

USO AUTÓLOGO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE MEDULA ÓSEA PARA EL
TRATAMIENTO DE LESIONES OSTEOCONDRALES: REVISIÓN DE PROTOCOLOS Y MÉTODOS DE
CRIOPRESERVACIÓN

MARÍA PAULA LÓPEZ

MONOGRAFÍA

Presentado como requisito parcial para optar al título de
Bacterióloga y Microbióloga Industrial



VIVIANA RODRIGUEZ PARDO. MSC. Ph.D

Directora



EFRAIM LEAL GARCÍA. M.D.

Co-Director

GRUPO INMUNOBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR.
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C
2014

NOTA DE ADVERTENCIA


Artículo 23 de la Resolución No. 1 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

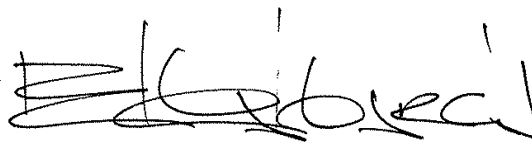
USO AUTÓLOGO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE MEDULA ÓSEA PARA EL
TRATAMIENTO DE LESIONES OSTEOCONDRALES: REVISIÓN DE PROTOCOLOS Y MÉTODOS DE
CRIOPRESERVACIÓN

MARÍA PAULA LÓPEZ


APROBADO



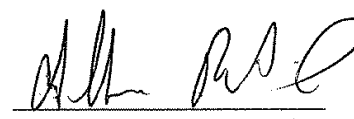
VIVIANA RODRIGUEZ PARDO. MSC. Ph.D
Directora



EFRAIM LEAL GARCÍA. M.D.
Co-Director



AURA ROSA MANASCEROS. MSC.
Jurado



AIFONSO BARRETO. MSC. Ph.D
Jurado

Tabla de contenido

1. Resumen	4
2. Justificación y Planteamiento del problema	5
3. Objetivos	7
3.1. Objetivo General	7
3.2. Objetivos Específicos	7
4. Marco Conceptual	8
4.1 Células Madre Mesenquimales	8
4.1.1. Características biológicas de las Células Madre Mesenquimales	8
4.1.2. Células Madre Mesenquimales y su capacidad de regeneración tisular	9
4.1.3. Papel de las Células Madre Mesenquimales en la regeneración de fracturas óseas	10
4.1.4. Mecanismos de regeneración ósea in vivo	11
5. Resultados y Discusión	17
5.1. Protocolos terapéuticos asociados con el uso autólogo de Células Madre Mesenquimales para regeneración ósea	18
5.2. Métodos de Criopreservación:	26
5.2.1. Aspectos generales de la criopreservación	26
5.2.2. Sistemas de criopreservación	27
5.2.3. Criopreservación de Células Madre Mesenquimales	28
5.2.4. Bancos de Células Madre Mesenquimales humanas aisladas de diferentes tejidos	32
6. Conclusiones	36
7. Perspectivas	37
8. Bibliografía	38

1. RESUMEN

Las Células Madre Mesenquimales (CMMs) aisladas de medula ósea, debido a su capacidad de diferenciación osteogénica, juegan un papel importante en la terapia celular de reconsolidación ósea para fracturas complejas. A través de la realización de ésta monografía se identificaron diferentes protocolos terapéuticos y estrategias de criopreservación para el uso autólogo de CMMs en el tratamiento de lesiones de tejido óseo, así como las técnicas de criopreservación que se han empleado hasta el momento para la conservación de estas células a largo plazo. En términos generales dependiendo del tipo de protocolo terapéutico utilizado puede mejorar la eficiencia del tratamiento de CMMs para lesiones osteocondrales, además para que la estrategia de criopreservación de CMMs sea efectiva diversos protocolos sugieren el uso de medio de congelación con Dimetilsulfóxido (10%) mediante la implementación de un sistema de congelación secuencial.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Actualmente en el Departamento de Ortopedia y Traumatología del Hospital San Ignacio (HUSI) se registra un número importante de pacientes con fracturas complejas que son susceptibles a presentar retardos de consolidación ósea, lo cual retrasa el tiempo para la recuperación de los pacientes, incrementa el número de intervenciones quirúrgicas y aumenta los costos adicionales asociados con este tratamiento,(Comunicación oral: Doctor Efraim Leal García, Departamento de Ortopedia y Traumatología HUSI; 1º de enero, 2014). Estas intervenciones adicionales, usualmente se manejan con instrumentos como tornillos y placas que facilitan la unión y restablecimiento de la estructura ósea[1]; sin embargo, estos procedimientos además de ser invasivos y de larga recuperación, entre el 10 y 20% de los casos pueden fracasar como opción terapéutica[2].

Entre las causas que se han asociado a este fracaso, se señala la aplicación incorrecta de los instrumentos anteriormente mencionados en el lugar de la fractura, fisura del hueso e infecciones post trauma[3, 4], así como la edad del paciente que influye en su capacidad de regeneración ósea[4]. Es por ello, que se requiere de la implementación de terapias alternativas que sean menos invasivas y con resultados eficientes a largo plazo[5].

Las fracturas complejas son una de las principales causas de discapacidad en los adultos, siendo el tiempo de restauración de la lesión una variable determinante para establecer la recuperación completa. En los casos en los cuales las fracturas no logran consolidarse, es posible que se presenten consecuencias tales como deformidad, pérdida funcional, morbilidad y mortalidad en pacientes de la tercera edad[6]. En el estudio realizado por Ito H [7] se indica que las fracturas complejas de cadera son fatales en aproximadamente el 20% de los pacientes ,generando incapacidad permanente en alrededor del 50 % de los pacientes[7], con un promedio de supervivencia de 5 años en el 50% de los casos[8]. Adicionalmente, Pountos I y cols[9] han indicado que las tasas de fracturas complejas sin consolidación oscilan entre el 5% y 20% de las fracturas en general[9].

Las alteraciones fisiológicas asociadas con el desarrollo de fracturas sin consolidación se relacionan con la deficiencia de proteínas como el factor de crecimiento similar a la insulina (Insulin-like growth factor) (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-derived growth factor) (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast growth factors) (FGF),

proteínas morfogenéticas óseas, entre otros[9]. Por lo tanto el uso de CMMs constituye una opción terapéutica interesante para restablecer el tejido óseo de pacientes que presenten problemas de consolidación ósea posterior a una fractura[10], ya que de acuerdo a Ito H [7] este tipo de células tienen la capacidad de restablecer defectos óseos de una manera uniforme propicia y fiable posiblemente mediante la secreción de dichos factores de crecimiento[7]. Adicionalmente, las características de autorenovación, adhesión y diferenciación de las CMMs en osteoblastos y condrocitos permite que estas células presenten condiciones propicias para la reparación ósea[11, 12]. Sin embargo, para poder implementar el uso de autoinjertos de CMMs en el lugar de la lesión como co-terapia que promueva y acelere la consolidación ósea, es pertinente conocer los protocolos terapéuticos asociados con autoinjertos y las estrategias de criopreservación, con el fin de responder en un futuro a las necesidades terapéuticas de pacientes que asisten al Departamento de Ortopedia y Traumatología del Hospital San Ignacio. Por lo tanto la pregunta de investigación que se espera responder con la realización de esta monografía es: ¿Qué tipo de protocolos terapéuticos han sido reportados para el trasplante autólogo de CMMs para regeneración ósea y qué métodos de criopreservación se han utilizado para la conservación de estas células a largo plazo?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Identificar los protocolos terapéuticos y estrategias de criopreservación para el uso autólogo de Células Madre Mesenquimales en lesiones de tejido óseo.

3.2. Objetivos específicos:

- Conocer los diferentes factores del microambiente que promueven la diferenciación osteogénica de Células Madre Mesenquimales.
- Identificar los diferentes protocolos terapéuticos utilizados para el trasplante autólogo de Células Madre Mesenquimales en regeneración ósea.
- Revisar los diferentes métodos de criopreservación utilizados para la preservación de Células Madre Mesenquimales.

4. MARCO CONCEPTUAL

4.1. Células Madre Mesenquimales

4.1.1. Características biológicas de las Células Madre Mesenquimales

Las células madre Mesenquimales (CMMs), también conocidas como células mesenquimales del estroma o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU - F) identificadas por Friedenstein A y cols[13], están presentes en el estroma de tejidos como la medula ósea y tejido adiposo entre otros y se caracterizan por su capacidad de diferenciación en linajes celulares de origen mesodérmico incluyendo osteocitos, condrocitos, adipocitos, miocitos como también en células de diverso origen embrionario (endodérmico, ectodérmicas y mesodérmicas), entre ellas células de origen neuronal, hepático, pancreático y renal [14], así mismo las CMMs poseen la propiedad de auto renovarse con una alta tasa de proliferación[15]. Por otro lado se describen como células mononucleares no fagocíticas con una morfología similar a fibroblastos que expresan en su superficie un conjunto de proteínas entre ellas CD90+, CD105+ [15], STRO - 1 + , CD73 + , CD49a + , CD49c + , CD49f + , CD44 + , CD166 + , CD29 + , CD13 + , HLA -ABC + , CD146 + , CD147 + , en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45 o CD14[16].

Desde 1995, cuando se realizó el primer estudio clínico con CMMs [17] hasta la fecha, más de 2000 pacientes han sido sometidos a terapias celulares con CMMs para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, neurológicas, autoinmunes , óseas entre otras[18]. Se han descrito y registrado más de 200 ensayos clínicos empleando CMMs para la terapia de diferentes patologías en el sitio web del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (*Clinical trials for Mesenchymal Stem Cells* recuperado el 23 de Julio de 2014) (<http://www.ClinicalTrial.gov/>).

Adicionalmente, hasta la fecha se registran en la Agencia Europea de Medicamentos 17.724 ensayos clínicos pediátricos empleando Células Madre Mesenquimales para diferentes patologías entre ellas epidermolisis bullosa, artritis idiopática juvenil, isquemia crítica de miembros inferiores y enfermedad injerto contra huésped no revascularizables (*Clinical*

trialsfor Mesenchymal Stem Cells recuperado el 23 de Julio de 2014)(<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctrsearch/search?query=meseenchymal+stem+cells>).

4.1.2. Células Madre Mesenquimales y su capacidad de regeneración tisular:

Inicialmente, la aplicación de las CMMs en los campos de regeneración tisular se enfocó principalmente en restablecer defectos de cartílago, hueso y tejido adiposo mediante la obtención de estas mismas a partir de autoinjertos; se ha encontrado que estas células pueden secretar algunas moléculas con actividad paracrina las cuales son capaces de estimular e inducir la regeneración de tejido, entre ellas factores de crecimiento, microvesículas y citoquinas[19]. Por ejemplo, tienen la capacidad de liberar factores solubles que pueden modular la proliferación celular entre ellos el factor derivado de células del estroma 1 stromal cell-derived factor 1) (SDF-1) ,factor de crecimiento de hepatocitos(Hepatocyte growth factor) (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)(VEGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (Insulin-like growth factor 1) (IGF-1); como también factores que regulan la apoptosis entre ellos la estaniocalcina 1 (Stanniocalcin-1) (STC-1);la angiogénesis (VEGF, SDF-1), y la respuesta inmune en el tejido dañado como la óxido nítrico sintasa (Inducible nitric oxide synthase) (iNOS), y la prostaglandina E2 (PGE-2) entre otros[20, 21];incluso se sabe, que las CMMs reducen el alorreconocimiento de trasplantes al generar un efecto inmunosupresor local mediante la secreción de citoquinas como la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), el óxido nítrico, el TGF-beta, y la prostaglandina E2 [19], que interfieren con la función normal de las células dendríticas y linfocitos T, esta función inmunomoduladora allanó el camino para involucrar a estas células en la terapia de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico , la esclerosis múltiple , o la enfermedad de Crohn [22].

