factores de crecimiento [169][182][258][251]. Estas moléculas solubles estimularán a las propias células sanas cercanas a la lesión a regenerar el tejido dañado con una menor cantidad de fibrosis y una mayor vascularización [251][258].

Se ha descrito que el efecto de las BM-MSCs puede ocurrir en el sitio afectado inclusive si son inyectadas distantes a él. Además se detectó que las BM-MSCs expresaban TGF- β 1, EGF, VEGF, PDGF, KGF, FGF y HGF de manera constitutiva para el mantenimiento de la MEC, pero las cantidades de algunos de ellos se incrementaban significativamente en la zona luego de ocurrida la lesión con la finalidad de estimular la reparación. Los niveles de estos factores fueron detectables hasta aproximadamente una semana posterior al daño. Se concluyó que el aumento de las moléculas solubles liberadas por las BM-MSCs ocurre como consecuencia del daño tisular [181]. Lo anterior posiblemente para estimular la neoangiogénesis, sin descartar la posibilidad de que las BM-MSCs puedan integrarse y diferenciarse en fenotipos celulares del tejido lesionado para restaurar la función [181].

En el caso de las AT-MSCs, la posibilidad de que respondan a un estímulo, tal como la hipoxia, podría permitir adaptarse al medio ambiente en el que se encuentre, por la modulación de la producción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) en respuesta a la isquemia cuando la vasculatura naciente se está formando [175].

9.4.6. Inmunogenicidad

Las MSCs se han convertido en una alternativa al uso de células embrionarias (ES) dado que son ética y socialmente aceptables además de tener beneficio inmune [116].

En medicina veterinaria, generalmente las MSCs son obtenidas a partir de cultivos celulares realizados con muestras de tejido del mismo paciente también llamadas MSCs autólogas, sin embargo, el uso de MSCs autólogas en el tratamiento de pacientes tiene limitaciones inherentes. Como fue mencionado anteriormente, la fase ideal para la realización del tratamiento con MSCs sería entre los primeros 15-20 días desde que se produce la lesión en el paciente [75][30][259]. Para la obtención de MSCs a partir de tejidos del mismo paciente, se requiere un proceso de cultivo y expansión de las células de al menos 30 días para lograr la concentración de MSCs óptima para el tratamiento [75]. Es por esta razón que se han promovido estudios en medicina regenerativa con el propósito de evaluar la aplicación de MSCs alogénicas, o

sea, MSCs obtenidas a partir de tejidos de diferentes individuos de la misma especie (donador).

La inmunogenicidad de las MSCs todavía no es entendida completamente. Las MSCs son consideradas hipoinmunogénicas debido a que suprimen la actividad de los linfocitos T al igual que la función de las células dendríticas [115][260]. El perfil inmunológico de las MSCs, indica que expresan bajos niveles de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y que no expresan MHC clase II en la superficie celular, lo que le da una importante característica inmunomodulatoria [216][261][262]. La falta de expresión de MHC II da a las MSCs la facultad de no ser reconocidas por los linfocitos T [260][75][263].

Krampera *et al.* (2006) reportó la falta del complejo MHC clase II en MSCs de ratones y su actividad inhibitoria de linfocitos T. Otro estudio en humanos mostró que las MSCs alogénicas no generan respuesta de linfocitos T [264]. Además fue reportado que las MSCs alogénicas suprimen la actividad linfocitaria *in vitro*, prologando la supervivencia del trasplante y demostrando una capacidad antiinflamatoria intrínseca que promueve la reparación [265][264][266]. Algunos estudios sugieren que las MSCs expresan este efecto tanto a nivel celular como molecular, promoviendo la expansión de los linfocitos T y la disminución de citoquinas inflamatorias [267]. Debido a estas propiedades, las MSCs son actualmente usadas en ensayos clínicos en humanos para tratar el rechazo de los trasplantes en el huésped [268][269][270][271].

Un estudio donde se realizó un análisis de moléculas MHC II y de moléculas co-estimuladoras demostró que las AT-MSCs tienen un perfil de baja inmunogenicidad después de un tiempo de cultivo prolongado [262][261]. López *et al* (2009) evaluó el uso de AT-MSCs alogénicas y AT-MSCs singénicas (genéticamente idénticas) en un modelo de fusión espinal en ratas. AT-MSCs de ratas adultas fueron implantadas para promover la fusión espinal lumbar [272]. No existió diferencia significativa entre AT-MSCs alogénicas y las AT-MSCs singénicas en la estimulación de la fusión espinal lumbar. Un estudio inmune paralelo, demostró que no existe respuesta de linfocitos T frente a la inyección de AT-MSCs alogénicas o AT-MSCs singénicas [273]. Los resultados de este estudio destacan el uso de MSCs alogénicas o singénicas adultas para propósitos terapéuticos o regenerativos, y también confirman aún más el privilegio inmune de las MSCs. Por otra parte, las características inmunosupresoras de las MSCs pueden potencialmente reducir la incidencia de rechazo del implante luego del trasplante alogénico [273][272].

Algunos de los mecanismos propuestos con respecto a la inmunosupresión que generan las MSCs, incluye la disminución de la proliferación de linfocitos T, inducción de un cambio en los linfocitos T reguladores [274][275][276], secreción de factores solubles, incluyendo PGE₂ e IL-10 [277][278] y el decrecimiento en la producción de citoquinas inflamatorias por varias poblaciones celulares [279].

La mayoría de los estudios que usan modelos animales sugieren que las MSCs también muestran capacidad inmunosupresora *in vivo*, sin embargo, algunos estudios realizados *in vivo* han demostrado que MSCs alogénicas pueden provocar una respuesta inmune en el huésped [280][281].

Trabajos con MSCs en humanos, roedores, y otras especies animales como conejos, cerdos y equinos, sugieren que el uso de MSCs alogénicas es posible independiente del tejido de origen y han reportado tener baja inmunogenicidad *in vitro* [281][282][283].

Transplantes alogénicos de MSCs fueron realizados en conejos y equinos, sin presentar diferencias significativas en comparación con transplantes autólogos [284][255].

En un estudio realizado en tendón en conejos, fueron implantadas BM-MSCs alogénicas, el resultado mostro que induce una distribución similar de células inflamatorias al igual que el grupo que fueron implantados con MSCs autólogas. No fue observada reacción inmune aparente asociada al transplante con MSCs alogénicas [255].

En otro estudio, MSCs alogénicas y autólogas fueron inyectadas en una lesión artificial generada en el tendón flexor en un modelo equino. No existieron diferencias en el número o la distribución de las células autólogas y alogénicas o de la densidad leucocitaria en el sitio de inyección. No fue detectado aumento de signos externos ni histológicos de inflamación comparado con el sitio de inyección de MSCs autólogas [284].

Recientemente fue reportada la inyección intraarticular de MSCs alogénicas derivadas de UCB y de WJ, comparadas con MSCs autólogas. Este estudio demostró que la inyección intraarticular de MSCs provoca inflamación dentro del líquido sinovial. Sin embargo, no fueron detectadas diferencias significativas entre el grado o tipo de inflamación provocada tanto por MSCs alogénicas como autólogas. Fue concluido que las articulaciones saludables de equinos responden de igual forma a la inyección intraarticular tanto de MSCs autólogas como alogénicas [285].

Los resultados de estos ensayos preliminares son prometedores y se puede concluir cuidadosamente que las MSCs alogénicas podrían ser usadas como plataforma en medicina regenerativa con propósitos en medicina veterinaria [82]. (Ver Tabla 1)

Tabla 1. Resultados de investigaciones que evaluaron la inmunogenicidad de las MSCs en distintas especies.

Especie	Resultado	Referencias
Humano	MSCs alogénicas suprimen actividad linfocitaria <i>in vitro</i> y prologan la supervivencia del trasplante. Capacidad antiinflamatoria intrínseca promueve la reparación. Características inmunosupresoras de MSCs reducen incidencia de rechazo del implante post-trasplante alogénico.	Tse W. <i>et al.</i> (2003), Krampera M. <i>et al.</i> (2006), Di Nicola M. <i>et al.</i> (2002), Le Blanc K. <i>et al.</i> (2004), Le Blanc K. <i>et al.</i> (2008), Le Blanc K. <i>et al.</i> (2011), Lee K. <i>et al.</i> (2011).
Ratón	Ausencia complejo MHC-II en MSCs, actividad inhibitoria de linfocitos T.	Krampera M. <i>et al.</i> (2006).
Rata	Implante de AT-MSCs alogénicas y AT-MSCs singénicas en modelo de fusión espinal. No existió diferencia significativa entre AT-MSCs alogénicas y las AT-MSCs singénicas en la estimulación de la fusión espinal lumbar. Uso de MSCs alogénicas o singénicas adultas para propósitos terapéuticos o regenerativos, confirman efecto inmunosupresor de las MSCs.	López M. <i>et al.</i> (2009), McIntosh K. <i>et al.</i> (2009).
Conejo	Implante de BM-MSCs alogénicas en tendón. BM-MSCs induce distribución similar de células inflamatorias que el grupo implantado con BM-MSCs autólogas. No fue observada reacción inmune aparente asociada al trasplante con MSCs alogénicas.	Chong A. <i>et al.</i> (2007)
Equino	Inyección en tendón lesionado de MSCs alogénicas y autólogas. No existió diferencia en el número o la distribución de las células autólogas y alogénicas o de la densidad leucocitaria en el sitio de inyección. No fue detectado aumento de signos externos ni histológicos de inflamación comparado con el sitio de inyección de MSCs autólogas.	Guest D. <i>et al.</i> (2008).
Equino	Inyección intraarticular de UCB-MSCs y WJ-MSCs alogénicas, comparadas con MSCs autólogas. Inyección genera presencia de moléculas inflamatorias en líquido sinovial. No presentó diferencias significativas entre grado o tipo de inflamación provocada tanto por MSCs alogénicas como autólogas. Articulaciones saludables responden de igual forma a la inyección intraarticular tanto de MSCs autólogas como alogénicas.	Carrade D. <i>et al.</i> (2011).
Cerdo	Inyección de MSCs alogénicas vía intracardiaca genera respuesta inmune en el huésped .	Poncelet A. <i>et al.</i> (2007).
Fuente: Elaboración propia		

9.4.7. Microambiente o Nicho

El potencial de las SC en medicina regenerativa depende de la remoción de las células de su hábitat natural, la expansión en cultivo y la introducción de éstas en una región de trasplante. Para hacer esto, es esencial entender como las SC interactúan con su microambiente o nicho para establecer y mantener sus propiedades [108][286][106][109].

El término "nicho" se refiere al medio ambiente local de las SC, el cual juega un rol importante en la regulación de funciones, debido a factores en gran medida desconocidos, que actúan de forma autocrina o paracrina para promover la diferenciación [115]. Los nichos se definen como locaciones anatómicas específicas que regulan la forma de participación de las SC en la generación de tejido, mantenimiento y reparación. Constituye una unidad básica de la fisiología del tejido, integrando señales que median la respuesta de las SC a las necesidades del organismo [106][287]. La interacción entre las SC y su nicho crea un sistema dinámico necesario para el mantenimiento de los tejidos y para el diseño de terapias con SC [286][115]. El nicho evita la reducción de SC, mientras protege al huésped de un exceso de proliferación de SC [106]. La simple localización de las SC no es suficiente para definir un nicho, éste además debe tener dimensiones anatómicas y funcionales [110][106].

Dado que las MSCs residen en la mayoría de los tejidos y órganos, se requiere de un sistema regulador altamente complejo para asegurar que las células madre se mantengan en estado indiferenciado [287] [108]. Interacciones específicas entre las células y la matriz extracelular (MEC) son necesarias para que las células estromales puedan proliferar y diferenciarse [108]. El nicho no solo está compuesto por SC, sino también por un conjunto de diferentes tipos celulares vecinos diferenciados, los cuales secretan y organizan un entorno rico en matriz extracelular y otros factores que permiten a las SC manifestar sus propiedades intrínsecas únicas, incluyendo la capacidad de autorenovación, mientras mantiene su repertorio de programas de diferenciación en espera [108][287][106]. El nicho está compuesto por todos los elementos incluyendo células no estromales adyacentes, la matriz extracelular local (MEC) y moléculas solubles que se encuentran rodeando las células estromales [106]. El nicho está pensado para influir en la expresión génica y la autorenovación de las SC y compromiso con linajes específicos [288].

Además de la población de MSCs misma, los nichos contienen una o más poblaciones distintas de células de soporte, las cuales proporcionan las señales necesarias para mantener la función de células madre [287][108].

Existen varias teorías con respecto a la determinación del linaje de las SC. Una de las teorías propone que las SC respaldan la formación de nichos de otros tipos celulares [289]. Por ejemplo, las células y MEC del estroma de la médula ósea forma un microambiente que controla la quiescencia, autorenovación y el compromiso de las SC en la proliferación, maduración y apoptosis de células maduras [290]. Las SC controlan

en el microambiente la diferenciación y proliferación de células progenitoras a través de la secreción de citoquinas y otros factores [289].

Un foco importante está en los factores de señalización y la comunicación intercelular en el microambiente local y las interacciones entre las SC y la MEC colindante [108]. Se ha sugerido que un sistema altamente orquestado mantiene las SC en su estado indiferenciado, hasta que alguna señal específica, active su potencial de diferenciación para propósitos reparativos o regenerativos [291]. Las MSCs secretan factores solubles que estimulan la proliferación o diferenciación y la disminución de la respuesta inflamatoria e inmune [155][288][292]. Algunos factores solubles secretados por SC son antiapoptóticas, angiogénicas y quimioatrayentes [293]. Para inhibir la apoptosis las MSCs secretan moléculas bioactivas antiapoptóticas, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), entre otros [293]. Bajo condiciones de cultivos hipóxicas, las AT-MSCs expresan HGF, VEGF, GM-CSF, factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) [175]. La secreción de proteínas críticas minimiza la muerte celular en zonas adyacentes al sitio de injuria. La secreción de MSCs de moléculas de la MEC como el factor de crecimiento insulínico tipo 1, interleuquina 6 (IL-6), bFGF y VEGF inducen angiogénesis [293]. Las MSCs promueven la formación *in vitro* de estructuras tipo capilares, mediante altos niveles de IL-6, VEGF, entre otros [293].