Se ha evidenciado en informes preclínicos y clínicos experimentales que la administración local, así como la administración sistémica de CMMs resultan en al menos una mejora transitoria de un alto porcentaje de casos de diferentes patologías como la osteogénesis imperfecta[20] , accidente cerebrovascular[21], lesión de medula espinal[23] , Parkinson[24],

Alzheimer[24] patologías renales[25] , diabetes y trastornos gastrointestinales entre ellos la enfermedad de Crohn[22].

4.1.3. Papel de las Células Madre Mesenquimales en la regeneración de fracturas óseas:

En primera instancia es importante entender que los mecanismos de formación y remodelación ósea son procesos coordinados y regulados por una compleja cascada de eventos moleculares que implican la proliferación celular, síntesis de una matriz extracelular enriquecida en colágeno tipo I y la posterior mineralización de esta matriz, en donde adicionalmente se encuentran involucradas células específicas de hueso tales como osteoblastos, osteocitos y osteoclastos[26]. Los osteoblastos se derivan de las Células Madre Mesenquimales y por la interacción de estos con la matriz extracelular enriquecida en colágeno tipo I contribuyen en el proceso de mineralización, diferenciándose a células maduras conocidas como osteocitos; por otro lado se encuentran los osteoclastos, que son células de origen hematopoyético, responsables de la resorción ósea. La formación y resorción ósea son procesos acoplados herméticamente, que aseguran el mantenimiento y regulación de la masa ósea[27]. Recientemente se ha evidenciado que tanto la remodelación como la síntesis ósea son procesos controlados por señales entre osteoblastos y osteoclastos[28].

Los osteoclastos además de reabsorber el hueso proporcionan señales inhibitorias y estimulantes, incluyendo la secreción de moléculas como cardiotropina- 1 y la esfingosina-1-quinasa, las cuales ejercen su efecto en la regulación de la diferenciación de los osteoblastos en superficies corticales y trabeculares[28]. De igual forma los osteoblastos tienen la capacidad de producir factores tanto inhibitorios como estimuladores de la diferenciación de los osteoclastos, un ejemplo de esta regulación es la activación del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B, (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand)(RANKL), molécula involucrada en el metabolismo óseo, básicamente se encarga de la activación y movilidad de los osteoclastos, por otro lado se encuentra la osteoprotegerina (OPG) localizada en la superficie de progenitores óseos , su función principal es promover la diferenciación y activación de los osteoclastos, se produce en respuesta a diversos estímulos paracrinicos y endocrinicos, incluyendo la hormona paratiroidea (PTH), la 1,25-dihidroxitamina D3 y la interleucina 6[29, 30].

4.1.4. Mecanismos de regeneración ósea *in vivo*:

El proceso de reconsolidación ósea secundaria a una fractura post trauma, en el que actúan las CMMs, se desarrolla en tres etapas secuenciales que corresponden a las fases de inflamación, migración y regeneración de tejido óseo.

A continuación se describen estas tres etapas que conducen a la diferenciación osteogénica de CMMs y a la regeneración de tejido óseo:

ETAPA I: Eventos Inflamatorios secundarios a lesión ósea post trauma.

Cuando se presenta una fractura o lesión ósea se activan diferentes eventos celulares y moleculares, que inician una cascada inflamatoria, lo cual regula la actividad de las CMMs con el fin de restablecer la integridad ósea; se sabe que, este proceso inflamatorio es un potente regulador del comportamiento celular, apoptosis, adhesión y permeabilidad celular[31].

Para describir el proceso tanto de migración de leucocitos como de CMMs al lugar de la lesión, es necesario conocer que las quimiocinas (citoquinas quimiotácticas) son una superfamilia de pequeñas glicoproteínas (8-10 kDa) que están involucradas en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo el tráfico de leucocitos, hematopoyesis, angiogénesis y la organogénesis. Se distinguen de otras citoquinas por ser los únicos miembros de la familia de citoquinas que se unen a los receptores de dominio transmembranal acoplado a la proteína G. Son pequeñas proteínas con cuatro cisteínas conservadas en su estructura primaria unidas por enlaces disulfuro (Cys1-Cys3 y Cys4-Cys2) [32]. Existen aproximadamente 50 quimiocinas humanas que se clasifican en cuatro categorías según el posicionamiento de los residuos de cisteína dentro de la secuencia primaria de aminoácidos. La familia más grande es la de las quimiocinas CC, llamadas así porque los dos primeros de los cuatro residuos de cisteína son adyacentes entre sí. La segunda categoría es la de la familia de quimiocinas CXC, que tienen un residuo de aminoácidos entre las dos primeras cisteínas. La tercera familia es la CX3C de los cuales la fractalcina (CX3CL1) es un miembro [33]. Y por último la Linfotactina, es el único miembro de la cuarta familia, que se caracteriza por tener un solo par de cisteínas unidas mediante enlaces disulfuro [34].

Citoquinas proinflamatorias:

Entre las citoquinas proinflamatorias encontramos a la interleucina-1, la interleucina-6, así como al factor de necrosis tumoral-alfa (Tumor necrosis factor alpha) (TNF- α), los cuales desempeñan un papel importante referente a la iniciación de la cascada de reparación, estimulación de la angiogénesis, reclutamiento de células fibrogénicas a la zona de la lesión, regulación de la formación de hueso endocondral y remodelación ósea, son secretadas por los macrófagos, células inflamatorias y CMMs presentes en el periostio, a su vez estas citoquinas muestran una elevación significativa de expresión en las primeras 24 h después de la fractura como también durante la remodelación ósea [35], específicamente el TNF- α promueve el reclutamiento de CMMs al lugar de la lesión, induce la apoptosis de condrocitos hipertróficos durante la osificación endocondral y es capaz de estimular la función osteoclástica, su ausencia puede causar el retraso de la resorción del cartílago mineralizado lo cual impide la formación de hueso[36], por otro lado la interleucina-1 promueve la migración y adhesión de CMMs al lugar de la lesión mediante la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (NF-kB) , como también la quimiotaxis de leucocitos a través de la inducción de secreción de factores solubles en las CMMs[37].

Por último la interleucina-6 se encuentra involucrada en los procesos mediadores de la homeostasis ósea, ya que al ser secretada por los osteoblastos con el fin de estimular el desarrollo de los osteoclastos juega un papel importante en la resorción ósea[38]. Además puede interactuar con receptores de membrana ubicados en las CMMs, para inducir la activación de la vía MAP Quinasa, la cual está involucrada en el proceso de diferenciación osteogénica de estas células [39].

ETAPA 2: Migración de Células Madre Mesenquimales al lugar de la lesión ósea.

Una de las características más importantes que involucran a las CMMs en la regeneración de tejido óseo es su capacidad de migración en respuesta a las señales producidas por el lugar donde ha ocurrido la lesión. Los mecanismos precisos de tráfico de CMMs al sitio de la lesión ósea no se entienden completamente, sin embargo se ha especulado que diferentes citoquinas y sus receptores regulan este proceso[40]; es probable que el tejido lesionado exprese receptores específicos o ligandos para facilitar el tráfico, adhesión e infiltración de las

CMMs al lugar de la lesión, similar a como ocurre con el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación[40]. Es probable que algunas quimiocinas y sus receptores estén implicados en el proceso de migración de las CMMs; se ha demostrado que la expresión de receptores CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, y CCR10 en las CMMs juegan un papel importante en la conducción de la migración de estas a diferentes lugares donde se esté presentando la lesión[41]. Como también específicamente la producción del factor de crecimiento derivado de plaquetas Beta (platelet derived growth factor β) (PDGF- β) el cual es un heterodímero que ejerce su actividad mediante la unión y activación de los receptores PDGFR- α de alta afinidad, localizados en la superficie celular de las CMMs [42]. Una vez estos receptores son activados en las CMMs se induce la fosforilación de moléculas de señalización tales como MAP quinasa p38, ERK, JNKs que conducen a la migración de las CMMs al lugar de la lesión[43, 44]; es sintetizado por osteoblastos, condrocitos y CMMs con el propósito de reclutar CMMs provenientes de médula ósea a los sitios donde se está presentando la lesión ósea para con ello acelerar el proceso de reparación[45].

En el estudio realizado por Nail y cols [46] se evidenció que tanto la eritropoyetina como el factor derivado de células del estroma- 1 (Stromal derived factor-1)(SDF-1 α) también pueden inducir la migración de las CMMs al sitio de la fractura [46], específicamente SDF-1 α es una quimiocina altamente expresada por el tejido óseo y osteoblastos que residen en el tejido óseo fracturado e inducen la migración de las CMMs mediante la activación del receptor de superficie CXCR4 en respuesta a una variedad de citoquinas tales como (IL-1 β , PDGF- β B, Factor de crecimiento transformante beta 1, (Transforming growth factor beta 1) (TGF- β 1) y Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor necrosis factor alpha) (TNF- α)[47].

Por último se ha evidenciado que tanto la P-selectina como su ligando (P-selectina ligando 1 o CD24) están implicados en la extravasación de CMMs al tejido lesionado una vez las células madre son estimuladas con estas citoquinas proinflamatorias anteriormente mencionadas, estos datos sugieren que las CMMs al igual que los leucocitos tiene la capacidad de migrar a través de células endoteliales [48], como también de expresar en su superficie moléculas de adhesión tales como las integrinas α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, β 1, β 3, y β 4, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3, ALCAM, VLA-4 y endogлина / CD105, que promueve una adhesión firme de las CMMs a la células endoteliales y posterior transporte al lugar de la lesión[49].

ETAPA III: Regeneración ósea mediada por la diferenciación de CMMs a osteoblastos.

Los eventos moleculares que gobiernan la consolidación de fracturas, se destacan por ser una compleja red de señales que inducen, reclutamiento celular, proliferación celular, diferenciación celular y formación de tejido [50].

Una vez las CMMs migran al lugar de la lesión ósea, estas pueden contribuir a la reparación de dos maneras: i) Diferenciándose en células propias del tejido lesionado con el fin de restaurar tanto la morfología como la función del mismo; o ii) secretando un amplio espectro de factores bioactivos, que promuevan un entorno de reparación mediante la inducción de efectos anti-apoptóticos, inmunorreguladores e inductores de la proliferación de células endoteliales[51].

Algunas moléculas y citoquinas específicas interactúan con receptores ubicados en la superficie de las mismas para inducir la diferenciación de las CMMs a progenitores óseos, estas moléculas de señalización pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)[52]. Algunos miembros específicos de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta, incluyendo proteínas morfogenéticas óseas (Bone morphogenetic proteins) (BMPs 1-8), factores de diferenciación y crecimiento (GDF - 1 , 5 , 8 , 10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF - β 1 , - β 2 , - β 3) , intervienen en diferentes etapas de osificación endocondral e intramembranosa durante la consolidación de la fractura, por ejemplo las BMPs se unen a los receptores con actividad serina / treonina quinasa de tipo II expresados en las CMMs lo cual inicia la cascada de señalización intracelular Smad, estas proteínas juegan un papel crítico en la regulación del crecimiento , diferenciación y apoptosis de diferentes tipos de células , incluyendo los osteoblastos, condroblastos , células neurales , y células epiteliales [53].

En cuanto al factor de crecimiento transformante beta (TGF - β 1 , - β 2 , - β 3) , es una citoquina que se produce y se almacena en la matriz ósea, puede ser liberada y activada durante la resorción osteoclástica[54] y se ha evidenciado que es regulada por pequeños complejos de TGF- β latente (dímeros en estado latente por asociación no covalente con su propéptido N-terminal) conocidos también como proteína asociada a la latencia (LAP). Células similares a osteoblastos pueden secretar complejos LAP/ TGF- β [55], en la mayoría de las células el complejo latente se une covalentemente a una de las proteínas de unión a TGF- β latente

(LTBPs). LTBPs son componentes de la matriz extracelular, que están involucrados en el secuestro y activación de TGF- β [56]. Específicamente LTBP-3 media la activación de TGF- β y el control de crecimiento autocrino en las células no diferenciadas y se ha demostrado que este es necesario para que se inicie la fase de proliferación temprana de células diferenciadas[27]. De igual manera se ha postulado que este factor de crecimiento está involucrado en mecanismos de regulación de la diferenciación osteogénica de CMMs mediante la inducción de la proliferación y diferenciación de CMMs a osteoblastos[57].

Otra citoquina importante, involucrada tanto en el proceso de migración como diferenciación osteogénica de las CMMs es el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1 (Insulin-like growth factor 1) (IGF-1), el cual es el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea y es el encargado de mantener la masa ósea en la edad adulta, durante la remodelación ósea, esta citoquina es liberada por la matriz ósea, células endoteliales y CMMs; ejerce su efecto mediante la activación del receptor de crecimiento insulínico tipo 1 ubicado en la superficie de las CMMs, induciendo la fosforilación de la molécula 3 fosfoinositol quinasa (PI3K) y activación de la vía (Akt), conllevando a la expresión del gen Runx2[58], el cual promueve la diferenciación de las CMMs a osteoblastos[59].

En este proceso de diferenciación osteogénica también intervienen una serie de factores de transcripción estimuladores entre ellos la β catenina, la cual se activa en la vía de señalización canónica Wnt y se transloca al núcleo donde se une a los factores de transcripción LEF / TCF lo que conlleva a la activación de genes involucrados en la diferenciación de las CMMs a osteoblastos[60]. También se encuentra el factor de transcripción RUNX2 el cual es considerado el factor de transcripción principal involucrado en la diferenciación osteogénica de CMMs puesto que regula la expresión de muchos genes que determinan el fenotipo de los osteoblastos tales como la osteocalcina, osteopontina, fosfatasa alcalina entre otros[61]. De igual manera la proteína 2 que se une a regiones ricas en AT (SATB 2) puede interactuar con Runx2 como también con el factor de transcripción 4 (ATF4) y mejorar la función de transactivación de ambas proteínas con el propósito de promover la diferenciación osteogénica de las CMMs[62]. El segundo factor de transcripción necesario para la diferenciación de CMMs a osteoblastos es Osterix (Osx), el cual se expresa específicamente en los osteoblastos y es necesario para la formación de hueso[63], además tiene la capacidad de unirse al promotor de SATB 2 para aumentar la transcripción del gen SATB 2 [64]. La proteína

CEBPB (CCAAT/enhancer-binding protein beta") tiene la capacidad de unirse en forma de homodímero o heterodímero a ciertos promotores, presentando de esta forma un papel importante en la regulación de genes implicados en la diferenciación adipogénica y osteogénica de las CMMs[65]. Por otro lado se encuentra el coactivador de transcripción con capacidad de unión a los motivos PDZ (TAZ), que al tener el dominio WW es capaz de unirse a la secuencia Motif Pro-Pro-X-Tyr ubicada dentro de las regiones reguladoras de un gran número de factores de transcripción incluyendo Runx2 y PPAR γ , contribuyendo de esta forma en la regulación de la diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica de CMMs[66].

Por último se encuentran la proteína PPAR- γ que tiene la capacidad de unirse a Runx2 e inhibir su actividad transcripcional, afectando de esta forma la diferenciación de las CMMs a osteoblastos[67].

A continuación se expone esquemáticamente las moléculas implicadas en la diferenciación de las CMMs a osteoblastos:

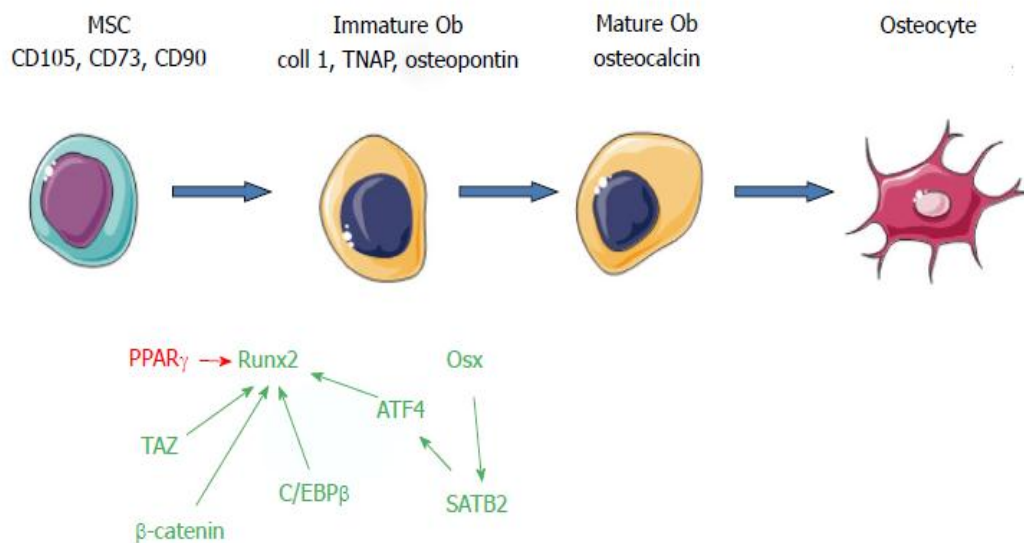


Figura 1. Factores de transcripción implicados en la diferenciación osteogénica de las CMMs. Se muestran los marcadores de diferenciación osteogénica en negro, factores de transcripción estimulantes en verde y los factores de transcripción inhibitorios en rojo[68].

Para finalizar, en términos generales, la consolidación de una fractura se inicia a través de la inducción de una respuesta inmune; durante esta etapa inicial, se produce inflamación y la formación de un hematoma , la angiogénesis también se lleva a cabo, de manera que tanto el factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor)(FGF) , factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular endothelial growth Factor) (VEGF) y la angiopoyetina 1 y 2 intervienen como reguladores del crecimiento vascular en el desarrollo de callo óseo junto con los osteoblastos; la formación de hueso endocondral se produce principalmente adyacente al periostio del lugar de la fractura donde las células progenitoras de condroblastos y osteoblastos son reclutadas y comienzan su proliferación alrededor del tercer día después de la fractura ,dando lugar a la formación de callo blando y cartílago gracias a la síntesis de colágeno tipo II y proteoglicano, una vez se forma el cartílago, este se hipertrofia y empieza la mineralización de manera espacialmente organizada junto con la destrucción de los condrocitos hipertróficos calcificadores por parte de los condroclastos y seguido de la formación de tejido óseo ,con el tiempo , este callo blando se sustituye por médula ósea, que posteriormente sufre una remodelación significativa para convertirse en hueso [53].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1 Protocolos terapéuticos asociados con el uso autólogo de Células Madre Mesenquimales para regeneración ósea:

Con respecto a la utilización de CMMs específicamente aisladas de medula ósea en la terapia de regeneración ósea, desde hace varios años se ha planteado su implementación en el desarrollo de tratamientos mínimamente invasivos, los cuales pueden dividirse en diferentes modalidades de acuerdo a la metodología y materiales adicionales que se utilicen.

En primer lugar se encuentran los protocolos terapéuticos asociados con la inoculación de medula ósea autóloga percutánea, donde se extrae un volumen específico de medula ósea, la cual es inyectada directamente (sin ningún pre-tratamiento) en el lugar de la lesión del paciente; por ejemplo Goel A y cols [69] emplearon este tipo de procedimiento *ex vivo* en 20 pacientes que presentaban pseudoartrosis tibial, a los cuales se les inyectó 15 mL de aspirado de médula ósea autólogo en el lugar de la lesión, logrando la consolidación de la fractura en el 75% de los 20 pacientes tratados dentro de las 14 semanas posteriores a su administración[69]. De igual forma Zamzam y cols[70] expusieron a 28 pacientes a un implante de 20 ml de medula ósea autóloga en el sitio donde presentaban el quiste óseo, obteniendo como resultado la desaparición del mismo en el 82% de los casos, con un promedio de tiempo de restablecimiento de 6,13 meses, lo cual demuestra que la inyección de medula ósea autóloga posiblemente es un método eficiente para el tratamiento y supresión de quistes óseos activos y agresivos.[70]. Singh y cols[71] evaluaron 12 pacientes de diferentes edades que presentaban retardos de consolidación ósea de fémur, húmero y metacarpo luego de seis meses de intervención quirúrgica, en el procedimiento se extrajo e inyectó en el lugar de la lesión un volumen final entre 20 y 30 ml de medula ósea. Después de aproximadamente 5,8 semanas de realizar la intervención, se evidenció la formación de callo óseo en 10 de los 12 pacientes evaluados[71], lo cual demuestra que la inyección de medula ósea autóloga promueve el restablecimiento completo de fracturas óseas, tales como fracturas de fémur, tibia y húmero[72]. Sin embargo, esta metodología no se puede utilizar cuando existen deformidades angulares pre-existentes en el lugar donde se presenta la fractura, ya que dificulta, la aplicación correcta de la inyección percutánea de la médula ósea, alterando de esta forma la efectividad del tratamiento[72].

En segundo lugar se encuentran los protocolos en donde además de extraer medula ósea, las células mononucleares son separadas y concentradas mediante un gradiente de densidad o simplemente por centrifugación, obteniendo una porción de células que es inyectada directamente en el lugar de la fractura del paciente. Hernigou P y cols [72] realizaron un tratamiento *ex vivo* donde extrajeron 300 ml de aspirado de medula ósea de 60 pacientes que presentaban dificultades en la consolidación ósea ocasionado por fracturas complejas; en este estudio la muestra de médula ósea fue concentrada a través de centrifugación e inyectada en el lugar de la lesión de los pacientes, en total 53 de ellos (88 %) alcanzaron la reversión del daño dentro de 4 meses después del tratamiento, además se evidenció que cuando los pacientes recibieron un número de células inferior a 30.000 UFC-F no lograron formar una resolución de hueso completa, mientras que los que recibieron un promedio de alrededor 55.000 UFC-F si lograron la unión y reconstitución de hueso [72]. De igual forma en el estudio realizado por Gessmann y cols[73]ocho pacientes con un rango de edad entre 22 a 64 años, con problemas de consolidación ósea de fractura tibial post trauma, se les extrajo 60 ml de medula ósea autóloga, la cual fue concentrada mediante centrifugación empleando un gradiente de densidad, obteniendo un volumen de 8 ml de células mononucleares, a las cuales se les adicionó 2 ml de trombina autóloga y fueron inyectadas en el lugar de la fractura de cada paciente. Al cabo de aproximadamente 10 meses se observó consolidación ósea completa en los ocho pacientes analizados[73].En el estudio realizado por Cuevas M y cols [74] además de evaluar la eficacia de la implantación de medula ósea concentrada rica en células mononucleares en el tratamiento de la necrosis avascular de cabeza femoral para prevenir o retrasar el reemplazo total de cadera, con los resultados arrojados en el estudio se evidenció que para tener un tratamiento exitoso en necrosis avascular de la cabeza femoral, la cantidad de células mononucleares necesarias es de 45×10^3 células mononucleares/ml, lo cual mejora significativamente la funcionalidad de cadera en un 75.3% en los pacientes que padezcan esta enfermedad. Este ensayo, se realizó en 17 pacientes adultos con necrosis avascular de cabeza femoral, donde durante el procedimiento quirúrgico se extrajo un volumen promedio de 19.5 ml de medula ósea a cada paciente, esta a su vez se concentró empleando el sistema *Smartprep 2* y posteriormente se implantó un volumen de 15.25 ml de medula ósea a los pacientes estudiados. [74].Según los resultados obtenidos de los anteriores estudios, el aislamiento e inoculación de células mononucleares de médula ósea puede tener ventajas sobre la inoculación directa de médula ósea total ya que al concentrar las células

mononucleares, en éste tipo de muestra, posiblemente también concentra el número de CMMs que serán implantadas al paciente y con ello aumentar la eficacia de reconsolidación ósea del tratamiento[74].