Exactamente cuando y donde la mayoría de los nichos de las SC se desarrolla sigue siendo una incógnita, además existe una variación considerable en el diseño del nicho. Algunas SC pueden existir en relativo aislamiento, haciendo parecer como si no tuvieran un nicho específico dentro de su tejido respectivo. Así por ejemplo las SC musculares, conocidas como células satélites, normalmente permanecen inactivas unidas a la lámina basal y solo se vuelven a reactivar para proliferar y fusionarse en diferenciados miotubos cuando las fibras han sido dañadas y necesitan ser reparadas [108]. En contraste, tejidos sometidos a rotación continua, normalmente se subdividen en unidades, las cuales cuentan con pequeños reservorios de SC responsables de la reposición y rejuvenecimiento del tejido cuando es requerido [108].

La adhesión de las SC a sus nichos es en parte gracias a moléculas del tipo E-caderina el cual junto a β -catenina concentra las SC dentro del nicho. Caderinas y cateninas participan en la formación de uniones intercelulares especializadas, llamadas uniones adherentes, las cuales pueden ser remodeladas por virtud de su asociación con el

citoesqueleto de actina [294]. La capacidad de las SC de vivir en nichos es un fenómeno evolutivo conservado, y por lo tanto no es sorprendente ver que las características celulares básicas de retención de las SC son ampliamente utilizados en todo el reino eucariota [107].

De la misma forma, las integrinas, las cuales median la adhesión de las células a la lámina basal compuesta de matriz extracelular (MEC), son a menudo parte importante de la adhesión de las SC, y estudios en la pérdida de la función en ratones revela que las integrinas y las uniones adherentes juegan un rol crítico en el mantenimiento de la ubicación, adhesividad y estado proliferativo de las células en los tejidos [107]. El nicho puede fortalecer aún más su capacidad de retener las SC proporcionando un medio único de ligandos de la MEC para los receptores de integrina que se encuentran en superficie de las SC [107].

La capacidad del nicho de retener las SC, es también probable que juegue un papel en el reclutamiento de SC, en un proceso referido como "Homing". Sin embargo, una vez que se establecen nichos parecen ser capaces de sobrevivir al menos transitoriamente como centros de señalización para atraer a las SC. Por otro lado, el nicho es crítico en la mantención de la capacidad de autorenovación de las SC, y la mantención del carácter indiferenciado de las SC residentes, incluso pudiendo extenderse a células vecinas [109].

Las SC dentro de los nichos a menudo se encuentran en quiescencia [107][109]. Dado que la proliferación puede ser inducida a menudo en cultivos, esta característica sugiere que el microambiente del nicho es inhibitorio tanto de la proliferación como de la diferenciación [295]. Fuch *et al.* (2004), describe que la activación de las SC en su nicho podría estar dado por un flujo constante de SC que se dividen lentamente, como el nicho queda ocupado, el exceso de SC son desplazadas poco después de que se dividen, aflojando físicamente las conexiones con este nicho [108]. En este escenario, cuando se enfrentan a un nuevo entorno, las SC recientemente divididas que fueron expulsadas proceden a diferenciarse. Alternativamente, las SC pueden simplemente permanecer latentes en el nicho hasta que tengan que volverse funcionales por ejemplo, en respuesta a injuria. En este caso, un cambio en el entorno del tejido podría dar la señal al nicho para que movilice a las SC que se encuentran en su dominio [108][109][107].

Finalmente, el nicho pareciera funcionar como un medio adhesivo que permite retener las SC hijas, pero expulsa las SC hijas diferenciadas. Al menos en algunos casos, esto pareciera llevarse a cabo utilizando células no estromales del nicho, las cuales proporcionarían la base para la polarización dirigiendo espacialmente hacia divisiones celulares asimétricas [108][107].

Además, el diseño arquitectónico del nicho pareciera ser específicamente adaptado para las necesidades particulares de las SC residentes y, por el contrario, las SC jugarían un importante rol en la organización y especificación del nicho. De esta forma, aunque los nichos comparten ciertas similitudes en la activación de una vía común de transducción de la señal para conseguir la autorenovación y mantener en estado indiferenciado las células residentes, cada nicho está compuesto por diferentes células no troncales así como también por SC que establecen ese microambiente [108].

En general, existe una combinación entre el comportamiento interno de la SC y las señales externas proporcionado por la arquitectura y microambiente único del nicho que permite proteger la SC, mantener su potencialidad, determinar cuán rápido las SC se dividirán y especificar si se debe dividir simétrica o asimétricamente [108].

10. APLICACIONES TERAPEUTICAS DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)

10.1. Consideraciones Generales

Como fue mencionado anteriormente, la terapia celular se centra en estrategias terapéuticas que permitan reemplazar o restaurar tejidos dañados o contrarrestar el envejecimiento de las células en el cuerpo y así mejorar su función [312][313]. La regeneración implica la reposición de células originales del tejido lesionado, después de una sección o una lesión, seguida por la generación de células progenitoras de regeneración y morfogénesis [314]. Su principal objetivo es obtener la regeneración de los tejidos y evitar la reparación (cicatrización) de los mismos. Las MSCs han sido investigadas recientemente por su potencial uso en medicina regenerativa [49]. Las células madre multipotentes son las precursoras de células especializadas en tejidos específicos [77].

Las MSCs parecen ser una herramienta muy prometedora para la terapia celular, debido a las características similares a las células madre embrionarias, pero con

algunas ventajas en términos de disponibilidad, capacidad de proliferación, transplante e implicaciones éticas [257][265].

Está descrito que las MSCs pueden participar en la regeneración de daños tisulares por medio de 2 mecanismos distintos: la contribución directa, a través de la diferenciación fenotípica de células del tejido específico y la evidente generación del producto de matriz extracelular del tejido apropiado [176]. Las MSCs son capaces de movilizarse hacia el sitio de lesión y contribuir a la regeneración del tejido [256]. Los resultados *in vitro* indican que MSCs poseen propiedades inmunosupresoras [315]. La diferenciación y auto-renovación de las células madre están reguladas por las células específicas de su ambiente [51][178]. Krampera y col (2006) explicaron que mediante la inyección de MSCs por vía intravenosa, estas células se propagan en todos los tejidos, pero preferentemente sobreviven y proliferan en presencia de la regeneración de los tejidos y tumores, donde se convierten en fibroblastos vásculo-estromales.

10.2. En tendinitis

Las patologías de tendones y ligamentos de la región distal al carpo, constituyen una situación clínica prevalente en el equino de deporte [14][22]. La ruptura durante la actividad atlética, generalmente sigue de la acumulación de ejercicio y de los cambios degenerativos inducidos por la edad, que no han sido reparados por los fibrocitos [48]. Estas son células muy diferenciadas, por ende tienen un limitado potencial de replicación [49]. Por otro lado, además del estrés mecánico que ellos experimentan, los tendones son considerados pobremente vascularizados [48]. Las lesiones del tendón flexor digital equino, son ideales para la implantación de MSCs, ya que proporcionan un núcleo central en la lesión que puede mantener implantadas las MSCs sin la necesidad de un soporte [316].

Las MSCs, con determinados estímulos representan un método prometedor para obtener tenocitos *in vitro* para la curación del tendón [49]. Los tenocitos son células fibroblásticas responsables de la síntesis y volumen de la matriz [48]. El estímulo para la diferenciación de las MSCs en tenocitos, es en gran parte desconocido, pero la investigación actual sugiere que una combinación mecánica de tensión, señales metabólicas y contacto con las células y la matriz, es primordial para que se lleve a cabo el proceso [316]. Las MSCs producen y funcionalmente se adhieren a moléculas de la matriz extracelular [174]. Un estudio realizado en tendones de ratones y humanos, demostró que existe una población de células denominadas células

madre/progenitoras de tendón (TSPC's), las cuales tienen características de células madre como clonogenicidad, multipotencia y la libre capacidad de renovación [51]. Violini *et al.* (2009) describen que para inducir la diferenciación de las BM-MSCs en tenocitos, los cultivos celulares se mantienen durante 14-21 días en medio de cultivo complementado con BMP-12 50 ng / ml, este medio debe ser cambiado totalmente al día siguiente.

Células del estroma de médula ósea (BM-MSCs), desempeñan un papel central en la reparación y regeneración de los tejidos mesenquimales [317]. Se demostró que BM-MSCs equinas, pueden ser inducidas a diferenciarse en tenocitos [49]. Por lo tanto, una combinación de estímulos mecánicos y la proximidad a los tenocitos y la matriz del tendón, se cree que son importantes como estímulos para la diferenciación en células del tendón, como se muestra en implantación directa de células en el tendón [49]. La reparación y regeneración del tejido del tendón con BM-MSCs, sin inducción diferencial podría potencialmente llevar a osificación, lo que empeoraría la tendinopatía [51]. Sin embargo, la posibilidad de utilizar pequeñas porciones de los tendones, aislar y expandir las células que podrían formar el tendón de tejidos in vivo, ofrece una nueva estrategia para la mejora de los actuales medios de reparación del tendón [51].

Herthel (2001) describió la utilización de aspirados de médula ósea (BM-MSCs) autólogo dentro de la lesión como tratamiento de 100 caballos con desmopatía del ligamento suspensor. Como criterio de inclusión fueron considerados equinos que presentaron evidencia ecográfica de lesión aguda del ligamento suspensor y equinos que presentaron claudicación moderada o severa producto de desmitis crónica. El 50% de estos pacientes también fue tratado con fasciotomía plantar. Para la evaluación post tratamiento se realizó seguimiento ecográfico que incluyó la observación de lesión anecoica o hipoeicoica, alineamiento de las fibras y definición de márgenes del ligamento. Los resultados obtenidos fueron alentadores y más del 85% de los caballos recuperaron un nivel de función normal a los seis meses y otro 5% continuó con claudicación moderada. Sin embargo, no demostró si la mejoría clínica en esos caballos se pudo presentar por repoblamiento celular o por el efecto modulador de la respuesta biológica, que pudo ser desencadenado por factores de crecimiento presentes en esos aspirados medulares, o por la fasciotomía que fue realizada en el 50% de los caballos [50].

Smith *et al.* (2003) fueron uno de los primeros en usar células mesenquimales autólogas como tratamiento en lesiones de tendón en caballos. Estos investigadores

describieron una técnica para aislar y expandir células mesenquimales obtenidas de la medula ósea esternal de un caballo de polo con una lesión crónica central grave del tendón flexor digital superficial (TFDS) con una cronicidad de cinco meses de duración. En ese caso, solo se empleó sedación y anestesia local, tanto para obtener el aspirado medular, así como para la posterior aplicación dentro de la lesión de las células mesenquimales, 16 días posteriores a su obtención. A los 10 días reexaminaron el paciente y luego a las seis semanas posteriores a la infiltración. Las evaluaciones ecográficas mostraron una clara disminución del proceso patológico y una estructura tendinosa casi normal a las seis semanas [5]. Los resultados descritos fueron exitosos para ese paciente, sin embargo, no se puede concluir que la implantación de las células mesenquimales haya sido responsable de los cambios ecográficos observados. Es necesario considerar que la calidad de la imagen ecográfica no está correlacionada con la calidad de la ECM del tendón [12].

Smith (2008) publicó un valioso trabajo donde evaluó el tratamiento con células mesenquimales autólogas en 168 caballos de deporte con lesión en el tendón flexor digital superficial (TFDS). Luego de 48 semanas de rehabilitación, los caballos retornaron a su entrenamiento habitual. De los caballos que se introdujeron a un entrenamiento continuo solo reincidió el 18% contra un 56% reportado con terapias convencionales [318].

Guest *et al.* (2010) realizaron una investigación en ocho caballos con lesión del TFDS, los cuales fueron tratados con células embrionarias alogénicas (ESCs) y con células mesenquimales estromales autólogas (MSC). Lo más llamativo de este estudio fue la supervivencia que tuvieron las células embrionarias (60%) frente a las células mesenquimales (< 5%) en la sección inyectada del tendón. Además las ESCs presentaron un patrón migratorio, encontrándose en otras zonas de lesión dentro del mismo tendón diferentes del lugar donde fueron inoculadas, a diferencia de las MSC autólogas, las cuales solo se encontraron en el sitio de inoculación. Por otra parte, se estableció que no hubo ningún tipo de respuesta inmune en los caballos luego de la aplicación dentro de la lesión de las células embrionarias alogénicas [319].

Crovace *et al.* (2010) realizaron un estudio histológico e inmunohistoquímico en seis caballos, en el que evaluaron el efecto de tres tratamientos asignados al azar en cada miembro: 1) células estromales de medula ósea, 2) células mononucleadas de médula ósea y 3) placebo (solución salina) en un modelo de tendinitis inducida por colagenasa. En los tratamientos 1 y 2 hubo mayor presentación de colágeno tipo I y menor

presentación de colágeno tipo III. Asimismo, la concentración de COMP se encontró aumentada (2,2 y 2,4 USCH respectivamente). El grupo placebo, por el contrario, experimentó un aumento en la presentación de fibras de colágeno tipo III, menor presentación de fibras de colágeno tipo I y menor concentración de COMP. Los resultados de este trabajo sugieren una regeneración del tejido lesionado experimentalmente en los tratamientos 1 y 2, mientras que en el tratamiento 3 sugiere una reparación cicatricial en el área dañada experimentalmente [26]. Aunque los tratamientos 1 y 2 no difirieron estadísticamente, el posible uso de células mononucleadas derivadas de médula ósea podría ser una opción terapéutica más económica y menos sofisticada para tratar lesiones en tendones equinos con enfermedad natural. Sin embargo, es necesario realizar más estudios donde se obtenga información bioquímica y molecular de estas sustancias y así afianzar su uso en la clínica equina.

Luego de un año de seguimiento de un grupo de casos clínicos, diagnosticados de tendinitis y tratados con BM-MSCs, al ser comparados los resultados con datos estadísticos preexistentes sobre el mismo tipo de caballo de deporte, lesión y tratados con métodos convencionales, resultó que un 51% de los caballos tratados volvieron a competir (31% grupo de referencia) y que un 30% recayó (56% grupo de referencia)[9][320]. Resulta interesante resaltar el hecho de que todos los caballos que respondieron bien al tratamiento celular fueron implantados en el intervalo entre el inicio de la lesión y los 44 días siguientes, mientras que los caballos que recayeron fueron implantados más tarde, en el intervalo de 83 días. Una de las hipótesis establece la posibilidad de que a los 83 días pudiera haber ya un exceso de fibrosis que limitase la eficacia del tratamiento. Otros investigadores mencionan más limitaciones, ya que la aplicación de células madre mesenquimales requiere la existencia de una lesión tendinosa de tipo anecoico donde pueda ser depositado el cultivo celular [74][9][320]; si la lesión supera el 30% de la sección del tendón, el porcentaje de resultados favorables disminuye significativamente [74].

Estas últimas hipótesis recuerdan la importancia que tiene el conocimiento de la cronología de las fases de la curación de un tendón, para determinar el intervalo de tiempo óptimo en el cual deberían aplicarse este tipo de tratamientos regeneradores. Por lo tanto, se admite que la fase ideal para la realización de tratamiento con MSCs sería la fase reparadora, ya que existe la oportunidad de intervenir en la reorganización estructural de la lesión, lo que en términos de tiempo comprendería

entre los primeros 5-7 días y unos dos meses. Existe bastante consenso para no utilizar MSCs de médula ósea durante los primeros 10-15 días de la lesión ya que la hemorragia inicial que acompaña a la lesión todavía está presente [22][24][321]. A pesar del tipo de tratamiento seleccionado, un reposo extendido, con gradual incremento del ejercicio controlado, ha sido la piedra angular para lograr un buen resultado [176]. El ejercicio puede inducir un aumento de la capacidad de los tenocitos para reparar microdaños [322]. Cualquier proceso de daño en tendón o ligamento, se presume que puede exigir un mínimo de 6 meses de restricción de la actividad atlética para disponer del tiempo suficiente para sanar la lesión [14]. Sin embargo, los diferentes niveles de ejercicio puede ser necesarios para inducir adaptaciones beneficiosas en el almacenamiento de la energía en tendones [322]. (Ver tabla 2)

Tratamiento	Resultado	Referencias
Uso de BM-MSCs en caballo de polo con lesión crónica grave del TFDS, con cronicidad de cinco meses de duración.	Evaluaciones ecográficas mostraron una clara disminución del proceso patológico y una estructura tendinosa casi normal a las seis semanas.	Smith R. <i>et al.</i> (2003)
Implantación de MSCs autólogas en 168 caballos de deporte con lesión en TFDS.	Caballos retornaron a su entrenamiento habitual después de 48 semanas de rehabilitación. De estos, sólo reincidió el 18% contra un 56% reportado con terapias convencionales.	Smith R. (2008)
8 caballos con lesión del TFDS, fueron implantados con células embrionarias (ES) alogénicas y células mesenquimales autólogas.	En la zona inyectada del tendón, las ES presentaron un 60% de supervivencia a diferencia de las MSCs (< 5%). No hubo respuesta inmune en los caballos luego de la aplicación intralesional de las ES alogénicas.	Guest D. <i>et al.</i> (2010)
Estudio histológico e inmunohistoquímico en modelo de tendinitis inducida por colagenasa en 6 caballos. Evaluación del efecto de tres tratamientos; 1) BM-MSCs, 2) células mononucleadas de médula ósea y 3) placebo.	Regeneración del tejido lesionado experimentalmente en tratamiento con 1 y 2, mientras que en el tratamiento 3 sugiere una reparación cicatricial en el área dañada experimentalmente.	Crovace A. <i>et al.</i> (2010)
Estudio realizado en 219 caballos tratados con BM-MSCs y tratamiento convencional (seguimiento de casos clínicos durante 1 año).	51% de los caballos tratados volvieron a competir (31% grupo de referencia) y 30% recayó (56% grupo de referencia)	Dyson S.(2004), Butcher M. <i>et al.</i> (2007)
Fuente: Elaboración propia		

10.3. En osteoartritis (OA)

El caballo representa el modelo animal más grande disponible y probablemente la especie con mayor similitud al humano [323]. En comparación a los humanos, los caballos tienden a desarrollar disfunciones articulares en forma espontánea. Este es un aspecto importante para la OA clínicamente relevante, ya que podría haber diferencias

entre la OA que se desarrolla en forma natural y la que es inducida experimentalmente [324]. Además, el espesor del cartílago en la articulación del equino es de aproximadamente 1.75-2mm que lo hace comparable al espesor del cartílago de la rodilla en humanos que mide 2.2mm. A pesar de esto, las diferencias en el peso corporal de humanos y equinos podría resultar en una variación de cargas y propiedades biomecánicas en la articulación de la rodilla [323]. Frisbie *et al.* (2009) comparó diferentes modelos animales con respecto al espesor del cartílago en la articulación de la rodilla y observó que la del caballo es la más similar al humano, seguido de la cabra, oveja, perro y finalmente el conejo [325].

En la traumatología veterinaria en general, pero especialmente en perros y caballos, las patologías articulares desempeñan un papel importante. Las razones para el desarrollo de la OA aún no se entienden completamente. Se cree que la lesión, la edad y la genética son algunos de los factores de riesgo [11].

Los equinos que sufren enfermedades articulares representan una alta proporción de los casos registrados en la práctica veterinaria. Similar a los humanos, varias son presentaciones de enfermedades articulares, incluyendo enfermedades del desarrollo, lesiones agudas por accidentes y patologías crónicas [82]. El resultado final de estas presentaciones, a menudo es la osteoartritis (OA), una patología articular caracterizada por una pérdida progresiva de la matriz funcional del cartílago, sinovitis y una reacción variable del hueso subcondral. El cartílago articular hialino es un tejido altamente especializado y juega un rol fundamental en el progreso de la OA, debido a su limitada capacidad de reparación [15]. Esta incapacidad de reparar o incluso regenerar defectos articulares tiene como resultado la presencia de dolor y pérdida de movilidad de la articulación [325]. Además de estos efectos, la OA tiene un importante impacto económico en la industria equina. Cerca del 20% de los caballos Fina Sangre de Carrera de tres años es eliminado de competencia por problemas articulares [82].

Los tratamientos actuales incluyen una amplia gama de modalidades farmacológicas, no farmacológicas y quirúrgicas [326][327]. La evidencia que respalda la efectividad de estos tratamientos es variable [327]. Por esta razón el pronóstico para los pacientes que sufren de OA sigue siendo pobre. El objetivo de estos tratamientos apuntan a mantener el control del dolor, mejorar la función articular y la calidad de vida. Sin embargo, no existen terapias farmacológicas efectivas disponibles que alteren el curso de la patología [326]. Es por esto, que los esfuerzos en los últimos años han estado dirigidos a la evaluación de la eficacia de las terapias regenerativas para OA.

Consecuentemente, las estrategias de la medicina regenerativa como la terapia con MSCs en equinos, ha entrado en el foco de los veterinarios. Cuando son usadas las MSCs para tratar las patologías articulares, es importante distinguir la evolución de la patología para tratarla correctamente [82].

Actualmente, existen diferentes técnicas para el trasplante de MSCs en defectos articulares. Está la posibilidad de implantar las MSCs diferenciadas o indiferenciadas, con o sin una matriz sintética. Si la implantación es realizada sin una matriz, las células pueden ser suspendidas en varios fluidos e inyectada a ciegas o vía artroscopía. Además, estas pueden ser adheridas con un pegamento de fibrina para asegurar la fijación [328][329].

El grupo de investigadores dirigido por Agung *et al.* (2006), implantaron MSCs marcadas con fluorescencia dentro de la articulación de la rodilla de una rata, la cual presentaba una serie de tejidos lesionados, para evaluar la capacidad de las MSCs de moverse y adherirse al sitio de la lesión. Cuatro semanas luego de la aplicación, las MSCs fueron localizadas en algunos o incluso en la totalidad de los tejidos dañados dependiendo del número inicial de células inyectadas. Sin embargo, este estudio demostró que la inyección de un gran número de MSCs lleva a la formación de tejido cicatricial en la articulación, el cual podría tener efectos adversos en la regeneración del cartílago. Por lo tanto, determinar el número óptimo de células que debe ser inyectado es esencial para minimizar los problemas que se presentan en los tejidos de la articulación [256].

Para investigar el rol que juegan las MSCs en la reparación o regeneración de la articulación, fueron inyectadas vía intraarticular MSCs autólogas en la rodilla de un caprino luego de inducir OA. Este estudio concluyó que la inyección intraarticular de MSCs, estimula la regeneración de tejido y retarda la destrucción progresiva en este modelo de OA [257].

Para la reparación del cartílago, los condrocitos parecen ser el tipo de célula preferido. Es posible aislar condrocitos a partir de cartílago y expandirlos *in vitro*. Estas células pueden ser trasplantadas después en forma directa o criopreservadas. Seddighi *et al.* (2008) demostró que el cartílago sintético con condrocitos frescos contiene mayor cantidad de células y MEC que el cartílago sintético con células criopreservadas [330]. Los condrocitos pueden ser implantados directamente en forma de suspensión o sembrados en una matriz de colágeno para luego ser trasplantado en la lesión [331].

Sin embargo, debido a la escasa cantidad celular en los donantes, la corta vida media y la posibilidad de indiferenciación durante el cultivo es necesaria la búsqueda de alternativas de tipos celulares con potencial condrogénico. Actualmente, las MSCs están siendo evaluadas con diferentes enfoques terapéuticos en el tratamiento de OA [256][257].

Ha sido demostrado que las MSCs cuando son expuestas a TGF β , son capaces de diferenciarse en condrocitos, además de producir colágeno tipo II y proteoglicanos dos de los factores más importantes que participan en la reparación del cartílago [256][332][333]. Además Hegewald *et al.* (2004) determinó que las MSCs equinas en presencia de ácido hialurónico y líquido sinovial autólogo induce diferenciación condrogénica y producción de colágeno tipo II [334].

Debido a que en la OA existe un daño generalizado del cartílago articular, el enfoque del uso de MSCs en las articulaciones es la aplicación de una suspensión de células directamente dentro de la cavidad articular, siendo hoy en día, la vía de aplicación más usada en medicina veterinaria [335].

Ferris *et al.* (2009) informaron los resultados obtenidos en una evaluación clínica en caballos que presentaban enfermedad en forma natural, los cuales fueron tratados con BM-MSCs. De un total de 40 caballos que participaron en el estudio, el 72% regresó a competir. Cerca de la mitad de ellos recuperó el nivel de entrenamiento o incluso lo superaron. Además se demostró que la edad, sexo, raza y disciplina no estaban relacionados significativamente con los resultados obtenidos. Sólo la gravedad de la lesión, clasificada según el veterinario a cargo, estaba significativamente relacionada con el regreso al entrenamiento. Cuatro caballos que tenían daño del cartílago grave fueron incapaces de volver a rendimiento. Este estudio confirma los informes existentes de buena evolución clínica luego de realizado el tratamiento con BM-MSCs en lesiones articulares. Los resultados de este estudio respaldan los futuros ensayos para llevar a cabo el uso de MSCs en caballos [336].

En un estudio realizado por Ferris *et al.* (2009) informaron los resultados obtenidos en una evaluación clínica en caballos que presentaban enfermedad en forma natural, los cuales fueron tratados con BM-MSCs. De un total de 40 caballos que participaron en el estudio, el 72% regresó a competir. Cerca de la mitad de ellos recuperó el nivel de entrenamiento o incluso lo superaron. Además se demostró que la edad, sexo, raza y disciplina no estaban relacionados significativamente con los resultados obtenidos. Sólo

la gravedad de la lesión, clasificada según el veterinario a cargo, estaba significativamente relacionada con el regreso al entrenamiento. Cuatro caballos que tenían daño del cartílago grave fueron incapaces de volver a rendimiento. Este estudio confirma los informes existentes de buena evolución clínica luego de realizado el tratamiento con BM-MSCs en lesiones articulares. Los resultados de este estudio respaldan los futuros ensayos para llevar a cabo el uso de MSCs en caballos [336].

En un modelo de OA temprana equina se realizó una comparación entre BM-MSCs y células de la fracción vascular estromal de tejido adiposo (AD-SVF). Las dos preparaciones de MSCs fueron inyectadas directamente dentro de las articulaciones lesionadas 14 días después de inducir OA. Las articulaciones tratadas con BM-MSCs presentaron menos efusión de líquido sinovial y concentraciones menores de PGE₂ en comparación con las articulaciones tratadas con células AD-SVF. No fueron observadas diferencias en la histología o bioquímica del cartílago, análisis de líquido sinovial u otros parámetros clínicos [325]. Lo interesante en este estudio, es la disminución de concentraciones de PGE₂ en líquido sinovial en el tratamiento con BM-MSCs, esto es porque PGE₂ es un mecanismo de respuesta de las BM-MSCs para modular la respuesta inmune celular, ejerciendo efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores, como la supresión de la proliferación linfocitaria y la activación de linfocitos T [338][339].

Otros estudios preclínicos en modelos de OA donde fueron usadas otras especies como cabras, ovejas, conejos y ratas han demostrado la capacidad de las BM-MSCs de mejorar la regeneración del cartílago e incluso del menisco [257][329]. La combinación de estos estudios sugiere que las BM-MSCs tienen una doble función en el microambiente articular; modular la respuesta inmune local de los linfocitos T y potenciar la regeneración del tejido [24]. A largo plazo, los estudios que utilizan BM-MSCs en lesiones de cartílago articular tanto en pacientes de medicina veterinaria como humanos requieren demostrar la restauración de la función articular, la disminución de dolor articular y la durabilidad de las terapias basadas en el uso de BM-MSCs [24].

A la fecha, se desconoce si la regeneración de tejido después del implante de MSCs se origina desde las células trasplantadas, o si las células trasplantadas inician y dan soporte a las células locales para regenerar el tejido dañado [4]. Otro factor importante que puede contribuir al éxito terapéutico es la función antiinflamatoria que tienen las MSCs [340].

Aunque algunos estudios han tenido resultados prometedores, la eficacia de las MSCs en el tratamiento de OA sigue siendo controversial [256][257]. (Ver Tabla 3)

Tabla 3. Tratamientos con MSCs en Osteoartritis equina		
Tratamiento	Resultado	Referencias
BM-MSCs en lesión natural en 40 caballos	El 72% regreso a competir. Cerca del 50% recuperó el nivel de entrenamiento	Ferris <i>et al.</i> (2009)
Comparación de BM-MSCs autólogas en una matriz polimérica e implante de matriz polimérica, en lesión artificial	En este estudio fue observado que los implantes de MSCs en caballos mejoró la cicatrización temprana de las lesiones en cartílago (1 mes), pero la reparación a largo plazo (8 meses) no mejoró en comparación con las lesiones a las que no se les realizó tratamiento	Wilke <i>et al.</i> (2007)
Comparación entre BM-MSCs y AD-SVF	A los 14 días las articulaciones tratadas con BM-MSCs presentaron menos efusión de líquido sinovial y concentraciones menores de PGE ₂ en comparación con las articulaciones tratadas con células AD-SVF	Frisbie <i>et al.</i> (2009)
Fuente: Elaboración propia		

11. CONCLUSIONES

Los nuevos conocimientos moleculares sobre la fisiopatología de las lesiones de tendones y articulaciones del caballo y otras especies animales han permitido desarrollar nuevas estrategias para el desarrollo de tratamientos regenerativos de estas patologías.