El tercer grupo de protocolos consisten en el uso de células mononucleares o CMMs aisladas y caracterizadas (diferenciadas o sin diferenciar) sobre andamios o soportes que facilitan la función biomecánica del tejido [75].

Bajada y cols[76]observaron en un paciente que presentaba pseudoartrosis tibial refractaria, al cual se le inyectó 5×10^6 células estromales (obtenidas a partir de 10ml de médula ósea) mezcladas con 10 mL de suero y soportes de sulfato de calcio de diámetros de (4.8 y 3 mm), el restablecimiento completo de la lesión, demostrando que el empleo del sulfato de calcio combinado con CMMs provenientes de medula ósea puede ser un es un tratamiento eficiente para la pseudoartrosis tibial refractaria[76].

Hernigou y cols [77]realizaron un estudio en 60 pacientes que presentaban osteolisis periacetabular, dividió los pacientes en dos grupos experimentales: en el primer grupo (control) (n=30) se utilizaron aloinjertos de hueso descongelados e irradiados, en el segundo grupo se utilizaron aloinjertos de hueso irradiados y rehidratados con CMMs aisladas de la fracción de células mononucleares extraídas de 30 ml de aspirado de medula ósea; previamente para medir el número de CMMs que fueron implantadas, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias de fibroblastos donde se obtuvieron 195.000 CFU-F/ml las cuales fueron mezcladas con el aloinjerto de hueso e implantadas en los 30 pacientes evaluados. El seguimiento de este ensayo se realizó durante 12 años en los dos grupos ,dando como resultado mejores tasas de unión del injerto y menores tasas de reabsorción del mismo empleando aloinjertos mezclados con CMMs, además se evidenció que los pacientes tratados con aloinjertos óseos y CMMs presentaron reversión total del daño óseo en comparación con el grupo control el cual presentó una tasa de fracaso del tratamiento del 30%[77].

Kim y cols[78] evaluaron la eficacia de la inyección intra- articular de medula ósea autóloga previamente concentrada y mezclada con tejido adiposo en 41 pacientes que presentaban artritis degenerativa de rodilla, para ello se mezclaron 7 ml de la fracción de células mononucleares obtenidas por centrifugación previa de medula ósea y 20 ml de tejido adiposo autólogo que posteriormente fue inyectada en el lugar donde se presentaba la lesión; 12

meses después de la intervención se evidenció que en los 41 pacientes disminuyó el dolor articular y mejoró la funcionalidad de la rodilla tratada después de la intervención, lo cual da un indicio de que este tipo de procedimiento empleando tanto medula ósea como tejido adiposo puede ser un tratamiento eficaz para las personas que presenten artritis degenerativa de rodilla. Se empleó tejido adiposo como andamio ya que en este se encuentra una fracción importante de CMMs (2.4×10^5) con alta capacidad de diferenciación a osteoblastos y condroblastos, lo cual también contribuye a la eficacia del tratamiento al disponer de una mayor cantidad de CMMs que promuevan mediante su diferenciación a condroblastos la regeneración de cartílago[78].

Así mismo en el estudio llevado a cabo por Bances[79] en 7 pacientes que presentaban pseudoartrosis de tibia($n=3$), fémur($n=3$) y cúbito ($n=1$), se evaluó la eficacia del implante de aloinjertos de hueso esponjoso previamente descongelados mezclado con $132,6 \times 10^6$ células mononucleares/ml, obtenidas a partir de la centrifugación con Ficoll de 50 ml de aspirado de medula ósea autóloga. Los estudios radiológicos realizados después del trasplante revelaron que todos los pacientes tratados lograron la consolidación ósea completa en un tiempo medio de 5,3 meses (rango, 2-9 meses) después del trasplante, lo que indica que esta combinación de células mononucleares junto con aloinjertos de hueso esponjoso es una estrategia viable, poco invasiva y de bajo costo para el tratamiento eficaz de pacientes que presenten pseudoartrosis de tibia, fémur y cúbito[79].

Ochs y Cols[80] estudiaron 78 pacientes que presentaban deficiencia acetabular severa, el estudio se dividió en dos grupos: Grupo A: Se utilizaron aloinjertos de hueso esponjoso previamente descongelados junto con un anillo de refuerzo acetabular. Grupo B: Además de utilizar aloinjertos de hueso esponjoso previamente descongelados junto con anillos de refuerzo acetabular, estos fueron irradiados y rehidratados con medula ósea autóloga previamente concentrada, dando como resultado que el empleo de aloinjertos de hueso esponjoso irradiados junto con anillos de refuerzo acetabular y la inserción de medula ósea autóloga previamente concentrada, es un método de reconstrucción de deficiencias acetabulares que da resultados comparables a los tratamientos convencionales de esta patología además de brindar menor susceptibilidad de contaminación microbiológica[80].

Meijer y cols [81] estudiaron 10 pacientes que presentaban defectos de consolidación ósea de mandíbula. A cada paciente se le extrajo un volumen de 15 mL de aspirado de medula ósea,

las muestras fueron cultivadas a una concentración de 100,000 células mononucleares /mL en medio mínimo esencial α suplementado con suero fetal bovino(10%), posteriormente se indujo la diferenciación de las CMMs a linaje osteogénico mediante la siembra de estas en el medio de Iscove modificado por Dulbecco suplementado con dexametasona (10^{-7} M), junto con un andamio compuesto por hidroxiapatita, las células se sembraron a una concentración de 4×10^8 CMMs/cm³ de andamio; la presencia de osteoblastos fue verificada mediante tinción con fosfatasa alcalina. Los implantes dentales fueron inyectados 4 meses después en el sitio donde se había insertado previamente un sustituto de hueso autólogo a los pacientes, obteniendo como resultado la reconsolidación ósea completa en 9 de 10 pacientes evaluados después de 15 meses de haber realizado el procedimiento, este último no resultó por el desprendimiento del implante dental [81].

Kim y cols[82] realizaron un estudio en 64 pacientes que presentaban fracturas cerradas simples en huesos largos, a los cuales se les recogió un volumen de 3-5 ml de medula ósea, que se mezcló con 30 ml de medio mínimo esencial enriquecido con 10% de suero fetal bovino y se centrifugó durante 10 min, pasado este tiempo se filtró la muestra, se volvió a mezclar con 10 ml de medio y se inició la siembra de las mismas, después de 24 días de cultivo se evaluó la diferenciación osteogénica de las CMMs mediante tinción con rojo de alizarin y la verificación de activación de fosfatasa alcalina, además se realizó análisis inmunofenotípico empleando un anticuerpo monoclonal específico de hueso (colágeno tipo 1) y fosfatasa alcalina ósea. Después de 4 semanas de cultivo se recolectaron los osteoblastos y se ajustaron a una concentración de $1,2 \times 10^7$ CMMs/0,4 mL de células mononucleares, estos fueron utilizados a su vez en la implantación junto con fibrina, los resultados muestran que la formación promedio de callo óseo en el grupo experimental fue superior en comparación con el control utilizado el cual no empleaba cultivo celular, demostrando que el trasplante de osteoblastos autólogos cultivados con fibrina es un procedimiento seguro y efectivo para acelerar la tasa de reconsolidación ósea de fracturas simples de huesos largos[82].

Así mismo se han descrito estudios como el de Giannotti S y cols [83], en el cual se evaluó la eficacia y seguridad a largo plazo de las CMMs provenientes de médula ósea humana inmovilizadas en coágulos de fibrina para el tratamiento de la pseudoartrosis atrófica de la extremidad superior en 8 pacientes; en este tratamiento, se extrajo un volumen final de 60 ml de medula ósea a cada paciente, el cual se concentró, mezcló y cultivó con suero autólogo

,posteriormente se indujo la diferenciación de las CMMs previamente cultivadas a osteoblastos en medio osteogénico y se llevó a cabo un análisis inmunofenotípico empleando anticuerpos monoclonales anti CD34, CD45, CD105, CD90. Por último se recolectaron plasmas autólogos y fueron mezclados con osteoblastos (0.5×10^6 - 2.0×10^6 osteoblastos/2mL de plasma) y (cloruro de calcio 800 μ l), después de la incubación los constructos de osteoblastos/coágulos de fibrina, fueron implantados en el lugar donde se presentaba la fractura de cada paciente; al cabo de 6,7 meses se evidenciaron resultados clínicos positivos, con todos los pacientes los cuales recuperaron la función de la extremidad superior, demostrando que el tratamiento empleando constructos de CMMs con coágulos de fibrina autóloga puede ser un método eficaz y seguro en la consolidación a largo plazo de fracturas óseas.[83]. Igualmente en el experimento ex vivo dirigido por Wongchuensoontorn y cols[84] donde se estudió un paciente que presentaba pseudoartrosis de mandíbula atrófica, al cual se le implantó un injerto autólogo de hueso iliaco hidratado con trombina autóloga y CMMs las cuales fueron previamente aisladas de la porción de células mononucleares provenientes de 60 ml de aspirado de medula ósea concentrada, con 91.1×10^3 células mononucleares/0.001ml posterior identificación de la porción de CMMs por citometría de flujo empleando anticuerpos monoclonales anti CD34, CD45, CD44 Y CD73. Después de 4 meses del procedimiento se observó recuperación completa de la lesión sin ninguna complicación. Determinando de este modo que el empleo de injerto autólogo de hueso iliaco rehidratado con CMMs previamente extraídas de la porción de células mononucleares provenientes de aspirado de medula ósea y trombina autóloga puede ser una técnica eficaz para el tratamiento de fracturas con problemas de consolidación ósea[84].

El cuarto y último grupo de protocolos publicados, consiste en el uso de CMMs de médula ósea (aisladas y caracterizadas) sin soportes adicionales. Zhao y cols[85], estudiaron el efecto del implante autólogo de CMMs aisladas de medula ósea en 50 pacientes que se encontraban en las primeras etapas de osteonecrosis de cabeza femoral y sus resultados los compararon con un grupo control de 50 personas a los que se les realizó tratamiento convencional para esta clase de patología (descompresión del núcleo). Para lo cual se implantaron 2×10^6 CMMs (a partir de 10ml de médula ósea) en el lugar donde se presentaba la lesión de cada paciente. Sesenta meses después de la intervención, se evidenció restablecimiento de la lesión en todos los pacientes tratados con CMMs mientras que en el grupo control 10 de los 50 pacientes evaluados progresaron a osteonecrosis de cabeza femoral, estos pacientes fueron sometidos a

reemplazo total de cadera .Según los resultados obtenidos en este estudio, el uso de CMMs autólogas aisladas de medula ósea puede ser un tratamiento efectivo para los pacientes que presenten osteonecrosis de cabeza femoral[85].