A diferencia de los tratamientos convencionales, la utilización de células madre para una terapia de tendinitis y osteoartritis en equinos, es una buena oportunidad para que el organismo sea el encargado de regenerar y devolver las capacidades al tejido dañado. De esta forma, el tejido avanza hacia un estado funcional de óptimas características, dado por el restablecimiento de sus cualidades mecánicas y fisiológicas, disminuyendo las probabilidades de reincidencia de la lesión.

Las investigaciones clínicas de MSC en equinos han dado lugar a muchos resultados prometedores, sin embargo, se requiere una mayor cantidad de estudios *in vivo* e *in vitro* para comprender en profundidad la biología de las MSC equinas y los mecanismos fundamentales de los efectos regenerativos de las células, antes de extrapolar estas terapias en medicina humana. En este sentido, es importante destacar el beneficio que el equino ofrece como modelo animal en investigación como plataforma para probar tecnologías en desarrollo para humanos que por razones legales son difíciles de implementar en forma directa.

Sin embargo, una mayor investigación de las características básicas de las células madre, que lleve a definiciones más uniformes de las MSCs equinas parece ser de gran importancia. Una colaboración cercana entre veterinarios, científicos y clínicos, debiera abrir una nueva ventana al desarrollo de tecnologías en otros campos de la medicina veterinaria y acelerar la extrapolación de los resultados de las terapias celulares equinas hacia la medicina humana y viceversa.

En nuestro país, la terapia celular se está insertando como alternativa a los procedimientos tradicionales en la medicina veterinaria y es una buena opción para la solución de las lesiones frecuentes y recurrentes de caballos de deporte en sus distintas especialidades. Sin embargo, es importante complementar las terapias con MSC con programas de rehabilitación que incluyan reposo y fisioterapia para obtener resultados exitosos.

12. REFERENCIAS

- [1] J. Halper, B. Kim, A. Khan, J. H. Yoon, and P. O. E. Mueller, "Degenerative suspensory ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation.," *BMC Vet. Res.*, vol. 2, p. 12, 2006.
- [2] C. T. Thorpe, P. D. Clegg, and H. L. Birch, "A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk?," *Equine Vet. J.*, vol. 42, pp. 174–80, 2010.
- [3] C. W. McIlwraith, "Current concepts in equine degenerative joint disease.," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 180, pp. 239–50, 1982.
- [4] D. D. Frisbie, "Future directions in treatment of joint disease in horses," *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.*, vol. 21, pp. 713–724, 2005.
- [5] R. Smith and M. Schramme, "Tendon injury in the horse: current theories and therapies," *In Pract.*, vol. 25, pp. 529–539, 2003.
- [6] B. A. Dowling and A. J. Dart, "Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon," *Veterinary Journal*, vol. 170. pp. 184–192, 2005.
- [7] M. Paavola, P. Kannus, T. A. H. Järvinen, K. Khan, L. Józsa, and M. Järvinen, "Achilles tendinopathy.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 84-A, pp. 2062–2076, 2002.
- [8] C. W. McIlwraith and a Vachon, "Review of pathogenesis and treatment of degenerative joint disease.," *Equine Vet. J. Suppl.*, pp. 3–11, 1988.
- [9] S. J. Dyson, "Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000).," *Equine Vet. J.*, vol. 36, no. 5, pp. 415–9, Jul. 2004.
- [10] M. Ross and S. J. Dyson, "The suspensory apparatus," in *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.*, Elsevier Health Sciences, Ed. 2010.
- [11] L. R. Goodrich and A. J. Nixon, "Medical treatment of osteoarthritis in the horse - A review.," *Vet. J.*, vol. 171, pp. 51–69, 2006.
- [12] B. A. Dowling, A. J. Dart, D. R. Hodgson, and R. K. Smith, "Superficial digital flexor tendonitis in the horse.," *Equine Vet. J.*, vol. 32, no. 5, pp. 369–378, 2000.
- [13] S. Broeckx, M. Zimmerman, S. Crocetti, M. Suls, T. Mariën, S. J. Ferguson, K. Chiers, L. Duchateau, A. Franco-Obregón, K. Wuertz, and J. H. Spaas, "Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study.," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e85917, Jan. 2014.

- [14] L. A. Dahlgren, "Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries," *Clin. Tech. Equine Pract.*, vol. 6, pp. 168–173, 2007.
- [15] J. Fritz, C. Gaissmaier, B. Schewe, and K. Weise, "Cartilage repair in the knee joint. Biologische Knorpelrekonstruktion im Kniegelenk," *Unfallchirurg*, vol. 109, pp. 563–576, 2006.
- [16] A. E. Goodship, H. L. Birch, and A. M. Wilson, "The pathobiology and repair of tendon and ligament injury.," *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, vol. 10, pp. 323–349, 1994.
- [17] M. V. Souza, P. R. Van Weeren, H. T. M. Van Schie, and C. H. a Van de Lest, "Regional differences in biochemical, biomechanical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament," *Equine Vet. J.*, vol. 42, pp. 611–620, 2010.
- [18] S. L. Woo, M. B. Fisher, and A. J. Feola, "Contribution of biomechanics to management of ligament and tendon injuries," *Mol. Cell Biomech*, vol. 5, pp. 49–68, 2008.
- [19] Carmona J, "Tendinopatía del tendón flexor digital superficial y desmopatía del ligamento suspensorio en caballos : fisiopatología y terapias regenerativas Superficial digital flexor tendon tendinopathy and suspensory ligament desmopathy in horses : pathophysiology a," vol. 214, pp. 203–214, 2011.
- [20] K. K. Haussler, *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2003, pp. 501–508.
- [21] S. E. Gwilym, T. C. B. Pollard, and A. J. Carr, "Understanding pain in osteoarthritis.," *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 90, no. 3, pp. 280–7, Mar. 2008.
- [22] L. a Fortier and R. K. W. Smith, "Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses.," *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, vol. 24, no. 1, pp. 191–201, Apr. 2008.
- [23] D. D. Frisbie and M. C. Stewart, "Cell-based Therapies for Equine Joint Disease," *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, vol. 27. pp. 335–349, 2011.
- [24] L. Fortier and A. Travis, "Stem cells in veterinary medicine," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 2, pp. 1–6, 2011.
- [25] C. L. Insausti, M. Blanquer, P. Bleda, P. Iniesta, M. J. Majado, G. Castellanos, and J. M. Moraleda, "The amniotic membrane as a source of stem cells.," *Histol. Histopathol.*, vol. 25, no. 1, pp. 91–8, Jan. 2010.
- [26] A. Crovace, L. Lacitignola, G. Rossi, and E. Francioso, "Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon.," *Vet. Med. Int.*, vol. 2010, p. 250978, 2010.

- [27] H. a Awad, D. L. Butler, M. T. Harris, R. E. Ibrahim, Y. Wu, R. G. Young, S. Kadiyala, and G. P. Boivin, "In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 2, pp. 233–40, Aug. 2000.
- [28] H. S. Goodwin, A. R. Bicknese, S. N. Chien, B. D. Bogucki, C. O. Quinn, and D. A. Wall, "Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers.," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 7, pp. 581–588, 2001.
- [29] B. Norris and J. Kellam, "Soft-Tissue Injuries Associated With High-Energy Extremity Trauma: Principles of Management.," *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, vol. 5, pp. 37–46, 1997.
- [30] I. A. De Oleza, "La terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencias clínicas y bioquímicas que validan su utilización.," Universidad Autónoma de Barcelona, 2009.
- [31] A. P. Rumian, A. L. Wallace, and H. L. Birch, "Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features - A comparative study in an ovine model.," *J. Orthop. Res.*, vol. 25, pp. 458–464, 2007.
- [32] E. L. Batson, R. J. Paramour, T. J. Smith, H. L. Birch, J. C. Patterson-Kane, and A. E. Goodship, "Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions?," *Equine Vet. J.*, vol. 35, pp. 314–318, 2003.
- [33] C. C. Banos, A. H. Thomas, and C. K. Kuo, "Collagen fibrillogenesis in tendon development: Current models and regulation of fibril assembly," *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, vol. 84, pp. 228–244, 2008.
- [34] C. T. Thorpe, R. J. F. Stark, A. E. Goodship, and H. L. Birch, "Mechanical properties of the equine superficial digital flexor tendon relate to specific collagen cross-link levels," *Equine Vet. J.*, vol. 42, pp. 538–543, 2010.
- [35] J. H. C. Wang, "Mechanobiology of tendon.," *J. Biomech.*, vol. 39, pp. 1563–1582, 2006.
- [36] H. Aslan, N. Kimelman-bleich, G. Pelled, and D. Gazit, "Review series Molecular targets for tendon neoformation," vol. 118, no. 2, 2008.
- [37] A. Johnson, R. Smith, T. Saxne, M. Hickery, and D. Heinegard, "Fibronectin fragments cause release and degradation of collagen-binding molecules from equine explant cultures," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 12, pp. 149–159, 2004.
- [38] Y. Hosaka, S. Ozoe, R. Kirisawa, H. Ueda, K. Takehana, and M. Yamaguchi, "Effect of heat on synthesis of gelatinases and pro-inflammatory cytokines in equine tendinocytes.," *Biomed. Res.*, vol. 27, pp. 233–241, 2006.

- [39] M. Lavagnino and S. P. Arnoczky, "In vitro alterations in cytoskeletal tensional homeostasis control gene expression in tendon cells," *J. Orthop. Res.*, vol. 23, pp. 1211–1218, 2005.
- [40] M. Lavagnino, S. P. Arnoczky, M. Egerbacher, K. L. Gardner, and M. E. Burns, "Isolated fibrillar damage in tendons stimulates local collagenase mRNA expression and protein synthesis.," *J. Biomech.*, vol. 39, pp. 2355–62, 2006.
- [41] K. Gardner, S. P. Arnoczky, O. Caballero, and M. Lavagnino, "The effect of stress-deprivation and cyclic loading on the TIMP/MMP ratio in tendon cells: an in vitro experimental study.," *Disabil. Rehabil.*, vol. 30, pp. 1523–9, 2008.
- [42] P. Danielson, "Reviving the 'biochemical' hypothesis for tendinopathy: new findings suggest the involvement of locally produced signal substances.," *Br. J. Sports Med.*, vol. 43, pp. 265–268, 2009.
- [43] J. Hyman and S. A. Rodeo, "Injury and repair of tendons and ligaments.," *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, vol. 11, pp. 267–288, v, 2000.
- [44] C. McIllwraith, "Lameness in the young horse: osteochondrosis," in *Adams and Stashak's Lameness in Horses*, 2011, pp. 1155–1164.
- [45] I. F. Williams, A. Heaton, and K. G. McCullagh, "Cell morphology and collagen types in equine tendon scar.," *Res. Vet. Sci.*, vol. 28, pp. 302–310, 1980.
- [46] R. K. W. Smith, M. Gerard, B. Dowling, A. J. Dart, H. L. Birch, and A. E. Goodship, "Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons.," *Equine Vet. J. Suppl.*, pp. 241–244, 2002.
- [47] K. A. Hildebrand, F. Jia, and S. L. Y. Woo, "Response of donor and recipient cells after transplantation of cells to the ligament and tendon," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 58, pp. 34–38, 2002.
- [48] J. C. Patterson-Kane and E. C. Firth, "The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses," *Veterinary Journal*, vol. 181, pp. 79–89, 2009.
- [49] S. Violini, P. Ramelli, L. F. Pisani, C. Gorni, and P. Mariani, "Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12.," *BMC Cell Biol.*, vol. 10, p. 29, 2009.
- [50] D. J. Herthel, "Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components," vol. 47, pp. 319–321, 2001.
- [51] Y. Bi, D. Ehirchiou, T. M. Kilts, C. A. Inkson, M. C. Embree, W. Sonoyama, L. Li, A. I. Leet, B.-M. Seo, L. Zhang, S. Shi, and M. F. Young, "Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche.," *Nat. Med.*, vol. 13, pp. 1219–1227, 2007.

- [52] B. Henderson and R. Pettipher, "The sinovial lining cell: Biology and pathobiology," *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 15, pp. 1–32, 1985.
- [53] J. Levick, "Hypoxia and acidosis in chronic inflammatory arthritis; relation to vascular supply and dynamic effusion pressure," *J Rheumatol*, vol. 17, pp. 579–582, 1998.
- [54] S. A. Johnston, "Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology.," *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, vol. 27, pp. 699–723, 1997.
- [55] C. E. Kawcak, C. W. McIlwraith, R. W. Norrdin, R. D. Park, and P. S. Steyn, "Clinical effects of exercise on subchondral bone of carpal and metacarpophalangeal joints in horses.," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 61, pp. 1252–1258, 2000.
- [56] R. Todhunter, "Anatomy and physiology of synovial joints," in *Joint disease in the horse*, C. McIlwraith and G. Trotter, Eds. Philadelphia: WB Saunders, 1996.
- [57] J. Caron, "Osteoarthritis," in *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*, M. Ross and S. J. Dyson, Eds. Philadelphia: WB Saunders, 2003.
- [58] C. McIlwraith, "General pathobiology of the joint and response to injury," in *Joint disease in the horse*, C. McIlwraith and G. Trotter, Eds. Philadelphia: WB Saunders, 1996.
- [59] M. Popot, Y. Bonnaire, and J. Guechot, "Hyaluronan in horses: physiological production rate, plasma and synovial fluid concentrations in control conditions and following sodium hyaluronate administration," *Equine Vet. J.*, vol. 36, no. 6, pp. 482–487, 2004.
- [60] D. D. Frisbie, "Synovial joint biology and pathobiology," in *Equine Surgery*, 3rd ed., J. Auer and J. Stick, Eds. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, pp. 1036–1055.
- [61] C. E. Kawcak, C. W. McIlwraith, R. W. Norrdin, R. D. Park, and S. P. James, "The role of subchondral bone in joint disease: a review.," *Equine Vet. J.*, vol. 33, pp. 120–126, 2001.
- [62] H. Dumond, N. Presle, B. Terlain, D. Mainard, D. Loeuille, P. Netter, and P. Pottie, "Evidence for a Key Role of Leptin in Osteoarthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 48, pp. 3118–3129, 2003.
- [63] P. R. Buff, a. C. Dodds, C. D. Morrison, N. C. Whitley, E. L. McFadin, J. a. Daniel, J. Djiane, and D. H. Keisler, "Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition," *J. Anim. Sci.*, vol. 80, pp. 2942–2948, 2002.
- [64] K. Kühn, D. D. D'Lima, S. Hashimoto, and M. Lotz, "Cell death in cartilage," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 12, pp. 1–16, 2004.