De igual manera Wong y cols[86], inyectaron CMMs cultivadas provenientes de medula ósea humana en 56 pacientes que presentaban defectos de cartílago tibial sometidos anteriormente a osteotomía; el estudio se dividió en dos grupos, el primero (n=28) fue tratado con CMMs cultivadas junto con suero autólogo y el segundo grupo (control) no se les suministró nada. Durante el análisis se obtuvo un volumen entre 35 y 74 ml de médula ósea, esta a su vez se concentró y cultivó en el medio Eagle Modificado de Dulbecco, suplementado con 10% de suero bovino fetal y 50 mg / mL de ácido ascórbico, después de 23 días de cultivo 1×10^6 CMMs fueron mezcladas con 1 ml de suero autólogo e inyectadas posteriormente en el lugar de la lesión de cada paciente. Al cabo de dos años de seguimiento, se observó en el grupo tratado con CMMs cultivadas que 10 pacientes (36%) tenían más del 50% de cobertura de cartílago, en comparación con el grupo control en el que sólo 4 pacientes (14%) obtuvieron resultados similares, además se evidenció regeneración de cartílago en el 61% de los pacientes del grupo 1 mientras que en el grupo control se observó integración incompleta en el 86% de los casos, lo cual demuestra que la inyección de CMMs cultivadas es un método eficaz para el tratamiento de pacientes con defectos de cartílago tibial[86].

Kitoh y cols[87] evaluaron el efecto del implante de CMMs aisladas de médula ósea de 50 pacientes que presentaban problemas de regeneración ósea femoral (n=23) y tibial (n=28), después de llevar a cabo el cultivo de las CMMs, se inyectaron $1,35 \times 10^7$ CMMs en el lugar de la fractura, los resultados obtenidos fueron comparados con un grupo control (n=60) que no recibió terapia celular, se determinó que existe una consolidación ósea más rápida en los pacientes con fracturas femorales y tibiales tratados con CMMs cultivadas, a diferencia de los pacientes que presentan la misma patología pero sin tratamiento celular[87].

A continuación se exponen algunas ventajas y desventajas de los protocolos anteriormente descritos:

PROTOCOLO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Inoculación de medula ósea autóloga percutánea.	<ul style="list-style-type: none"> Método económico, rápido, seguro, simple y se puede realizar de forma ambulatoria[72]. 	<ul style="list-style-type: none"> No se puede utilizar cuando existen deformidades angulares pre-existentes en el lugar donde se presenta la fractura[72]. Disminuye su efectividad en pacientes con antecedentes de quimioterapia, alcoholismo y tabaquismo[72]
Inoculación de medula ósea concentrada autóloga percutánea	<ul style="list-style-type: none"> Aumenta la eficacia de reconsolidación ósea del tratamiento al concentrar las células mononucleares provenientes de medula ósea [74]. 	<ul style="list-style-type: none"> Disminuye su efectividad en pacientes con antecedentes de quimioterapia, alcoholismo y tabaquismo[72]. Toma alrededor de dos horas, lo cual es demasiado tiempo cuando la reinyección se realiza durante la misma intervención del aspirado[72].
Implante autólogo de CMMs aisladas y caracterizadas (diferenciadas o sin diferenciar) sobre andamios o soportes.	<ul style="list-style-type: none"> Aumenta las propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductivas de CMMs implantadas[84]. Facilitan la función biomecánica del tejido[75]. 	<ul style="list-style-type: none"> Los Andamios empleados deben ser biocompatibles, biodegradables, con suficiente porosidad (adhesión celular) no inmunogénicos[88]. Método costoso y complejo.
Inoculación de CMMs de médula ósea autóloga (aisladas y caracterizadas) sin soportes adicionales.	<ul style="list-style-type: none"> Al cultivar y concentrar una cantidad específica de CMMs aumenta la tasa de consolidación ósea, en los pacientes tratados.[72] 	<ul style="list-style-type: none"> Método lento. Susceptible a contaminación. Disminuye su efectividad en pacientes con antecedentes de quimioterapia, alcoholismo y el tabaquismo[72].

5.2. Métodos de criopreservación:

5.2.1 Aspectos generales de la criopreservación:

La criopreservación se fundamenta en el manejo de temperaturas muy bajas con el fin de conservar y mantener tanto la viabilidad como la funcionalidad de células y tejidos[89] en presencia de un crioprotectante para evitar los efectos perjudiciales de la formación de cristales de hielo intracelular y la destrucción de las células por acción mecánica directa; el objetivo de utilizarlos crioprotectantes en estos casos es aumentar la concentración total de todos los solutos en el sistema y reducir la cantidad de hielo formado intracelular a cualquier temperatura dada, para lo cual estas sustancias empleadas como crioprotectantes deben ser capaces de penetrar en las células y tener una baja toxicidad; muchos compuestos tienen tales propiedades, incluyendo el glicerol, dimetil sulfoxido, etanodiol y propanodiol[90]. Los efectos biológicos de la criopreservación se fundamentan en la congelación del agua (conversión de agua líquida a fase sólida o hielo cristalino), en donde a medida en que va disminuyendo la temperatura, se inicia la formación de hielo primero en el medio extracelular pero no en el medio intracelular, resultando en la disminución de la cantidad de agua exterior en relación a la interior, induciendo de esta forma la salida de agua proveniente de la célula con el fin de restablecer el equilibrio osmótico, promoviendo la concentración de solutos intracelulares, haciendo más difícil la congelación del agua que queda en el medio intracelular, impidiendo la formación de cristales de hielo y el consecuente daño a las estructuras celulares preservadas, por lo cual variables como el control de la temperatura y la velocidad de congelación juegan un papel importante tanto en el equilibrio termodinámico de la célula como en el éxito de dicho método de preservación[89].

La historia de este método se origina en el año 1948 que permitió la congelación de diferentes tipos de células animales, con su subsiguiente restauración de estructura y función. Un año después Polge, Smith y Parkes publicaron su artículo de referencia en el que demostraron que la adición de 10-20 % de glicerol permitía que los espermatozoides de gallo sobrevivieran a la congelación prolongada a -80°C es allí donde esta sustancia se empieza a utilizar como crioprotectante de diferentes tipos de células y bacterias gracias a la protección brindada a las mismas durante el proceso de congelación lo cual promovió a su vez la búsqueda de nuevas

sustancias que tuviesen la misma función protectora entre ellas el compuesto denominado dimetil sulfóxido (DMSO)[89].

5.2.2 Sistemas de criopreservación:

Vitrificación:

La vitrificación es la solidificación de un líquido sin la cristalización ,es decir que el agua en un tejido o célula permanece sin congelar en un estado no cristalino durante el enfriamiento. Esto se genera debido a que a medida que aumenta el enfriamiento, los movimientos moleculares en el líquido que impregna el tejido disminuyen (estasis molecular), dando lugar a un estado en el que el líquido se detiene y semeja la formación de una capa vítrea la cual es demasiado viscosa como para fluir[91].

Por otro lado en cuanto a las ventajas que presenta este método se resalta el hecho de no tener ningún efecto biológico dañino y aparte su capacidad de proporcionar una conservación eficaz para un número de células, incluyendo monocitos , óvulos y embriones tempranos[92]; además de ser aplicable a todos los sistemas biológicos, no obstante las velocidades de enfriamiento empleadas suelen ser rápidas cuando se tratan a temperaturas de alrededor de -100 ° C y luego disminuyen lentamente cuando entran a la fase final con nitrógeno líquido, la temperatura de almacenamiento se lleva a cabo entre -135°C y -160°C y el calentamiento se maneja de una manera similar , lentamente desde -100 °C y luego rápidamente hacia 0°C.[91].

Criopreservación convencional (cristalización del agua):

A diferencia del método anteriormente expuesto este si permite la formación de cristales de agua una vez se congela la muestra, en donde es esencial el empleo de crioprotectantes que protejan a la célula de la formación de estos mismos, se ha evidenciado que para la conservación de muestras como cartílago de conejo el proceso de vitrificación resulta ser más eficiente permitiendo la preservación del 85% de la actividad metabólica celular junto con las características morfológicas particulares en contraste con los tejidos congelados donde no se observaron células viables[91].

Criopreservación mediante microencapsulación de células:

Las microcápsulas generalmente de alginato (derivado de polisacáridos como la agarosa y alginato de algas), son estructuras que permiten una mayor protección de la célula a los cambios de temperatura donde otorga porcentajes de viabilidad más altos en comparación con otros métodos, sin embargo es necesario el empleo de crioprotectores como dimetil sulfóxido (DMSO) para que se conserve como tal la muestra, esto se debe a que esta clase de estructuras no ejercen el papel de crioprotectores penetrantes dejando expuestas a las células a daños durante el proceso. La velocidad de enfriamiento en este caso debe ser lenta con la utilización entre 5 y 20% de DMSO y almacenamiento en nitrógeno líquido a baja velocidad, adicionándole también una fase de nucleación[93].

5.2.3. Criopreservación de Células Madre Mesenquimales:

La criopreservación ha sido una práctica habitual para la conservación de las células madre hematopoyéticas y mesenquimales debido a su utilización en el trasplante de médula ósea y reconstrucción del sistema hematopoyético después de la quimioterapia desde 1970[94]. Además, la criopreservación ha sido una herramienta útil para ayudar a la creación de bancos de células a gran escala que proporcionan las poblaciones de células uniformes con fines investigativos y terapéuticos, no obstante el mantenimiento de la supervivencia de estas células posterior a la criopreservación y descongelación ha sido un reto importante y por lo tanto el foco principal de los esfuerzos de investigación, ya que los protocolos convencionales han llevado a la alteración de las características de las células madre como la disminución de expresión de proteínas de membrana y tasas de viabilidad por debajo de lo aceptable, es por ello que se ha pretendido optimizar las variables de estos protocolos y con ello desarrollar una criopreservación eficiente que proporcione el mantenimiento de las características particulares de estas células [95].

Hunt y cols[96] realizaron la comparación entre varios estudios que empleaban diferentes crioprotectores (DMSO, polivinilpirrolidona y metilcelulosa) y protocolos de congelación para la criopreservación de CMMs, donde lograron establecer que cuando se utiliza una concentración de 10% de Dimetilsulfóxido y se efectúan etapas de enfriamiento lento y controlado (nucleación de hielo) no hay afectación alguna de la viabilidad y capacidad de diferenciación de las CMMs[96].