- [65] J. A. Martin, T. D. Brown, A. D. Heiner, and J. A. Buckwalter, "Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 427, pp. 96–103, 2004.
- [66] L. R. Goodrich, C. Hidaka, P. D. Robbins, C. H. Evans, and a J. Nixon, "Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model.," *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 89, pp. 672–685, 2007.
- [67] J. M. Denoix, "The equine distal limb: Atlas of clinical anatomy and comparative imaging," *CRC Press*, 2000.
- [68] A. F. Steinert, S. C. Ghivizzani, A. Rethwilm, R. S. Tuan, C. H. Evans, and U. Nöth, "Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 9, p. 213, 2007.
- [69] A. Asheim, "Surgical treatment of tendon injuries in the horse," *J Am Vet Med Assoc*, vol. 145, pp. 447–451, 1964.
- [70] T. G. Koch, L. C. Berg, and D. H. Betts, "Current and future regenerative medicine — Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine," *Can Vet J*, vol. 50, no. February, pp. 155–165, 2009.
- [71] C. M. Marr, S. Love, J. S. Boyd, and Q. McKellar, "Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses.," *Vet. Rec.*, vol. 132, pp. 476–479, 1993.
- [72] L. E. Richardson, J. Dudhia, P. D. Clegg, and R. Smith, "Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury.," *Trends Biotechnol.*, vol. 25, no. 9, pp. 409–16, Sep. 2007.
- [73] A. G. L. Alves, A. A. Stewart, J. Dudhia, Y. Kasashima, A. E. Goodship, and R. K. W. Smith, "Cell-based Therapies for Tendon and Ligament Injuries," *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, vol. 27, pp. 315–333, 2011.
- [74] P. D. Clegg, S. Strassburg, and R. K. Smith, "Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons," in *International Journal of Experimental Pathology*, 2007, vol. 88, pp. 227–235.
- [75] D. D. Carrade, S. D. Owens, L. D. Galuppo, M. a Vidal, G. L. Ferraro, F. Librach, S. Buerchler, M. S. Friedman, N. J. Walker, and D. L. Borjesson, "Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses.," *Cytotherapy*, vol. 13, no. 4, pp. 419–30, Apr. 2011.
- [76] S. E. Taylor, R. K. W. Smith, and P. D. Clegg, "Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?," *Equine Vet. J.*, vol. 39, pp. 172–180, 2007.

- [77] N. Zaidi and A. J. Nixon, "Stem cell therapy in bone repair and regeneration," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, vol. 1117, pp. 62–72.
- [78] R. Langer and P. Joseph, "Tissue Engineering," *Science (80-.)*, vol. 260, pp. 920–926, 1993.
- [79] R. Smith, "Tendon and ligament physiology," in *Equine Sports Medicine and Surgery*, Second., W. S. Company, Ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2004, pp. 167–188.
- [80] N. Juncosa-Melvin, G. P. Boivin, C. Gooch, M. T. Galloway, J. R. West, M. G. Dunn, and D. L. Butler, "The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair.," *Tissue Eng.*, vol. 12, pp. 369–79, 2006.
- [81] P. D. Clegg, "Musculoskeletal disease and injury, now and in the future. Part 2: Tendon and ligament injuries.," *Equine Vet. J.*, vol. 44, pp. 371–5, 2012.
- [82] W. Brehm, J. Burk, U. Delling, C. Gittel, and I. Ribitsch, "Stem cell-based tissue engineering in veterinary orthopaedics.," *Cell Tissue Res.*, pp. 677–688, Jan. 2012.
- [83] M. a Vidal, G. E. Kilroy, J. R. Johnson, M. J. Lopez, R. M. Moore, and J. M. Gimble, "Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity.," *Vet. Surg.*, vol. 35, pp. 601–10, 2006.
- [84] C. Chang and J. Burdick, "Engineering cartilage tissue," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 2, pp. 243–262, 2008.
- [85] D. J. Murphy and A. J. Nixon, "Biochemical and site-specific effects of insulin-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons," *Am J Vet Res*, vol. 58, pp. 103–109, 1997.
- [86] T. McCarrel and L. Fortier, "Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression," *J. Orthop. Res.*, vol. 27, pp. 1033–1042, 2009.
- [87] D. G. Hickey, S. R. Frenkel, and P. E. Di Cesare, "Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair," *Am J Orthop*, vol. 32, pp. 70–76, 2003.
- [88] P. C. Yaeger, T. L. Masi, J. L. de Ortiz, F. Binette, R. Tubo, and J. M. McPherson, "Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes.," *Exp. Cell Res.*, vol. 237, pp. 318–325, 1997.
- [89] L. a. Dahlgren, M. C. H. Van Der Meulen, J. E. a Bertram, G. S. Starrak, and A. J. Nixon, "Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis," *J. Orthop. Res.*, vol. 20, pp. 910–919, 2002.

- [90] L. A. Dahlgren, H. O. Mohammed, and A. J. Nixon, "Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions.," *J. Orthop. Res.*, vol. 23, pp. 84–92, 2005.
- [91] T. Molloy, Y. Wang, and G. Murrell, "The roles of growth factors in tendon and ligament healing.," *Sports Med.*, vol. 33, pp. 381–394, 2003.
- [92] S. A. Goodman, S. A. May, D. Heinegård, and R. K. W. Smith, "Tenocyte response to cyclical strain and transforming growth factor beta is dependent upon age and site of origin.," *Biorheology*, vol. 41, pp. 613–628, 2004.
- [93] A. Van Miert, "Present concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines.," *Vet. Res. Commun.*, vol. 26, pp. 111–126, 2002.
- [94] M. B. Klein, N. Yalamanchi, H. Pham, M. T. Longaker, and J. Chang, "Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production," *J. Hand Surg. Am.*, vol. 27, pp. 615–620, 2002.
- [95] Y. Hosaka, R. Kirisawa, E. Yamamoto, H. Ueda, H. Iwai, and K. Takehana, "Localization of cytokines in tendinocytes of the superficial digital flexor tendon in the horse.," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 64, pp. 945–947, 2002.
- [96] X. T. Wang, P. Y. Liu, and J. B. Tang, "Tendon healing in vitro: modification of tenocytes with exogenous vascular endothelial growth factor gene increases expression of transforming growth factor beta but minimally affects expression of collagen genes," *J Hand Surg Am*, vol. 30, pp. 222–229, 2005.
- [97] M. B. Schmidt, E. H. Chen, and S. E. Lynch, "A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 14, pp. 403–412, 2006.
- [98] L. A. Fortier and B. J. Miller, "Signaling through the small G-protein Cdc42 is involved in insulin-like growth factor-I resistance in aging articular chondrocytes.," *J. Orthop. Res.*, vol. 24, pp. 1765–1772, 2006.
- [99] J. a Martin, S. M. Ellerbroek, and J. a Buckwalter, "Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins.," *J. Orthop. Res.*, vol. 15, pp. 491–498, 1997.
- [100] W. B. Van den Berg, P. M. Van der Kraan, A. Scharstuhl, and H. M. Van Beuningen, "Growth factors and cartilage repair.," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, pp. S244–50, 2001.
- [101] J. J. Smith, M. W. Ross, and R. K. W. Smith, "Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro," *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, vol. 19, pp. 43–47, 2006.
- [102] L. V Schnabel, H. O. Sonea, M. S. Jacobson, and L. a Fortier, "Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures.," *Equine Vet. J.*, vol. 40, pp. 260–265, 2008.

- [103] L. V. Schnabel, H. O. Mohammed, B. J. Miller, W. G. McDermott, M. S. Jacobson, K. S. Santangelo, and L. a. Fortier, "Platelet Rich Plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons," *J. Orthop. Res.*, vol. 25, pp. 230–240, 2007.
- [104] K. Akeda, H. S. An, M. Okuma, M. Attawia, K. Miyamoto, E. J. M. a Thonar, M. E. Lenz, R. L. Sah, and K. Masuda, "Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 14, pp. 1272–1280, 2006.
- [105] M. Waselau, W. W. Sutter, R. L. Genovese, and A. L. Bertone, "Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses.," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 232, pp. 1515–1520, 2008.
- [106] C. M. Kolf, E. Cho, and R. S. Tuan, "Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 9, p. 204, 2007.
- [107] F. M. Watt and B. L. Hogan, "Out of Eden: stem cells and their niches.," *Science*, vol. 287, pp. 1427–1430, 2000.
- [108] E. Fuchs, T. Tumbar, and G. Guasch, "Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche," *Cell*, vol. 116. pp. 769–778, 2004.
- [109] A. D. Whetton and G. J. Graham, "Homing and mobilization in the stem cell niche," *Trends in Cell Biology*, vol. 9. pp. 233–238, 1999.
- [110] D. T. Scadden, "The stem-cell niche as an entity of action.," *Nature*, vol. 441, pp. 1075–1079, 2006.
- [111] C. Blanpain, W. E. Lowry, A. Geoghegan, L. Polak, and E. Fuchs, "Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche," *Cell*, vol. 118, pp. 635–648, 2004.
- [112] A. Li, P. J. Simmons, and P. Kaur, "Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, pp. 3902–3907, 1998.
- [113] C. S. Potten and C. Booth, "Keratinocyte stem cells: A commentary," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 119. pp. 888–899, 2002.
- [114] M. C. Arufe, A. De la Fuente, I. Fuentes, F. J. De Toro, and F. J. Blanco, "Umbilical cord as a mesenchymal stem cell source for treating joint pathologies.," *World J. Orthop.*, vol. 2, no. 6, pp. 43–50, Jun. 2011.
- [115] T. G. Koch, L. C. Berg, and D. H. Betts, "Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine," *Can Vet J*, vol. 49, no. 1009–1017, 2008.
- [116] N. D. Spencer, J. M. Gimble, and M. J. Lopez, "Mesenchymal stromal cells: past, present, and future," *Vet Surg*, vol. 40, pp. 129–139, 2011.

- [117] M. R. Alison, R. Poulsom, S. Forbes, and N. a Wright, "An introduction to stem cells.," *J. Pathol.*, vol. 197, no. 4, pp. 419–23, Jul. 2002.
- [118] A. M. Wobus and K. R. Boheler, "Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy.," *Physiol. Rev.*, vol. 85, pp. 635–678, 2005.
- [119] K.-H. Grinnemo, C. Sylvén, O. Hovatta, G. Dellgren, and M. Corbascio, "Immunogenicity of human embryonic stem cells.," *Cell Tissue Res.*, vol. 331, pp. 67–78, 2008.
- [120] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors," *Cell*, vol. 131, pp. 861–872, 2007.
- [121] J. Gimble and F. Guilak, "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential.," *Cytotherapy*, vol. 5, pp. 362–369, 2003.
- [122] V. Planat-Benard, J.-S. Silvestre, B. Cousin, M. André, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Pénicaud, and L. Casteilla, "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives.," *Circulation*, vol. 109, pp. 656–663, 2004.
- [123] C. Wan, Q. He, and G. Li, "Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model," *J. Orthop. Res.*, vol. 24, pp. 610–618, 2006.
- [124] L. da Silva Meirelles, P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi, "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.," *J. Cell Sci.*, vol. 119, pp. 2204–2213, 2006.
- [125] Y. Hu, L. Liao, Q. Wang, L. Ma, G. Ma, X. Jiang, and R. C. Zhao, "Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas.," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 141, pp. 342–349, 2003.
- [126] S. Díaz-Prado, E. Muiños-López, T. Hermida-Gómez, C. Cicione, M. E. Rendal-Vázquez, I. Fuentes-Boquete, F. J. de Toro, and F. J. Blanco, "Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine.," *Differentiation.*, vol. 81, no. 3, pp. 162–171, Mar. 2011.
- [127] S. Pacini, S. Spinabella, L. Trombi, R. Fazzi, S. Galimberti, F. Dini, F. Carlucci, and M. Petrini, "Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses.," *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 12, pp. 2949–55, Dec. 2007.
- [128] R. Secunda, R. Vennila, a M. Mohanashankar, M. Rajasundari, S. Jeswanth, and R. Surendran, "Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study.," *Cytotechnology*, May 2014.

- [129] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.," *Science*, vol. 284, pp. 143–147, 1999.
- [130] K. Sago, S. Tamahara, M. Tomihari, N. Matsuki, Y. Asahara, A. Takei, M. Bonkobara, T. Washizu, and K. Ono, "In vitro differentiation of canine celiac adipose tissue-derived stromal cells into neuronal cells.," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 70, pp. 353–357, 2008.
- [131] K. Ko, N. Tapia, G. Wu, J. B. Kim, M. J. A. Bravo, P. Sasse, T. Glaser, D. Ruau, D. W. Han, B. Greber, K. Hausdörfer, V. Sebastiano, M. Stehling, B. K. Fleischmann, O. Brüstle, M. Zenke, and H. R. Schöler, "Induction of Pluripotency in Adult Unipotent Germline Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 5, pp. 87–96, 2009.
- [132] J. Czyz, C. Wiese, A. Rolletschek, P. Blyszczuk, M. Cross, and A. M. Wobus, "Potential of embryonic and adult stem cells in vitro," *Biological Chemistry*, vol. 384, pp. 1391–1409, 2003.
- [133] J. a. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts," *Science (80-.)*, vol. 282, pp. 1145–1147, 1998.
- [134] K.-H. Grinnemo, M. Kumagai-Braesch, A. Månsson-Broberg, H. Skottman, X. Hao, A. Siddiqui, A. Andersson, A.-M. Strömberg, R. Lahesmaa, O. Hovatta, C. Sylven, M. Corbascio, and G. Dellgren, "Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings.," *Reprod. Biomed. Online*, vol. 13, pp. 712–724, 2006.
- [135] P. S. Knoepfler, "Deconstructing stem cell tumorigenicity: A roadmap to safe regenerative medicine," *Stem Cells*, vol. 27, pp. 1050–1056, 2009.
- [136] I. Hyun, "Review series The bioethics of stem cell research and therapy," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, pp. 71–75, 2010.
- [137] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin, and J. A. Thomson, "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.," *Science*, vol. 318, pp. 1917–1920, 2007.
- [138] J. B. Mitchell, K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z. E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, and J. M. Gimble, "Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers.," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 376–385, 2006.
- [139] P. Bianco, P. G. Robey, and P. J. Simmons, "Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays," *Cell Stem Cell*, vol. 2, pp. 313–319, 2008.
- [140] K. McFarlin, X. Gao, Y. B. Liu, D. S. Dulchavsky, D. Kwon, A. S. Arbab, M. Bansal, Y. Li, M. Chopp, S. a Dulchavsky, and S. C. Gautam, "Bone marrow-

derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat.," *Wound Repair Regen.*, vol. 14, pp. 471–8, 2006.

- [141] W. Wagner, F. Wein, A. Seckinger, M. Frankhauser, U. Wirkner, U. Krause, J. Blake, C. Schwager, V. Eckstein, W. Ansorge, and A. D. Ho, "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood," *Exp Hematol*, vol. 33, pp. 1402–1416, 2005.
- [142] P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick, "Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells," *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, pp. 4279–4295, 2002.
- [143] P. A. 2004 Bianchi de Di Risio C, F Callero, A Hidalgo, "Células Mesenquimales De Medula Ósea, Diferenciación Y Potencial Reemplazo Neuronal," *Medicina (B. Aires).*, vol. Vol. 64., no. N° 6, pp. 543–549, 2004.
- [144] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, a Keating, D. Prockop, and E. Horwitz, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–7, Jan. 2006.
- [145] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina, "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.," *Cell Tissue Kinet.*, vol. 3, pp. 393–403, 1970.
- [146] A. J. Friedenstein, A. A. Ivanov-Smolenski, R. K. Chajlakjan, U. F. Gorskaya, A. I. Kuralesova, N. W. Latzinik, and U. W. Gerasimow, "Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants.," *Exp. Hematol.*, vol. 6, pp. 440–444, 1978.
- [147] M. Owen, "Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system.," in *Bone and Mineral Research*, vol. 3, 1985, pp. 1–25.
- [148] M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla, C. Chen, M. Corselli, T. S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.-N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B. M. Deasy, S. Badylak, H. Bühring, J.-P. Jacobino, L. Lazzari, J. Huard, and B. Peault, "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs.," *Cell Stem Cell*, vol. 3, pp. 301–13, 2008.
- [149] M. Dhar, N. Neilsen, K. Beatty, S. Eaker, H. Adair, and D. Geiser, "Equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: Isolation, identification, trilineage differentiation and effect of hyperbaric oxygen treatment," *Equine Vet. J.*, vol. 44, pp. 600–605, 2012.
- [150] S. Passeri, F. Nocchi, R. Lamanna, S. Lapi, V. Miragliotta, E. Giannessi, F. Abramo, M. R. Stornelli, M. Matarazzo, D. Plenteda, P. Urciuoli, F. Scatena, and A. Coli, "Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs).," *Cell Biol. Int.*, vol. 33, no. 1, pp. 100–5, Jan. 2009.

- [151] N. Beyer Nardi and L. Da Silva Meirelles, "Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization," *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 174, pp. 249–282, 2006.
- [152] I. L. Weissman, "Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities," *Science*, vol. 287. pp. 1442–1446, 2000.
- [153] V. Mundra, I. C. Gerling, and R. I. Mahato, "Mesenchymal stem cell-based therapy," *Mol. Pharm.*, vol. 10, pp. 77–89, 2013.
- [154] A. I. Caplan, "Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 213, pp. 341–7, 2007.
- [155] Y. Chen, J. Z. Shao, L. X. Xiang, X. J. Dong, and G. R. Zhang, "Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 40. pp. 815–820, 2008.
- [156] E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, and A. Keating, "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 7, pp. 393–395, 2005.
- [157] P. Hernández Ramírez, "Medicina regenerativa II. Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular," *Rev. Cuba. Hematol. Inmunol. y Hemoter.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–17, 2006.
- [158] A. Caplan, "Mesenchymal stem cells.," *J. Orthop. Res.*, vol. 9, pp. 641–50, 1991.
- [159] R. F. Pereira, K. W. Halford, M. D. O'Hara, D. B. Leeper, B. P. Sokolov, M. D. Pollard, O. Bagasra, and D. J. Prockop, "Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, pp. 4857–4861, 1995.
- [160] R. F. Pereira, M. D. O'Hara, A. V Laptev, K. W. Halford, M. D. Pollard, R. Class, D. Simon, K. Livezey, and D. J. Prockop, "Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, pp. 1142–1147, 1998.
- [161] E. M. Horwitz, P. L. Gordon, W. K. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul, and T. Hofmann, "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, p. 8932, 2002.
- [162] E. M. Horwitz, D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz, and M. K. Brenner, "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta.," *Nat. Med.*, vol. 5, pp. 309–313, 1999.

- [163] J. S. Odorico, D. S. Kaufman, and J. a Thomson, "Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines.," *Stem Cells*, vol. 19, pp. 193–204, 2001.
- [164] P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, and M. H. Hedrick, "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.," *Tissue Eng.*, vol. 7, pp. 211–228, 2001.
- [165] Fabio Marongiu, Roberto Gramignoli, Qian Sun, Veysel Tahan, Toshio Miki, Kenneth Dorko, E. Ellis, and and S. C. Strom, "Isolation of Amniotic Mesenchymal Stem Cells," *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.*, 2010.
- [166] Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada, and C. M. Verfaillie, "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.," *Nature*, vol. 418, pp. 41–49, 2002.
- [167] H. Yoshimura, T. Muneta, A. Nimura, A. Yokoyama, H. Koga, and I. Sekiya, "Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle," *Cell Tissue Res.*, vol. 327, pp. 449–462, 2007.
- [168] M. a Vidal, N. J. Walker, E. Napoli, and D. L. Borjesson, "Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue.," Jan. 2012.
- [169] L. A. Fortier, A. J. Nixon, J. Williams, and C. S. Cable, "Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 59, pp. 1182–1187, 1998.
- [170] P. a Conget and J. J. Minguell, "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 181, pp. 67–73, 1999.
- [171] D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, F. Limana, I. Jakoniuk, F. Quaini, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa, "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, pp. 10344–10349, 2001.
- [172] M. Kassem, M. Kristiansen, and B. M. Abdallah, "Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy.," *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 95, pp. 209–214, 2004.
- [173] D. G. Phinney, "Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: Clues to their therapeutic efficacy," *Cell Cycle*, vol. 6. pp. 2884–2889, 2007.
- [174] P. A. Conget and J. J. Minguell, "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 181, pp. 67–73, 1999.

- [175] J. Rehman, D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine, and K. L. March, "Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells," *Circulation*, vol. 109, pp. 1292–1298, 2004.
- [176] A. J. Nixon, L. A. Dahlgren, J. L. Haupt, A. E. Yeager, and D. L. Ward, "Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis," vol. 69, no. 7, 2008.
- [177] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, and K. Bieback, "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 1294–301, 2006.
- [178] W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U. Chung, Y. Yamasaki, and K. Kataoka, "3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 2705–2715, 2009.
- [179] H. Mizuno, "Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration: Ten Years of Research and a Literature Review," *Journal of Nippon Medical School*, vol. 76, pp. 56–66, 2009.
- [180] S. P. Bruder, N. Jaiswal, and S. E. Haynesworth, "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation," *J. Cell. Biochem.*, vol. 64, pp. 278–294, 1997.
- [181] Y. Liu, D. S. Dulchavsky, X. Gao, D. Kwon, M. Chopp, S. Dulchavsky, and S. C. Gautam, "Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production.," *J. Surg. Res.*, vol. 136, pp. 336–341, 2006.
- [182] P. Niemeyer, K. Fechner, S. Milz, W. Richter, N. P. Suedkamp, A. T. Mehlhorn, S. Pearce, and P. Kasten, "Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3572–9, May 2010.
- [183] L. Xie, N. Zhang, A. Marsano, G. Vunjak-Novakovic, Y. Zhang, and M. J. Lopez, "In vitro mesenchymal trilineage differentiation and extracellular matrix production by adipose and bone marrow derived adult equine multipotent stromal cells on a collagen scaffold.," *Stem Cell Rev.*, vol. 9, no. 6, pp. 858–72, Dec. 2013.
- [184] M. Neupane, C.-C. Chang, M. Kiupel, and V. Yuzbasiyan-Gurkan, "Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells.," *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, pp. 1007–1015, 2008.
- [185] H. Tapp, E. N. Hanley Jr., J. C. Patt, and H. E. Gruber, "Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair," *Exp Biol Med*, vol. 234, pp. 1–9, 2009.

- [186] R. Taléns-Visconti, a. Bonora, R. Jover, V. Mirabet, F. Carbonell, J. V. Castell, and M. J. Gómez-Lechón, "Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage," *Toxicol. Vitro.*, vol. 21, pp. 324–329, 2007.
- [187] M. A. Vidal, G. E. Kilroy, M. J. Lopez, J. R. Johnson, R. M. Moore, and J. M. Gimble, "Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells," *Vet. Surg.*, vol. 36, pp. 613–622, 2007.
- [188] M. J. Oedayrajsingh-Varma, S. M. van Ham, M. Knippenberg, M. N. Helder, J. Klein-Nulend, T. E. Schouten, M. J. P. F. Ritt, and F. J. van Milligen, "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure.," *Cytotherapy*, vol. 8, pp. 166–177, 2006.
- [189] S. A. Kuznetsov, M. H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco, and P. G. Robey, "Circulating skeletal stem cells.," *J. Cell Biol.*, vol. 153, pp. 1133–40, 2001.
- [190] C. A. Roufosse, N. C. Direkze, W. R. Otto, and N. A. Wright, "Circulating mesenchymal stem cells," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, pp. 585–597, 2004.
- [191] S. Giovannini, W. Brehm, P. Mainil-Varlet, and D. Nestic, "Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells," *Differentiation*, vol. 76, pp. 118–129, 2008.
- [192] J. Koerner, D. Nestic, J. D. Romero, W. Brehm, P. Mainil-Varlet, and S. P. Grogan, "Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells.," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 1613–9, 2006.
- [193] H. Koga, T. Muneta, Y.-J. Ju, T. Nagase, A. Nimura, T. Mochizuki, S. Ichinose, K. von der Mark, and I. Sekiya, "Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration.," *Stem Cells*, vol. 25, pp. 689–696, 2007.
- [194] K. Nishimura, L. a. Solchaga, A. I. Caplan, J. U. Yoo, V. M. Goldberg, and B. Johnstone, "Chondroprogenitor cells of synovial tissue," *Arthritis Rheum.*, vol. 42, pp. 2631–2637, 1999.
- [195] M. Pei, F. He, and G. Vunjak-Novakovic, "Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis.," *Differentiation.*, vol. 76, pp. 1044–56, 2008.
- [196] N. Shintani and E. B. Hunziker, "Chondrogenic differentiation of bovine synovium: bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor beta1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue.," *Arthritis Rheum.*, vol. 56, pp. 1869–1879, 2007.
- [197] F. Djouad, C. Bony, T. Häupl, G. Uzé, N. Lahlou, P. Louis-Pence, F. Apparailly, F. Canovas, T. Rème, J. Sany, C. Jorgensen, and D. Noël, "Transcriptional profiles

- discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 7, pp. R1304–R1315, 2005.
- [198] C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, and F. P. Luyten, "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane.," *Arthritis Rheum.*, vol. 44, pp. 1928–1942, 2001.
- [199] T. Kurth, E. Hedbom, N. Shintani, M. Sugimoto, F. H. Chen, M. Haspl, S. Martinovic, and E. B. Hunziker, "Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate.," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 15, pp. 1178–1189, 2007.
- [200] M. C. Arufe, M. C. De La Fuente, I. Fuentes-Boquete, F. J. De Toro, and F. J. Blanco, "Differentiation of synovial CD-105+ human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 108, pp. 145–155, 2009.
- [201] S. Ichinose, T. Muneta, H. Koga, Y. Segawa, M. Tagami, K. Tsuji, and I. Sekiya, "Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes.," *Lab. Invest.*, vol. 90, pp. 210–221, 2010.
- [202] G. P. Dowthwaite, J. C. Bishop, S. N. Redman, I. M. Khan, P. Rooney, D. J. R. Evans, L. Haughton, Z. Bayram, S. Boyer, B. Thomson, M. S. Wolfe, and C. W. Archer, "The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population.," *J. Cell Sci.*, vol. 117, pp. 889–897, 2004.
- [203] S. Alsalameh, R. Amin, T. Gemba, and M. Lotz, "Identification of Mesenchymal Progenitor Cells in Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage.," *Arthritis Rheum.*, vol. 50, pp. 1522–1532, 2004.
- [204] H. Koga, T. Muneta, T. Nagase, A. Nimura, Y. J. Ju, T. Mochizuki, and I. Sekiya, "Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: Suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit.," *Cell Tissue Res.*, vol. 333, pp. 207–215, 2008.
- [205] T. Mochizuki, T. Muneta, Y. Sakaguchi, A. Nimura, A. Yokoyama, H. Koga, and I. Sekiya, "Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: Distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans.," *Arthritis Rheum.*, vol. 54, pp. 843–853, 2006.
- [206] Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita, and T. Muneta, "Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source.," *Arthritis Rheum.*, vol. 52, pp. 2521–2529, 2005.
- [207] E. M. Schuh, M. S. Friedman, D. D. Carrade, J. Li, D. Heeke, S. M. Oyserman, L. D. Galuppo, D. J. Lara, N. J. Walker, G. L. Ferraro, S. D. Owens, and D. L. Borjesson, "Identification of variables that optimize isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from equine umbilical-cord blood.," *American journal of veterinary research*, vol. 70, pp. 1526–35, 2009.