Es así como en el estudio realizado por Hirose y cols[97] se demostró que la criopreservación a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ de CMMs derivadas de médula ósea humana tiene la capacidad de preservar hasta el 98% de viabilidad y además de conservar su capacidad de diferenciación osteogénica después de criopreservarlas por 21 días [97]. Igualmente en el estudio dirigido por Davies y cols [98] se examinó el efecto de la criopreservación empleando 10% de dimetilsulfóxido y un sistema de congelación gradual ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 h; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 h; $-136\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 14 días) sobre la morfología, viabilidad y fenotipo de 1×10^6 CMMs aisladas de tejido adiposo, médula ósea y pulpa dental aunque los resultados obtenidos demuestran que la criopreservación redujo significativamente el número de células viables aisladas tanto de médula ósea como de pulpa dental, no afectó la viabilidad de las CMMs provenientes de tejido adiposo. Por otro lado el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo después de la criopreservación reveló un aumento significativo en la expresión relativa de marcadores de superficie CD90, CD29, CD44, CD73 y CD105/CD90 en las CMMs provenientes de tejido adiposo y pulpa dental pero no de médula ósea. De acuerdo a lo anteriormente expuesto la criopreservación es un método eficiente para la criopreservación de CMMs; no obstante, es importante tener en cuenta la fuente de obtención de las células ya que dependiendo de esto pueden ser afectadas variables como la viabilidad y nivel de expresión de marcadores característicos de las CMMs. Esto posiblemente se atribuye al hecho de que recientemente en el tejido adiposo se han encontrado poblaciones de CMMs que son capaces de soportar tensiones extremas, tales como la hipoxia, baja disponibilidad de nutrientes, exposición a largo plazo a las enzimas proteolíticas tales como colagenasa y bajas temperaturas[98, 99]

Ginis y cols,[100] analizaron la eficacia de la criopreservación durante 5 meses sobre la viabilidad, expresión de marcadores de superficie específicos y capacidad de diferenciación osteogénica de CMMs derivadas de médula ósea humana utilizando un medio de cultivo libre de nutrientes de origen animal conocido como *CryoStor* con diferentes concentraciones de DMSO (2%, 5%, y 10%) y un sistema de congelación programada ($-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde se realiza una inducción de la nucleación del hielo controlada, posteriormente se lleva a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ disminuyendo $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, posteriormente se continúa la congelación hasta alcanzar $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ disminuyendo $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ donde y por último se lleva a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ disminuyendo $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Al cabo de cinco meses de criopreservación se evidenció un porcentaje de viabilidad de 72% y 85% de las CMMs congeladas utilizando 5% y 10% de DMSO respectivamente. Por otro lado no se observaron cambios sobre la expresión de marcadores de superficie específicos de estas células y una vez

se realizó la inducción de diferenciación osteogénica de las CMMs previamente criopreservadas en un medio inductor durante 3 semanas, se evidenció el mismo grado de diferenciación osteogénica de las CMMs en comparación con cultivos paralelos no congelados, no se observaron cambios significativos en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), ni disminución en la producción de depósitos de calcio en estas células, lo cual demuestra que la criopreservación de CMMs empleando un medio libre de nutrientes de origen animal con una concentración de 10% de DMSO es un método conveniente, el cual no afecta parámetros como la viabilidad, inmunofenotipo ni capacidad de diferenciación osteogénica de CMMs provenientes de medula ósea humana[100].

Adicionalmente en el estudio llevado a cabo por Pravdyuk y cols [101] estudiaron los efectos de la criopreservación utilizando microesferas de alginato sobre la viabilidad, actividad metabólica y capacidad de diferenciación de las CMMs provenientes de medula ósea para comparar con el método de criopreservación convencional empleando únicamente la suspensión celular, en este caso se evidenció que cuando se utiliza una concentración del 10% de Dimetilsulfóxido, con un sistema de enfriamiento programado lento (-7°C donde se realiza una inducción de la nucleación del hielo controlada, posteriormente se llevan a -40°C y a -80°C, disminuyendo la temperatura de -10°C/min y por último se sumerge en nitrógeno líquido) existe un mayor porcentaje de viabilidad, actividad metabólica y capacidad de diferenciación a los diferentes linajes (adipocitos, condrocitos, osteocitos) de las CMMs, sin embargo la criopreservación de CMMs utilizando microesferas de alginato en comparación con la suspensión celular no se encuentra ninguna diferencia significativa en términos de viabilidad, actividad metabólica o capacidad de diferenciación siempre y cuando se lleve a cabo el protocolo utilizando 10% de dimetilsulfóxido y tres etapas de enfriamiento lento[101].

También se ha postulado que para lograr una recuperación mayor al 50% se debe realizar la siembra de estas células a una temperatura de -7°C utilizando el enfriamiento programado (1 °C / min) después de la adición de un solo paso del crioprotectante (10% de DMSO)[90].

Se ha identificado que la criopreservación de CMMs es un método de conservación satisfactorio a largo plazo puesto que en el estudio realizado por Shen J y cols [94] se evaluó la preservación de estas células después de un periodo de congelación entre 23 y 25 años, demostrando la ausencia de cambios morfológicos, alteraciones en la capacidad de

diferenciación e inmunofenotipo con el uso de una concentración del 20% DMSO y tres etapas de enfriamiento lento [94].

Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Matsumura y cols[102] , se analizó el efecto de la criopreservación sobre la viabilidad y propiedades de diferenciación de las CMMs provenientes de medula ósea humana, empleando el agente crioprotector extracelular (no penetrante) conocido como polianfolito a una concentración de 7.5% (p/p), el cual está compuesto por regiones poli carboxiladas, en un periodo de tiempo de 24 meses a -80°C. Transcurrido este tiempo se evidenció que las CMMs conservaron una viabilidad superior al 90%, además de su capacidad de diferenciación a osteoblastos, condrocitos y adipoblastos, demostrando que el polianfolito puede ser utilizado como crioprotector para CMMs provenientes de medula ósea, en reemplazo de DMSO el cual puede ser tóxico para la células criopreservadas en altas concentraciones[102].

5.2.4. Bancos de Células Madre Mesenquimales humanas aisladas de diferentes tejidos.

Debido a la capacidad multipotente de las CMMs [103], así como su alta tasa de expansión *in vitro* y propiedades inmunosupresoras, estas células constituyen una útil herramienta terapéutica para varias patologías,[104]. incluyendo, lesiones de la médula espinal[105], hepatopatías[106], e isquemia crítica de las extremidades[107] entre otras, para lo cual se necesita la implementación de laboratorios de almacenamiento especializados o bancos que cuenten con procedimientos estandarizados de preservación y almacenamiento a largo plazo de las CMMs aisladas a partir de diferentes fuentes, con el propósito de emplearlas en futuros tratamientos clínicos[108]. Para dicha implementación, se debe contar en primera instancia con buenas prácticas de manufactura y criterios específicos de calidad que aseguren, la eficiencia, reproducibilidad y seguridad de las células madre almacenadas[108].

Según estándares internacionales, el establecimiento de éstos bancos de CMMs incluye una fase pre-analítica, donde es importante conocer la historia clínica del paciente, si se encuentra bajo tratamiento con fármacos como antibióticos, anticoagulantes, anestésicos, entre otros[109], si es portador de alguna enfermedad infecciosa o genética transmisible[110], adicionalmente después de la selección del paciente que se encuentre dentro de los criterios de inclusión establecidos, este debe firmar un consentimiento informado, donde se explique el uso potencial de la muestra a conservar como alternativa para una posible aplicación clínica futura y el procesamiento de la misma para su almacenamiento en un banco de CMMs[111]. La toma de la muestra y el tiempo entre la recolección hasta que esta se congele, son variables que juegan un papel fundamental en la calidad de la muestra [111], puesto que una preparación inadecuada de la misma puede dar lugar a resultados falsos, dificultades en la interpretación y evaluación incorrecta[112]. Cuando la muestra es transportada al laboratorio, debe ser disgregada mecánicamente y lavada correctamente hasta que el material quede desintegrado y filtrado, posteriormente se extrae el concentrado de células mononucleares (CMNs) de las muestras y se cultivaban durante 4-5 días a 37°C con 5% de CO₂ en medios especiales tales como el medio de Iscove modificado por Dulbecco suplementado con suero fetal bovino (10%) y antibióticos, pasado este tiempo se realizan cambios de medio hasta la obtención de un 80% de confluencia de células adherentes con morfología fibroblastoide, a las

cuales se les realiza desprendimiento celular empleando compuestos enzimáticos como la tripsina, estas CMMs obtenidas, se deben ajustara una densidad de aproximadamente 3×10^3 CMMs/cm² y ser cultivadas nuevamente; antes de iniciar el proceso de criopreservación las muestras deben someterse a pruebas de control de calidad tales como recuento celular, viabilidad (coloración azul tripano), caracterización fenotípica para evaluar la presencia de las proteínas características de estas células como CD73, CD105, CD90 y la ausencia de CD45 Y CD34, por medio de la citometría de flujo, por último se realizan análisis microbiológicos, para verificar la esterilidad de la muestra, a través de pruebas que detecten la presencia de bacterias aerobias o anaerobias (cultivo bacteriano) y *Mycoplasma* (PCR), así como también la presencia de endotoxinas en los sobrenadantes celulares (prueba de lisado de amebocitos de Limulus)[110], después de realizar las pruebas de control de calidad las CMMs, se lleva a cabo la criopreservación de las mismas, a -196°C empleando DMSO al 10% y finalmente el almacenamiento en bancos celulares, donde el papel más importante de estos bancos es mantener la viabilidad, características biológicas y esterilidad de las CMMs almacenadas[113], mediante pruebas de pureza para confirmar que la muestra preservada no esté contaminada de material extracelular, también se realizan pruebas de potencia con el fin de confirmar que la muestra en realidad tiene las funciones biológicas que se requieren para el tratamiento específico y finalmente se llevan a cabo pruebas de identidad que confirmen que los componentes específicos, celulares y demás, están presentes y en la cantidad exacta[114]. Actualmente existen bancos de CMMs derivadas de tejido adiposo, pulpa dental sangre y tejido de cordón umbilical entre otros, en los cuales se utilizan estrategias de criopreservación con DMSO a una concentración del 10% como método estándar de preservación de las CMMs[115].

En cuanto a los bancos de CMMs provenientes de tejido adiposo, las muestras se obtienen generalmente de liposucciones que se le realizan a pacientes, los cuales previamente han firmado un consentimiento informado, estas muestras en la mayoría de los casos son procesadas dentro de las 24 horas después de la recolección; para la criopreservación el tejido extraído se lava con solución salina y adicionalmente se inserta en un contenedor criogénico, al cual se le adiciona lentamente a 4°C DMSO al 20% y albúmina de suero humano al 20%, posteriormente este es colocado en un congelador a -180°C y finalmente se realiza la inmersión final en nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo[116]. Se ha evidenciado que el tejido adiposo humano contiene la mayor concentración de CMMs en el

cuerpo [117], es una fuente conveniente, abundante y fácilmente disponible de CMMs, además el procedimiento de recolección es menos invasivo que otros procedimientos como el de la obtención de CMMs provenientes de aspirado de medula ósea[118].

Por otro lado se encuentran los bancos de CMMs provenientes de pulpa dental extraída de fuentes como el tercer molar, ligamento periodontal o folículos periapicales de los dientes permanentes[119], una vez la muestra es procesada y cultivada, se criopreservan 2×10^6 CMMs/ml mezcladas con DMSO al 10% y SFB al 10%, este procedimiento se realiza en un rango de temperaturas que va desde $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y su efectividad se ha probado al cabo de seis meses donde no se evidenció pérdida de funcionalidad celular[119].

Con respecto a los bancos de CMMs provenientes de sangre y tejido de cordón umbilical, habitualmente las recolecciones de sangre se pueden realizar de la vena umbilical o de la placenta (70-80 ml), la muestra posteriormente es concentrada mediante el empleo de un gradiente de concentración o simplemente por centrifugación para la obtención de la fracción de células mononucleares,[120]. La mayoría de los bancos de sangre de cordón umbilical almacenan unidades de sangre de cordón umbilical en múltiples alícuotas a través de una bolsa de congelación dividida en varios compartimientos, lo que permite el uso futuro de estas las células madre en la expansión celular, terapia génica, o para medicina regenerativa donde únicamente sólo emplea una fracción de la unidad congelada y se evita la generación de efectos nocivos ocasionados por los episodios frecuentes de congelación y descongelación para su uso[117]. Por otra parte la obtención de tejido de cordón umbilical, parece ser una fuente con una cantidad mayor de CMMs en comparación con la de sangre de cordón umbilical[121]. Generalmente se recolectan 10.5 pulgadas de tejido de cordón umbilical procesado durante las primeras 24 horas después de dicha recolección. Antes de llevar a cabo la preservación, el tejido es suspendido en etanol al 70%, y posteriormente lavado con solución salina estéril, una vez realizado este procedimiento la muestra recolectada se debe cortar en pequeños trozos de 5 mm aproximadamente los cuales se mezclan con solución salina que contiene 0,1 mol / L de sacarosa, 20% de plasma autólogo y 1,5 mol / L de DMSO durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, después las muestras se deben congelar a $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ y por último almacenar en nitrógeno líquido[122].