- [208] L. Berg, T. Koch, T. Heerkens, K. Bessonov, P. Thomsen, and D. Betts, "Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood.," *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, vol. 22, pp. 363–370, 2009.
- [209] S. M. Hoynowski, M. M. Fry, B. M. Gardner, M. T. Leming, J. R. Tucker, L. Black, T. Sand, and K. E. Mitchell, "Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 362, no. 2, pp. 347–53, Oct. 2007.
- [210] J. Chen, Z. Lu, D. Cheng, S. Peng, and H. Wang, "Isolation and characterization of porcine amniotic fluid-derived multipotent stem cells.," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, pp. 1–9, 2011.
- [211] T. G. Koch, T. Heerkens, P. D. Thomsen, and D. H. Betts, "Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood.," *BMC Biotechnol.*, vol. 7, p. 26, 2007.
- [212] C. K. Rebelatto, a M. Aguiar, M. P. Moretão, a C. Senegaglia, P. Hansen, F. Barchiki, J. Oliveira, J. Martins, C. Kuligovski, F. Mansur, a Christofis, V. F. Amaral, P. S. Brofman, S. Goldenberg, L. S. Nakao, and a Correa, "Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue.," *Exp. Biol. Med. (Maywood).*, vol. 233, pp. 901–913, 2008.
- [213] D. L. Troyer and M. L. Weiss, "Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population.," *Stem Cells*, vol. 26, pp. 591–9, 2008.
- [214] M. I. Macias, J. Grande, A. Moreno, I. Domínguez, R. Bornstein, and A. I. Flores, "Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers.," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 203, no. 5, pp. 495.e9–e495.e23, 2010.
- [215] A. Coli, F. Nocchi, R. Lamanna, M. Iorio, S. Lapi, P. Urciuoli, F. Scatena, E. Giannessi, M. R. Stornelli, and S. Passeri, "Isolation and characterization of equine amnion mesenchymal stem cells.," *Cell Biol. Int. Rep.*, vol. 18, no. 1, p. e00011, Jan. 2011.
- [216] O. Parolini, F. Alviano, G. P. Bagnara, G. Bilic, H.-J. Bühring, M. Evangelista, S. Hennerbichler, B. Liu, M. Magatti, N. Mao, T. Miki, F. Marongiu, H. Nakajima, T. Nikaido, C. B. Portmann-Lanz, V. Sankar, M. Soncini, G. Stadler, D. Surbek, T. A. Takahashi, H. Redl, N. Sakuragawa, S. Wolbank, S. Zeisberger, A. Zisch, S. C. Strom, and H. J. Bühring, "Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 26, no. 2, pp. 300–311, Feb. 2008.
- [217] P. Gil-Loyzaga, *Cultivo de Celulas Animales Y Humanas, Aplicaciones en Medicina (1).pdf*. Madrid, 2011.

- [218] Y. Park, S. H. Kim, S. Matalon, N. H. L. Wang, and E. I. Franses, "Effect of phosphate salts concentrations, supporting electrolytes, and calcium phosphate salt precipitation on the pH of phosphate buffer solutions," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 278, pp. 76–84, 2009.
- [219] D. Ren, G. D. Pipes, D. Liu, L. Y. Shih, A. C. Nichols, M. J. Treuheit, D. N. Brems, and P. V. Bondarenko, "An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins," *Anal. Biochem.*, vol. 392, pp. 12–21, 2009.
- [220] L. K. Jakub Suchánek, Tomáš Soukup, Romana Ivančaková, Jana Karbanová, Věra Hubková, Robert Pytlík, "Human dental pulp stem cells, isolation and long term cultivation," *ACTA MEDICA (Hradec Králové)*, vol. 50, 2007.
- [221] F. Bertuzzi, S. Cainarca, S. Marzorati, A. Bachi, B. Antonioli, R. Nano, R. Verzaro, and C. Ricordi, "Collagenase isoforms for pancreas digestion," *Cell Transplant.*, vol. 18, pp. 203–206, 2009.
- [222] F. Ulloa-Montoya, C. M. Verfaillie, and W.-S. Hu, "Culture systems for pluripotent stem cells.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, pp. 12–27, 2005.
- [223] S. Abraham, S. Sheridan, L. Laurent, K. Albert, C. Stubban, I. Ulitsky, B. Miller, J. Loring, and R. R. Rao, "Propagation of human embryonic and induced pluripotent stem cells in an indirect co-culture system," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 393, pp. 211–216, 2010.
- [224] M. Andäng, A. Moliner, C. Doege, C. Ibañez, and P. Ernfors, "Optimized mouse ES cell culture system by suspension growth in a fully defined medium.," *Nat. Protoc.*, vol. 3, pp. 1013–1017, 2008.
- [225] A. Cells, A. Augello, T. B. Kurth, and C. De Bari, "MESENCHYMAL STEM CELLS : A PERSPECTIVE FROM IN VITRO CULTURES TO IN VIVO MIGRATION AND NICHES," vol. 20, pp. 121–133, 2010.
- [226] E. Flores-figueroa, J. J. Montesinos, and H. Mayani, "Células troncales mesenquimales : historia , biología y aplicación clínica," *Rev. Investig. Clin.*, vol. 58, pp. 498–511, 2006.
- [227] M. Z. Ratajczak, M. Kucia, J. Ratajczak, and E. K. Zuba-Surma, "A multi-instrumental approach to identify and purify very small embryonic like stem cells (VSELs) from adult tissues.," *Micron*, vol. 40, pp. 386–93, 2009.
- [228] J. T. Williams IV, S. S. Southerland, J. Souza, A. F. Calcutt, and R. G. Cartledge, "Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes," *Am. Surg.*, vol. 65, pp. 22–26, 1999.
- [229] H. Castro-Malaspina, R. E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers, D. Chiarieri, S. McKenzie, H. E. Broxmeyer, and M. A. Moore, "Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.," *Blood*, vol. 56, pp. 289–301, 1980.

- [230] Q. R. Wang, Z. J. Yan, and N. S. Wolf, "Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the in vitro growth of murine bone marrow CFU-F.," *Exp. Hematol.*, vol. 18, pp. 341–347, 1990.
- [231] D. C. Colter, R. Class, C. M. DiGirolamo, and D. J. Prockop, "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, pp. 3213–3218, 2000.
- [232] D. Baksh, J. E. Davies, and P. W. Zandstra, "Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion," *Exp. Hematol.*, vol. 31, pp. 723–732, 2003.
- [233] A. Dicker, K. Le Blanc, G. Aström, V. van Harmelen, C. Götherström, L. Blomqvist, P. Arner, and M. Rydén, "Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue.," *Exp. Cell Res.*, vol. 308, pp. 283–290, 2005.
- [234] F. Festy, L. Hoareau, S. Bes-Houtmann, A.-M. Péquin, M.-P. Gonthier, A. Munstun, J. J. Hoarau, M. Césari, and R. Roche, "Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes.," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 124, pp. 113–121, 2005.
- [235] S. Gronthos, D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, and J. M. Gimble, "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells," *J Cell Physiol*, vol. 189, pp. 54–63, 2001.
- [236] M. A. Haniffa, X.-N. Wang, U. Holtick, M. Rae, J. D. Isaacs, A. M. Dickinson, C. M. U. Hilkens, and M. P. Collin, "Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells.," *J. Immunol.*, vol. 179, pp. 1595–1604, 2007.
- [237] M. J. Varma, R. G. Breuls, T. E. Schouten, W. J. Jurgens, H. J. Bontkes, G. J. Schuurhuis, S. M. van Ham, and F. J. van Milligen, "Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells," *Stem Cells Dev.*, vol. 16, pp. 91–104, 2007.
- [238] R. Yañez, M. L. Lamana, J. García-Castro, I. Colmenero, M. Ramírez, and J. A. Bueren, "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease.," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 2582–2591, 2006.
- [239] R. Huss, "Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells.," *J. Hematother. Stem Cell Res.*, vol. 9, pp. 783–793, 2000.
- [240] M. K. Majumdar, M. A. Thiede, S. E. Haynesworth, S. P. Bruder, and S. L. Gerson, "Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages.," *J. Hematother. Stem Cell Res.*, vol. 9, pp. 841–848, 2000.

- [241] B. Sacchetti, A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, M. Riminucci, and P. Bianco, "Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment," *Cell*, vol. 131, pp. 324–336, 2007.
- [242] A. C. W. Zannettino, S. Paton, A. Arthur, F. Khor, S. Itescu, J. M. Gimble, and S. Gronthos, "Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo," *J. Cell. Physiol.*, vol. 214, pp. 413–421, 2008.
- [243] D. Docheva, C. Popov, W. Mutschler, and M. Schieker, "Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: Surface characteristics and the integrin system," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 11, pp. 21–38, 2007.
- [244] H. Wang, S.-C. Hung, S.-T. Peng, C.-C. Huang, H.-M. Wei, Y. Guo, Y. Fu, M. Lai, and C.-C. Chen, "Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord," *Stem Cells*, vol. 22, no. 7, pp. 1330–1337, Jan. 2004.
- [245] M. Niku, L. Imonen, T. Pessa-Morikawa, and A. Iivanainen, "Limited contribution of circulating cells to the development and maintenance of nonhematopoietic bovine tissues," *Stem Cells*, vol. 22, pp. 12–20, 2004.
- [246] S. Kadiyala, R. G. Young, M. A. Thiede, and S. P. Bruder, "Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro," *Cell Transplant.*, vol. 6, pp. 125–134, 1997.
- [247] D. R. Martin, N. R. Cox, T. L. Hathcock, G. P. Niemeyer, and H. J. Baker, "Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow," *Exp. Hematol.*, vol. 30, pp. 879–886, 2002.
- [248] R. Izadpanah, C. Trygg, B. Patel, C. Kriedt, J. Dufour, J. M. Gimble, and B. A. Bunnell, "Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue," *J. Cell. Biochem.*, vol. 99, pp. 1285–1297, 2006.
- [249] L. Da Silva Meirelles and N. B. Nardi, "Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: Isolation, in vitro expansion, and characterization," *Br. J. Haematol.*, vol. 123, pp. 702–711, 2003.
- [250] M. Harting, F. Jimenez, S. Pati, J. Baumgartner, and C. Cox Jr., "Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells," *Cytotherapy*, vol. 10, pp. 243–253, 2008.
- [251] A. I. Caplan and J. E. Dennis, "Mesenchymal stem cells as trophic mediators," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 98, pp. 1076–1084, 2006.
- [252] L. Chen, E. E. Tredget, P. Y. G. Wu, and Y. Wu, "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing," *PLoS One*, vol. 3, 2008.

- [253] G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio, "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.," *Science*, vol. 279, pp. 1528–1530, 1998.
- [254] H. A. Awad, D. L. Butler, G. P. Boivin, F. N. Smith, P. Malaviya, B. Huibregtse, and A. I. Caplan, "Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon.," *Tissue Eng.*, vol. 5, pp. 267–277, 1999.
- [255] A. K. Chong, A. D. Ang, J. C. Goh, J. H. Hui, A. Y. Lim, E. H. Lee, and B. H. Lim, "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model.," *J Bone Jt. Surg Am*, vol. 89, pp. 74–81, 2007.
- [256] M. Agung, M. Ochi, S. Yanada, N. Adachi, Y. Izuta, T. Yamasaki, and K. Toda, "Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration.," *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, vol. 14, no. 12, pp. 1307–14, Dec. 2006.
- [257] J. M. Murphy, D. J. Fink, E. B. Hunziker, and F. P. Barry, "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis.," *Arthritis Rheum.*, vol. 48, no. 12, pp. 3464–74, Dec. 2003.
- [258] J. L. Spees, S. D. Olson, J. Ylostalo, P. J. Lynch, J. Smith, A. Perry, A. Peister, M. Y. Wang, and D. J. Prockop, "Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, pp. 2397–2402, 2003.
- [259] H. Scipioni, "Técnica y aplicación de células madre en lesiones tendinosas de equinos deportivos," 2011.
- [260] J. M. Ryan, F. P. Barry, J. M. Murphy, and B. P. Mahon, "Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection.," *J. Inflamm. (Lond).*, vol. 2, p. 8, 2005.
- [261] P. Niemeyer, M. Kornacker, A. Mehlhorn, A. Seckinger, J. Vohrer, H. Schmal, P. Kasten, V. Eckstein, N. P. Sudkamp, and U. Krause, "Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro.," *Tissue Eng*, vol. 13, pp. 111–121, 2007.
- [262] K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, J. B. Mitchell, Z. E. Floyd, L. Hammill, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, J. P. Ting, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, and J. M. Gimble, "The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro.," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 1246–1253, 2006.
- [263] D. L. Borjesson and J. F. Peroni, "The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease.," *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 31, pp. 109–123, 2011.
- [264] W. T. Tse, J. D. Pendleton, W. M. Beyer, M. C. Egalka, and E. C. Guinan, "Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation.," *Transplantation*, vol. 75, pp. 389–397, 2003.

- [265] M. Krampera, A. Pasini, G. Pizzolo, L. Cosmi, S. Romagnani, and F. Annunziato, "Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 6, pp. 435–441, 2006.
- [266] M. Di Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, and A. M. Gianni, "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli," *Blood*, vol. 99, pp. 3838–3843, 2002.
- [267] E. Dander, G. Lucchini, P. Vinci, M. Introna, S. Bonanomi, a. Balduzzi, G. Gaipa, P. Perseghin, F. Masciocchi, C. Capelli, J. Golay, a. Algarotti, a. Rambaldi, a. Rovelli, a. Biondi, E. Biagi, and G. D'Amico, "Immunomonitoring of Transplanted Patients Infused With Mesenchymal Stromal Cells (MSC) for Treating Steroid-Refractory GVHD," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 17, no. 2, pp. S162–S163, Feb. 2011.
- [268] K. Le Blanc, I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Götherström, M. Hassan, M. Uzunel, and O. Ringdén, "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells," *Lancet*, vol. 363, pp. 1439–1441, 2004.
- [269] K. Le Blanc, F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M. E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R. M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, and O. Ringdén, "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study," *Lancet*, vol. 371, pp. 1579–1586, 2008.
- [270] K. Le Blanc and D. Mougiakakos, "Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, pp. 383–396, 2012.
- [271] K. Lee, S. H., Cheuh, H. W., Yoo, K. H., Sung, "Cotransplantation of third party umbilical cord blood mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood.," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 17, no. 2, pp. 169–170, 2011.
- [272] M. J. Lopez, K. R. McIntosh, N. D. Spencer, J. N. Borneman, R. Horswell, P. Anderson, G. Yu, L. Gaschen, and J. M. Gimble, "Acceleration of spinal fusion using syngeneic and allogeneic adult adipose derived stem cells in a rat model.," *J. Orthop. Res.*, vol. 27, pp. 366–73, 2009.
- [273] K. R. McIntosh, M. J. Lopez, J. N. Borneman, N. D. Spencer, P. a Anderson, and J. M. Gimble, "Immunogenicity of allogeneic adipose-derived stem cells in a rat spinal fusion model.," *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, pp. 2677–2686, 2009.
- [274] P. R. Koppula, L. K. Chelluri, N. Poliseti, and G. K. Vemuganti, "Histocompatibility testing of cultivated human bone marrow stromal cells - a promising step towards pre-clinical screening for allogeneic stem cell therapy.," *Cell. Immunol.*, vol. 259, pp. 61–5, 2009.
- [275] P. Batten, P. Sarathchandra, J. W. Antoniow, S. S. Tay, M. W. Lowdell, P. M. Taylor, and M. H. Yacoub, "Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy

and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves.," *Tissue Eng.*, vol. 12, pp. 2263–2273, 2006.