Adicionalmente la creación de estos bancos de CMMs provenientes de los tejidos anteriormente mencionados, tienen ciertas ventajas como su accesibilidad, alta proporción de

CMMs, entre otros en comparación con la obtención, aislamiento y almacenamiento de CMMs provenientes de medula ósea, ya que al ser un procedimiento altamente invasivo, puede causar dolor e incomodidad al paciente, de igual manera, la proporción de CMMs en medula ósea es relativamente baja en comparación con las demás fuentes de obtención y dicha cantidad está sujeta a la edad como al estado de salud del paciente tratado[117].

Actualmente, la fuente mejor caracterizada de CMMs es la medula ósea y la mayoría de los datos clínicos se han basado en estudios de esta misma. Sin embargo, hay limitaciones en cuanto a su utilización por lo cual no se considera viable implementar bancos de CMMs derivadas de esta fuente para su utilización en regeneración de tejidos[115]. Recientemente, otros sitios anatómicos de obtención de CMMs han ganado interés clínico para uso en medicina regenerativa; siendo el tejido adiposo una fuente representativa para la obtención y almacenamiento de estas células, ya que se ha evidenciado que las CMMs provenientes de este tejido poseen características morfológicas, fenotípicas y funcionales similares a las CMMs provenientes de medula ósea[123], además se ha identificado que son estables y expandibles en cultivo a largo plazo, preservando sus características específicas de diferenciación hacia diversos linajes celulares, por lo tanto se ha determinado que el tejido adiposo humano puede representar una fuente de obtención de CMMs autóloga más práctica, en comparación con otras fuentes de obtención[124].

6. CONCLUSIONES:

- Existen diferentes factores del microambiente que favorecen la diferenciación osteogénica de las CMMs, los cuales pueden intervenir en cualquiera de las tres etapas secuenciales que promueven la regeneración de tejido óseo.
- Se analizaron los 4 protocolos terapéuticos utilizados para el trasplante autólogo de CMMs en regeneración ósea, los cuales dependiendo del tipo de técnica utilizada, puede aumentar su eficacia en el tratamiento de lesiones osteocondrales.
- Sobre la criopreservación de las CMMs aisladas de médula ósea, la metodología más efectiva se relaciona con el uso del crioprotector Dimetilsulfóxido (10%) y enfriamiento gradual que garantiza un porcentaje de viabilidad mayor al 90%, tasa metabólica y capacidad de diferenciación a los diferentes linajes (adipocitos, condrocitos, osteocitos) de las CMMs.

7. PERSPECTIVAS

Con el desarrollo de esta monografía se espera aportar información acerca de los diferentes protocolos terapéuticos asociados con autoinjertos y las estrategias de criopreservación de las CMMs con el fin de contribuir a la implementación del uso de autoinjertos de CMMs aisladas de medula ósea en el tratamiento de lesiones osteocondrales en el servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario San Ignacio. Además de dar inicio a futuras investigaciones en humanos donde se pueda establecer la cantidad de CMMs criopreservadas, necesarias para realizar implantación de las mismas en los pacientes que presenten problemas de consolidación ósea, que permitan a su vez reemplazar intervenciones quirúrgicas más complejas y con mayores gastos para los pacientes.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Castillon P, Bartra A, Vallejo G, Salvador J, Torres R, Angles F: **Hip arthroplasty with conventional stem as rescue treatment after failed treatment of intertrochanteric hip fractures.** *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología* 2013, **57**(3):194-200.
2. Marsh D: **Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion.** *Clinical orthopaedics and related research* 1998, **1**(355):S22-30.
3. Baumgaertner MR, Solberg BD: **Awareness of tip-apex distance reduces failure of fixation of trochanteric fractures of the hip.** *The Journal of bone and joint surgery British volume* 1997, **79**(6):969-971.
4. Mortazavi SM, M RG, Bican O, Kane P, Parvizi J, Hozack WJ: **Total hip arthroplasty after prior surgical treatment of hip fracture is it always challenging?** *The Journal of arthroplasty* 2012, **27**(1):31-36.
5. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI: **Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine.** *Experimental & molecular medicine* 2013, **45**(1):54-66.
6. Bachiller FG, Caballer AP, Portal LF: **Avascular necrosis of the femoral head after femoral neck fracture.** *Clinical orthopaedics and related research* 2002, **1**(399):87-109.
7. Ito H: **Clinical considerations of regenerative medicine in osteoporosis.** *Current osteoporosis reports* 2014, **12**(2):230-234.
8. Martínez Rondanelli A: **Factores de riesgo asociados a la mortalidad a un año en pacientes con fracturas de cadera.** *Rev colomb ortop traumatol* 2010, **24**(1):11-18.
9. Pountos I, Giannoudis PV: **Biology of mesenchymal stem cells.** *Injury* 2005, **36**(3):S8-S12.
10. Knight MN, Hankenson KD: **Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration.** *Advances in wound care* 2013, **2**(6):306-316.
11. Zomorodian E, Baghaban Eslaminejad M: **Mesenchymal stem cells as a potent cell source for bone regeneration.** *Stem cells international* 2012, **2012**(1):1-9.
12. Antebi B, Pelled G, Gazit D: **Stem cell therapy for osteoporosis.** *Current osteoporosis reports* 2014, **12**(1):41-47.
13. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: **Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.** *Experimental hematology* 1976, **4**(5):267-274.
14. Kassem M, Abdallah BM: **Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases.** *Cell and tissue research* 2008, **331**(1):157-163.
15. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K: **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006, **24**(5):1294-1301.
16. Fernández Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, Otaegui J, Chasseing NA: **Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved?** *Differentiation* 2013, **85**(1):1-10.
17. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI: **Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use.** *Bone marrow transplantation* 1995, **16**(4):557-564.

18. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, Granton J, Stewart DJ: **Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials.** *PloS one* 2012, **7**(10):e47559.
19. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R *et al*: **Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.** *Experimental hematology* 2002, **30**(1):42-48.
20. Lee RH, Oh JY, Choi H, Bazhanov N: **Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells and tissue repair.** *Journal of cellular biochemistry* 2011, **112**(11):3073-3078.
21. Matthay MA: **Advances and challenges in translating stem cell therapies for clinical diseases.** *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2010, **156**(3):107-111.
22. Kramer J, Dazzi F, Dominici M, Schlenke P, Wagner W: **Clinical perspectives of mesenchymal stem cells.** *Stem cells international* 2012, **2012**(1):1-3.
23. Mahmood A, Wu H, Qu C, Xiong Y, Chopp M: **Effects of treating traumatic brain injury with collagen scaffolds and human bone marrow stromal cells on sprouting of corticospinal tract axons into the denervated side of the spinal cord.** *Journal of neurosurgery* 2013, **118**(2):381-389.
24. Schwarz SC, Schwarz J: **Translation of stem cell therapy for neurological diseases.** *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2010, **156**(3):155-160.
25. Ezquer F, Ezquer M, Simon V, Pardo F, Yanez A, Carpio D, Conget P: **Endovenous administration of bone-marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells prevents renal failure in diabetic mice.** *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2009, **15**(11):1354-1365.
26. Karsenty G, Wagner EF: **Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development.** *Developmental cell* 2002, **2**(4):389-406.
27. Koli K, Ryyänen MJ, Keski-Oja J: **Latent TGF- β binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.** *Bone* 2008, **43**(4):679-688.
28. Sims NA, Vrahnas C: **Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts.** *Archives of biochemistry and biophysics* 2014, **561**(2014):22-28.
29. Fu Q, Jilka RL, Manolagas SC, O'Brien CA: **Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(50):48868-48875.
30. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH: **IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002, **169**(6):3353-3362.
31. Kuhn NZ, Tuan RS: **Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis.** *Journal of cellular physiology* 2010, **222**(2):268-277.
32. Baggiolini M: **Chemokines in pathology and medicine.** *Journal of internal medicine* 2001, **250**(2):91-104.

33. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: **A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.** *Nature* 1997, **385**(6617):640-644.
34. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ: **Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine.** *Science (New York, NY)* 1994, **266**(5189):1395-1399.
35. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA: **Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2001, **16**(6):1004-1014.
36. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA: **Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2003, **18**(9):1584-1592.
37. Carrero R, Cerrada I, Lledo E, Dopazo J, Garcia-Garcia F, Rubio MP, Trigueros C, Dorronsoro A, Ruiz-Sauri A, Montero JA *et al*: **IL1beta induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF-kappaB.** *Stem cell reviews* 2012, **8**(3):905-916.
38. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL: **Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages.** *Journal of hematology & stem cell research* 2000, **9**(6):841-848.
39. Rezaee F, Rellick SL, Piedimonte G, Akers SM, O'Leary HA, Martin K, Craig MD, Gibson LF: **Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway.** *PloS one* 2010, **5**(3):e9690.
40. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J: **Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007, **25**(11):2739-2749.
41. Von Luttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, Djafarzadeh R, Huss R, Nelson PJ: **Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4.** *Stem cells and development* 2005, **14**(3):329-336.
42. Fiedler J, Etzel N, Brenner RE: **To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF.** *Journal of cellular biochemistry* 2004, **93**(5):990-998.
43. Mehrotra M, Krane SM, Walters K, Pilbeam C: **Differential regulation of platelet-derived growth factor stimulated migration and proliferation in osteoblastic cells.** *Journal of cellular biochemistry* 2004, **93**(4):741-752.
44. Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, Motomura H, Nakamura C, Ishizawa S, Fujimori T, Nabeshima Y, Umezawa A, Kanamori M *et al*: **PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2008, **23**(9):1519-1528.
45. Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M: **Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats.** *The British journal of oral & maxillofacial surgery* 2003, **41**(3):173-178.
46. Nair AM, Tsai Y-T, Shah KM, Shen J, Weng H, Zhou J, Sun X, Saxena R, Borrelli Jr J, Tang L: **The effect of erythropoietin on autologous stem cell-mediated bone regeneration.** *Biomaterials* 2013, **34**(30):7364-7371.

47. Jung Y, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI, McCauley LK, Taichman RS: **Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing.** *Bone* 2006, **38**(4):497-508.
48. Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistran R, Muller S, Seifried E, Gille J, Henschler R: **Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells.** *Blood* 2006, **108**(12):3938-3944.
49. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M: **Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair.** *Bone* 2006, **39**(4):678-683.
50. Bielby R, Jones E, McGonagle D: **The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone.** *Injury* 2007, **38** (1):S26-32.
51. Granero-Molto F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, Longobardi L, Jansen ED, Mortlock DP, Spagnoli A: **Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009, **27**(8):1887-1898.
52. Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA: **Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures.** *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2001, **19**(1):78-84.
53. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV: **Current concepts of molecular aspects of bone healing.** *Injury* 2005, **36**(12):1392-1404.
54. Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF: **Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(24):21352-21360.
55. Bonewald LF, Wakefield L, Oreffo RO, Escobedo A, Twardzik DR, Mundy GR: **Latent forms of transforming growth factor-beta (TGF beta) derived from bone cultures: identification of a naturally occurring 100-kDa complex with similarity to recombinant latent TGF beta.** *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 1991, **5**(6):741-751.
56. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB: **Making sense of latent TGFbeta activation.** *Journal of cell science* 2003, **116**(2):217-224.
57. Bonewald LF, Dallas SL: **Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation.** *Journal of cellular biochemistry* 1994, **55**(3):350-357.
58. Kawai M, Rosen CJ: **The Insulin-Like Growth Factor System in Bone: Basic and Clinical Implications.** *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2012, **41**(2):323-333.
59. Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, Crane J, Frassica F, Zhang L, Rodriguez JP: **Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells.** *Nature medicine* 2012, **18**(7):1095-1101.
60. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, Shaughnessy JD, Jr.: **The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease.** *Blood* 2009, **113**(3):517-525.
61. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G: **Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.** *Cell* 1997, **89**(5):747-754.
62. Dobrova G, Chahrouh M, Dautzenberg M, Chirivella L, Kanzler B, Fariñas I, Karsenty G, Grosschedl R: **SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation.** *Cell* 2006, **125**(5):971-986.
63. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B: **The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.** *Cell* 2002, **108**(1):17-29.

64. Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C: **Osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) is an upstream regulator of Satb2 during bone formation.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(38):32995-33002.
65. Smink JJ, Leutz A: **Instruction of mesenchymal cell fate by the transcription factor C/EBPbeta.** *Gene* 2012, **497**(1):10-17.
66. Hong J-H, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA: **TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation.** *Science (New York, NY)* 2005, **309**(5737):1074-1078.
67. Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW, Kim SY, Shin CS: **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(26):23270-23277.
68. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D: **Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts.** *World journal of stem cells* 2013, **5**(4):136-148.
69. Goel A, Sangwan S, Siwach R, Ali AM: **Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union.** *Injury* 2005, **36**(1):203-206.
70. Zamzam MM, Abak AA, Bakarman KA, Al-Jassir FF, Khoshhal KI, Zamzami MM: **Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts.** *International orthopaedics* 2009, **33**(5):1353-1358.
71. Singh AK, Shetty S, Saraswathy JJ, Sinha A: **Percutaneous autologous bone marrow injections for delayed or non-union of bones.** *Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong)* 2013, **21**(1):60-64.
72. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H: **Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells.** *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2005, **87**(7):1430-1437.
73. Gessmann J, Köller M, Godry H, Schildhauer TA, Seybold D: **Regenerate augmentation with bone marrow concentrate after traumatic bone loss.** *Orthopedic reviews* 2012, **4**(14):62-66.
74. Cuervas-Mons M, Narbona J, Laguna R, Vaquero J: **Autologous concentrated bone marrow graft in the treatment of femoral head avascular necrosis: Clinical outcome after two years of follow up in a non-controlled prospective study.** *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition)* 2013, **57**(2):106-110.
75. Sen MK, Miclau T: **Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?** *Injury* 2007, **38** (1):75-80.
76. Bajada S, Harrison P, Ashton B, Cassar-Pullicino V, Ashammakhi N, Richardson J: **Successful treatment of refractory tibial nonunion using calcium sulphate and bone marrow stromal cell implantation.** *Journal of Bone & Joint Surgery* 2007, **89**(10):1382-1386.
77. Hernigou P, Pariat J, Queinnec S, Homma Y, Flouzat Lachaniette CH, Chevallier N, Rouard H: **Supercharging irradiated allografts with mesenchymal stem cells improves acetabular bone grafting in revision arthroplasty.** *International orthopaedics* 2014, **38**(9):1913-1921.
78. Kim JD, Lee GW, Jung GH, Kim CK, Kim T, Park JH, Cha SS, You YB: **Clinical outcome of autologous bone marrow aspirates concentrate (BMAC) injection in degenerative arthritis of the knee.** *European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie* 2014, **1**(1):1393-1399.
79. Fernandez-Bances I, Perez-Basterrechea M, Perez-Lopez S, Nuñez Batalla D, Fernandez Rodriguez MA, Alvarez-Viejo M, Ferrero-Gutierrez A, Menendez-Menendez Y, Garcia-Gala

- JM, Escudero D *et al*: **Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft**. *Cytotherapy* 2013, **15**(5):571-577.
80. Ochs BG, Schmid U, Rieth J, Ateschrang A, Weise K, Ochs U: **Acetabular bone reconstruction in revision arthroplasty A COMPARISON OF FREEZE-DRIED, IRRADIATED AND CHEMICALLY-TREATED ALLOGRAFT VITALISED WITH AUTOLOGOUS MARROW VERSUS FROZEN NON-IRRADIATED ALLOGRAFT**. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 2008, **90**(9):1164-1171.
81. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA: **Cell based bone tissue engineering in jaw defects**. *Biomaterials* 2008, **29**(21):3053-3061.
82. Kim S-J, Shin Y-W, Yang K-H, Kim S-B, Yoo M-J, Han S-K, Im S-A, Won Y-D, Sung Y-B, Jeon T-S: **A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron™) injection to treat fractures**. *BMC musculoskeletal disorders* 2009, **10**(1):20.
83. Giannotti S, Trombi L, Bottai V, Ghilardi M, D'Alessandro D, Danti S, Dell'Osso G, Guido G, Petrini M: **Use of autologous human mesenchymal stromal cell/fibrin clot constructs in upper limb non-unions: long-term assessment**. *PloS one* 2013, **8**(8):e73893.
84. Wongchuensoontorn C, Liebehenschel N, Schwarz U, Schmelzeisen R, Gutwald R, Ellis III E, Sauerbier S: **Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible—a case report**. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2009, **37**(3):155-161.
85. Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, Liu B, Yu X: **Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells**. *Bone* 2012, **50**(1):325-330.
86. Wong KL, Lee KB, Tai BC, Law P, Lee EH, Hui JH: **Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up**. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2013, **29**(12):2020-2028.
87. Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N: **Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings**. *Journal of pediatric orthopedics* 2009, **29**(6):643-649.
88. Yamaguchi DT: **"Ins" and "Outs" of mesenchymal stem cell osteogenesis in regenerative medicine**. *World journal of stem cells* 2014, **6**(2):94-110.
89. Day JG, Stacey G: **Cryopreservation and freeze-drying protocols**, vol. 368: Springer; 2007.
90. Hunt CJ: **Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review**. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2011, **38**(2):107-123.
91. Brockbank KG, Taylor MJ: **Tissue Preservation**. *Advances in biopreservation* 2006, **8**(2):177-180.
92. Takahashi T, Hirsh A, Erbe EF, Bross JB, Steere RL, Williams RJ: **Vitrification of human monocytes**. *Cryobiology* 1986, **23**(2):103-115.
93. Almqvist K, Wang L, Broddelez C, Veys E, Verbruggen G: **Biological freezing of human articular chondrocytes**. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001, **9**(4):341-350.
94. Shen JL, Huang YZ, Xu SX, Zheng PH, Yin WJ, Cen J, Gong LZ: **Effectiveness of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow cryopreserved for 23-25 years**. *Cryobiology* 2012, **64**(3):167-175.
95. Li Y, Ma T: **Bioprocessing of Cryopreservation for Large-Scale Banking of Human Pluripotent Stem Cells**. *BioResearch Open Access* 2012, **1**(5):205-214.

96. Hunt CJ: **Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2011, **38**(2):107-123.
97. Hirose M, Kotobuki N, Machida H, Kitamura S, Ohgushi H, Tateishi T: **Osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells after thawing in culture.** *Materials Science and Engineering: C* 2004, **24**(3):355-359.
98. Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, Shelton RM, Scheven BA: **The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues.** *Cryobiology* 2014, **69**(2):342-347.
99. Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, Dezawa M: **Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells.** *Nature protocols* 2013, **8**(7):1391-1415.
100. Ginis I, Grinblat B, Shirvan MH: **Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium.** *Tissue engineering Part C, Methods* 2012, **18**(6):453-463.
101. Pravdyuk AI, Petrenko YA, Fuller BJ, Petrenko AY: **Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells.** *Cryobiology* 2013, **66**(3):215-222.
102. Matsumura K, Hayashi F, Nagashima T, Hyon SH: **Long-term cryopreservation of human mesenchymal stem cells using carboxylated poly-L-lysine without the addition of proteins or dimethyl sulfoxide.** *Journal of biomaterials science Polymer edition* 2013, **24**(12):1484-1497.
103. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science (New York, NY)* 1999, **284**(5411):143-147.
104. Doorn J, Moll G, Le Blanc K, van Blitterswijk C, de Boer J: **Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements.** *Tissue engineering Part B, Reviews* 2012, **18**(2):101-115.
105. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE *et al*: **Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury.** *Journal of neurotrauma* 2012, **29**(8):1614-1625.
106. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, Piscaglia AC, Gasbarrini GB, D'Ugo DM, Gasbarrini A: **Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury.** *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, **2011**(1):1-8.
107. Ishikane S, Ohnishi S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kitamura S, Nagaya N *et al*: **Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008, **26**(10):2625-2633.
108. Unger C, Skottman H, Blomberg P, Dilber MS, Hovatta O: **Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines.** *Human molecular genetics* 2008, **17**(1):48-53.
109. McCarty CA, Wilke RA: **Biobanking and pharmacogenomics.** *Pharmacogenomics* 2010, **11**(5):637-641.
110. Cooper K, Viswanathan C: **Establishment of a mesenchymal stem cell bank.** *Stem cells international* 2011, **2011**(1):1-8.
111. Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, Spangenberg J, Zornig C, Juhl HH, David KA: **Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision.** *BioTechniques* 2004, **36**(6):1030-1037.

112. Artene S-A, Ciurea ME, Purcaru SO, Tache DE, Tataranu LG, Lupu M, Dricu A: **Biobanking in a constantly developing medical world.** *The Scientific World Journal* 2013, **2013**(1):1-5.
113. Wang Y, Han ZB, Song YP, Han ZC: **Safety of mesenchymal stem cells for clinical application.** *Stem cells international* 2012, **2012**(1):1-4.
114. Carmen J, Burger SR, McCaman M, Rowley JA: **Developing assays to address identity, potency, purity and safety: cell characterization in cell therapy process development.** *Regenerative medicine* 2012, **7**(1):85-100.
115. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ: **Clinical grade adult stem cell banking.** *Organogenesis* 2009, **5**(3):143-154.
116. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT: **Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine.** *The Journal of surgical research* 2014, **187**(1):24-35.
117. Harris DT: **Stem Cell Banking for Regenerative and Personalized Medicine.** *Biomedicines* 2014, **2**(1):50-79.
118. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH: **Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.** *Trends in biotechnology* 2006, **24**(4):150-154.
119. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS: **Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use.** *Cryobiology* 2009, **59**(2):150-157.
120. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE: **Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution.** *Blood* 1993, **81**(7):1679-1690.
121. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, Igura K, Satoh H, Yokomi I, Nishimura T: **Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue.** *Journal of cellular biochemistry* 2011, **112**(4):1206-1218.
122. Pilz GA, Ulrich C, Ruh M, Abele H, Schäfer R, Kluba T, Bühring H-J, Rolaufts B, Aicher WK: **Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.** *Stem cells and development* 2010, **20**(4):635-646.
123. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *Molecular biology of the cell* 2002, **13**(12):4279-4295.
124. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** *Tissue engineering* 2001, **7**(2):211-228.