- [276] C. Prevosto, M. Zancolli, P. Canevali, M. R. Zocchi, and A. Poggi, "Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction," *Haematologica*, vol. 92, pp. 881–888, 2007.
- [277] L. Cui, S. Yin, W. Liu, N. Li, W. Zhang, and Y. Cao, "Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2.," *Tissue Eng.*, vol. 13, pp. 1185–1195, 2007.
- [278] S.-H. Yang, M.-J. Park, I.-H. Yoon, S.-Y. Kim, S.-H. Hong, J.-Y. Shin, H.-Y. Nam, Y.-H. Kim, B. Kim, and C.-G. Park, "Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10.," *Exp. Mol. Med.*, vol. 41, pp. 315–24, 2009.
- [279] S. Aggarwal and M. F. Pittenger, "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.," *Blood*, vol. 105, pp. 1815–22, 2005.
- [280] A. J. Nauta, G. Westerhuis, A. B. Kruisselbrink, E. G. a Lurvink, R. Willemze, and W. E. Fibbe, "Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting.," *Blood*, vol. 108, pp. 2114–20, 2006.
- [281] A. J. Poncelet, J. Vercruyssen, A. Saliez, and P. Gianello, "Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo.," *Transplantation*, vol. 83, pp. 783–790, 2007.
- [282] J. a Kode, S. Mukherjee, M. V Joglekar, and A. a Hardikar, "Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration.," *Cytotherapy*, vol. 11, pp. 377–391, 2009.
- [283] R. E. Newman, D. Yoo, M. a LeRoux, and A. Danilkovitch-Miagkova, "Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells.," *Inflamm. Allergy Drug Targets*, vol. 8, pp. 110–123, 2009.
- [284] D. J. Guest, M. R. W. Smith, and W. R. Allen, "Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study.," *Equine Vet. J.*, vol. 40, pp. 178–181, 2008.
- [285] D. Carrade, S. Owens, and L. Galuppo, "Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses," ..., no. May, pp. 1–12, 2011.
- [286] F. Rastegar, D. Shenaq, J. Huang, W. Zhang, B.-Q. Zhang, B.-C. He, L. Chen, G.-W. Zuo, Q. Luo, Q. Shi, E. R. Wagner, E. Huang, Y. Gao, J.-L. Gao, S. H. Kim, J.-Z. Zhou, Y. Bi, Y. Su, G. Zhu, J. Luo, X. Luo, J. Qin, R. R. Reid, H. H. Luu, R. C. Haydon, Z.-L. Deng, and T.-C. He, "Mesenchymal stem cells: Molecular

characteristics and clinical applications.," *World J. Stem Cells*, vol. 2, pp. 67–80, 2010.

- [287] M. C. Stewart and A. A. Stewart, "Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action," *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, vol. 27. pp. 243–261, 2011.
- [288] S. Bajada, I. Mazakova, J. B. Richardson, and N. Ashammakhi, "Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 2. pp. 169–183, 2008.
- [289] N. B. Nardi and Z. Z. C. Alfonso, "The hematopoietic stroma," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 32, pp. 601–609, 1999.
- [290] F. Hubin, C. Humblet, Z. Belaid, C. Lambert, J. Boniver, A. Thiry, and M.-P. Defresne, "Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more mature progenitors.," *Stem Cells*, vol. 23, no. 10, pp. 1626–33, 2005.
- [291] J. Cai, M. L. Weiss, and M. S. Rao, "In search of 'stemness,'" *Experimental Hematology*, vol. 32. pp. 585–598, 2004.
- [292] M. Baddoo, K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C. Hughes, G. C. Kopen, and D. G. Phinney, "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection," *J. Cell. Biochem.*, vol. 89, pp. 1235–1249, 2003.
- [293] L. da Silva Meirelles, A. M. Fontes, D. T. Covas, and A. I. Caplan, "Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 20. pp. 419–427, 2009.
- [294] X. Song, C.-H. Zhu, C. Doan, and T. Xie, "Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches.," *Science*, vol. 296, pp. 1855–1857, 2002.
- [295] A. J. Wagers and I. L. Weissman, "Plasticity of adult stem cells," *Cell*, vol. 116, pp. 639–648, 2004.
- [296] M. Perez-Moreno, C. Jamora, and E. Fuchs, "Sticky business: Orchestrating cellular signals at adherens junctions," *Cell*, vol. 112, pp. 535–548, 2003.
- [297] C. Petritsch, G. Tavosanis, C. W. Turck, L. Y. Jan, and Y. N. Jan, "The Drosophila myosin VI jaguar is required for basal protein targeting and correct spindle orientation in mitotic neuroblasts," *Dev. Cell*, vol. 4, pp. 273–281, 2003.
- [298] S. Etienne-Manneville and A. Hall, "Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 15, pp. 67–72, 2002.
- [299] L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, and D. T. Scadden, "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche," *Nature*, vol. 425, pp. 841–846, 2003.

- [300] D. Chen, M. Zhao, and G. R. Mundy, "Bone Morphogenetic Proteins," *Growth Factors*, vol. 22, no. 4, pp. 233–241, Jan. 2004.
- [301] M. S. Friedman, M. W. Long, and K. D. Hankenson, "Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6," *J Cell Biochem*, vol. 98, pp. 538–554, 2006.
- [302] J. Zhang, C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.-G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Linheng, "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size," *Nature*, vol. 425, pp. 836–841, 2003.
- [303] T. Matsuda, T. Nakamura, K. Nakao, T. Arai, M. Katsuki, T. Heike, and T. Yokota, "STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells," *EMBO J.*, vol. 18, pp. 4261–4269, 1999.
- [304] S. Zhao, K. Zoller, M. Masuko, P. Rojnuckarin, X. O. Yang, E. Parganas, K. Kaushansky, J. N. Ihle, T. Papayannopoulou, D. M. Willerford, T. Clackson, and C. A. Blau, "JAK2, complemented by a second signal from c-kit or fit-3, triggers extensive self-renewal of primary multipotential hemopoietic cells," *EMBO J.*, vol. 21, pp. 2159–2167, 2002.
- [305] L. Alonso and E. Fuchs, "Stem cells in the skin : waste not , Wnt not," pp. 1189–1200, 2003.
- [306] E. Sancho, E. Battle, and H. Clevers, "Live and let die in the intestinal epithelium," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 15, pp. 763–770, 2003.
- [307] C. Gaspar and R. Fodde, "APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 48, pp. 377–86, 2004.
- [308] K. Willert, J. D. Brown, E. Danenberg, A. W. Duncan, I. L. Weissman, T. Reya, J. R. Yates, and R. Nusse, "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors.," *Nature*, vol. 423, pp. 448–452, 2003.
- [309] T. Reya, A. W. Duncan, L. Ailles, J. Domen, D. C. Scherer, K. Willert, L. Hintz, R. Nusse, and I. L. Weissman, "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells," *Nature*, vol. 423, pp. 409–414, 2003.
- [310] A. Poleskaya, P. Seale, and M. a Rudnicki, "Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration.," *Cell*, vol. 113, pp. 841–52, 2003.
- [311] T. Tumber, G. Guasch, V. Greco, C. Blanpain, W. E. Lowry, M. Rendl, and E. Fuchs, "Defining the epithelial stem cell niche in skin.," *Science*, vol. 303, pp. 359–63, 2004.
- [312] G. C. Gurtner, M. J. Callaghan, and M. T. Longaker, "Progress and potential for regenerative medicine.," *Annu. Rev. Med.*, vol. 58, pp. 299–312, 2007.

- [313] M. Ferrari, a Corradi, M. Lazzaretti, M. De'Cillà, C. G. Losi, R. Villa, and a Lanfranchi, "Adult stem cells: perspectives for therapeutic applications.," *Vet. Res. Commun.*, vol. 31 Suppl 1, pp. 1–8, Aug. 2007.
- [314] J. P. Brockes and A. Kumar, "Comparative aspects of animal regeneration.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 24, pp. 525–49, 2008.
- [315] a Tyndall and a Uccelli, "Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks.," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 43, pp. 821–828, 2009.
- [316] R. Smith, "12th ESVOT Congress," in *Stem cell therapy for tendon and ligament injuries – Clinical results*, 2004, pp. 187–188.
- [317] S. Hankemeier, M. Keus, J. Zeichen, M. Jagodzinski, T. Barkhausen, U. Bosch, C. Krettek, and M. Van Griensven, "Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments," *Tissue Eng.*, vol. 11, pp. 41–49, 2005.
- [318] R. K. W. Smith, "Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy.," *Disabil. Rehabil.*, vol. 30, pp. 1752–1758, 2008.
- [319] D. J. Guest, M. R. W. Smith, and W. R. Allen, "Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon.," *Equine Vet. J.*, vol. 42, pp. 636–642, 2010.
- [320] M. T. Butcher, J. W. Hermanson, N. G. Ducharme, L. M. Mitchell, L. V Soderholm, and J. E. a Bertram, "Superficial digital flexor tendon lesions in racehorses as a sequela to muscle fatigue: a preliminary study.," *Equine Vet. J.*, vol. 39, pp. 540–545, 2007.
- [321] L. Lacitignola, A. Crovace, G. Rossi, and E. Francioso, "Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report.," *Vet. Res. Commun.*, vol. 32 Suppl 1, pp. S33–S38, 2008.
- [322] Y. Kasashima, T. Takahashi, H. L. Birch, R. K. W. Smith, and a E. Goodship, "Can exercise modulate the maturation of functionally different immature tendons in the horse?," *J. Appl. Physiol.*, vol. 104, pp. 416–422, 2008.
- [323] B. J. Ahern, J. Parvizi, R. Boston, and T. P. Schaer, "Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 17, pp. 705–713, 2009.
- [324] T. G. Koch and D. H. Betts, "Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model.," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 7, pp. 1621–1626, 2007.
- [325] D. D. Frisbie, J. D. Kisiday, C. E. Kawcak, N. M. Werpy, and C. W. McIlwraith, "Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived

mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis.," *J. Orthop. Res.*, vol. 27, no. 12, pp. 1675–80, Dec. 2009.

- [326] D. T. Felson, R. C. Lawrence, M. C. Hochberg, T. McAlindon, P. A. Dieppe, M. A. Minor, S. N. Blair, B. M. Berman, J. F. Fries, M. Weinberger, K. R. Lorig, J. J. Jacobs, and V. Goldberg, "Osteoarthritis: new insights. Part 2: treatment approaches.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 133, pp. 726–37, 2000.
- [327] A. Pendleton, N. Arden, M. Dougados, M. Doherty, B. Bannwarth, J. W. Bijlsma, F. Cluzeau, C. Cooper, P. A. Dieppe, K. P. Günther, H. J. Hauselmann, G. Herrero-Beaumont, P. M. Kaklamanis, B. Leeb, M. Lequesne, S. Lohmander, B. Mazieres, E. M. Mola, K. Pavelka, U. Serni, B. Swoboda, A. A. Verbruggen, G. Weseloh, and I. Zimmermann-Gorska, "EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT).," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 59, pp. 936–944, 2000.
- [328] D. Ferris, D. Frisbie, J. Kisiday, and C. W. McIlwraith, "In vivo healing of meniscal lacerations using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and fibrin glue.," *Stem Cells Int.*, vol. 2012, p. 691605, 2012.
- [329] Y. Izuta, M. Ochi, N. Adachi, M. Deie, T. Yamasaki, and R. Shinomiya, "Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats.," *Knee*, vol. 12, pp. 217–23, 2005.
- [330] M. R. Seddighi, D. J. Griffon, D. J. Schaeffer, B. A. Fadi-Alla, and J. A. C. Eurell, "The effect of chondrocyte cryopreservation on cartilage engineering," *Vet. J.*, vol. 178, pp. 242–248, 2008.
- [331] S. Wakitani, K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata, and M. Yoneda, "Human autologous culture expanded bone marrow-mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 10, pp. 199–206, 2002.
- [332] L. a Fortier, a J. Nixon, J. Williams, and C. S. Cable, "Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells.," *American journal of veterinary research*, vol. 59. pp. 1182–7, 1998.
- [333] A. A. Worster, A. J. Nixon, B. D. Brower-Toland, and J. Williams, "Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells," *Am.J.Vet.Res.*, vol. 61, pp. 1003–1010, 2000.
- [334] A. A. Hegewald, J. Ringe, J. Bartel, I. Krüger, M. Notter, D. Barnewitz, C. Kaps, and M. Sittinger, "Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study.," *Tissue Cell*, vol. 36, pp. 431–8, 2004.
- [335] I. Ribitsch, J. Burk, U. Delling, C. Gittel, and W. Brehm, "Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine Basic Science and Clinical Application," *Biochem Eng/Biotechnol*, vol. 123, pp. 219–263, 2010.

- [336] D. Ferris, D. Frisbie, J. Kisiday, W. McIlwraith, and B. A. Hague, "Clinical evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell in naturally occurring joint disease," *Regen. Med.*, vol. 4, no. 2, p. 16, 2009.
- [337] M. M. Wilke, D. V Nydam, and A. J. Nixon, "Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model.," *J. Orthop. Res.*, vol. 25, pp. 913-25, 2007.
- [338] H. Yagi, A. Soto-gutierrez, B. Parekkadan, Y. Kitagawa, G. Tompkins, N. Kobayashi, and M. L. Yarmush, "Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing," vol. 19, no. 6, pp. 667-679, 2010.
- [339] M. Najjar, G. Raicevic, H. I. Boufker, H. F. Kazan, C. D. Bruyn, N. Meuleman, D. Bron, M. Tougouz, and L. Lagneaux, "Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources," *Cell. Immunol.*, vol. 264, pp. 171-179, 2010.
- [340] Y.-J. Chen, C.-H. Huang, I.-C. Lee, Y.-T. Lee, M.-H. Chen, and T.-H. Young, "Effects of cyclic mechanical stretching on the mRNA expression of tendon/ligament-related and osteoblast-specific genes in human mesenchymal stem cells.," *Connect. Tissue Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 7-14, Jan. 2008.