

Implante de Células Troncales Autólogas Derivadas del Tejido Adiposo en Fracturas Óseas de Ratas

Implantation of Autologous Stem Cells Derived from Adipose Tissue in Rat Bone Fractures

Carolina Smok*; Manuel Meruane** & Mariana Rojas*

SMOK, C.; MERUANE, M. & ROJAS, M. Implante de células troncales autólogas derivadas del tejido adiposo en fracturas óseas de ratas. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 1(2):105-115, 2014.

RESUMEN: Las células troncales derivadas del tejido adiposo (ASCs) corresponden a un gran avance en lo que respecta a la medicina regenerativa ósea, ya que poseen la habilidad de autorenovación, estimulación paracrina y diferenciación hacia varios tipos de tejidos, incluyendo hueso y cartílago. La hipótesis del presente estudio considera que en fracturas tratadas con ASCs, disminuye el tiempo de regeneración ósea y aumenta la vascularización, teniendo como objetivo evaluar histológicamente la regeneración ósea y vascularización en estas fracturas. Se utilizaron 24 ratas machos juveniles Sprague Dawley, divididas en dos grupos: A (tratadas) y B (control). En ambos grupos, seis ratas se eutanasiaron a los 11 y 21 días post fractura. Se observó una diferencia significativa en cuanto al número de trabéculas neoformadas y densidad vascular en el grupo tratado en relación al grupo control, concluyendo que las ratas tratadas con ASCs presentan una mayor tasa angiogénica y mejor reparación ósea, dada principalmente por la capacidad de síntesis de los componentes de la matriz extracelular de estas células, y por la producción de factores angiogénicos y de crecimiento.

PALABRAS CLAVE: Regeneración; Células madre; Tejido adiposo; Fracturas óseas.

INTRODUCCIÓN

La célula madre o troncal, es una célula indiferenciada capaz de autoreplicarse por largos períodos de tiempo y diferenciarse en un amplio rango de células especializadas dependiendo del medio que la rodea (citoquinas, factores de crecimiento, etc.) y su consecuente alteración de la expresión génica (Rojas & Meruane, 2012). Existen células troncales embrionarias (ECSs) y adultas (MSCs). Las embrionarias no se consideran en la práctica por razones éticas. Dentro de las adultas, las más estudiadas son las obtenidas de la médula ósea (BMSCs), del cordón umbilical (UCB-MSCs) y las derivadas del tejido adiposo (ASCs) (Mizumo, 2009; Meruane & Rojas, 2010; Shoji *et al.*, 2010).

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

* Laboratorio de Embriología Comparada, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

MSCs, al carecer de HLA II, además tienen la habilidad de suprimir la reacción linfocítica mixta, en consecuencia se las puede injertar en forma alogénica (Puissant *et al.*; Uccelli *et al.*, 2007).

El tejido adiposo es reconocido actualmente como un órgano endocrino que secreta adiponectina, leptina y otras adipocinas con efectos fisiológicos y es el que presenta mayores cambios en volumen a lo largo de la vida (Gimble *et al.*, 2007). Las células derivadas del tejido adiposo presentan la menor complejidad para su aislamiento, ya que permite obtener de forma fácil, con mínimo discomfort para el paciente un gran número de células que pueden proliferar en cultivo (Zuk *et al.*, 2001). Gimble *et al.* sugiere ciertas características que deben poseer las ASCs para hacerlas ideales en su utilización con fines médicos: 1. Pueden ser encontradas en cantidades muy abundantes (millones a billones de células). 2. Pueden ser aisladas con procedimientos mínimamente invasivos. 3. Se pueden diferenciar en múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible. 4. Pueden ser efectivamente transplantadas en forma autóloga o alogénica. 5. Pueden ser manipuladas de acuerdo a las actuales Guías de Buena Práctica.

En equinos, se han utilizado células madres derivadas de células adiposas (ASCs), en el tratamiento de lesiones ortopédicas, tales como desgarros de tendón, fracturas y degeneración de cartílago (Herther, 2001; Litzke *et al.*, 2004). Las ASCs producen factores que promueven la regeneración de los tejidos mediante la estimulación de la angiogénesis, y la activación de las células madre residentes de una manera paracrina (Puissant *et al.*; Del Bue *et al.*, 2008; Maredziak *et al.*, 2014). Los adelantos en estudios con ASCs en lesiones ortopédicas, son mayores en animales domésticos debido a que la medicina veterinaria posee regulaciones menos severas a la hora de tratar a los animales con terapias experimentales. Las células madre adultas, tienen la ventaja de que son fáciles de obtener, y como vienen del mismo animal, no hay posibilidad de rechazo.

El proceso que está involucrado con el uso de estas células para tratar la artritis en los perros es relativamente simple. El primer paso

es la recolección de aproximadamente 15 g de tejido adiposo que se obtienen de la región inguinal, la región torácica, o la grasa falciforme, este es un procedimiento quirúrgico que requiere que el perro sea anestesiado. Luego se cultivan las células adiposas y 48 horas después puede ser inyectado en las articulaciones afectadas. La inyección de las células se puede hacer con sólo sedación. Los resultados se observan alrededor de un mes más tarde y pueden durar varios meses a más de un año en algunos pacientes (Black *et al.*, 2007). Una serie de estudios en animales (Bruder *et al.*, 1998; Kon *et al.*, 2000; Herthel; Smith *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2007; Arrigoni *et al.*, 2009) han demostrado que estas terapias con células madre son efectivas. Sin embargo, estos estudios no han sido aplicados aun para tratar en forma rutinaria las patologías de animales mascotas como gatos y perros, debido a que no se ha entregado la suficiente información sobre los cambios microscópicos de los tejidos involucrados y los posibles efectos secundarios.

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

de crecimiento, hormonas y citoquinas. En este proceso va a ser fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil *et al.*).

La hipótesis de este estudio es que el número de trabéculas formadas y la vascularización es mayor en las fracturas tratadas con ASCs versus fracturas no tratadas con ASCs. Los objetivos fueron reconocer y describir el tejido osteoide nuevo que se ha formado después de la transferencia de células adiposas y comparar la neoformación de vasos sanguíneos en el área tratada con ASCs y sin ellas.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 24 ratas machos juveniles Sprague Dawley, clínicamente sanos, con un peso promedio de 270 g, obtenidos en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los ejemplares se dividieron en dos grupos: A (con ASC's) y B (control). En ambos grupos 6 ratas se eutanasiaron a los 11 días luego de la fractura inducida mediante intervención quirúrgica y 6 a los 21 días después de la intervención quirúrgica. A cada rata se le induce una fractura ósea completa en el fémur izquierdo y posteriormente se le agrega 0,2 ml de medio de cultivo más ASCs autólogas (grupo A), y sin ASCs (grupo B).

Todo el procedimiento fue realizado según las normas bioéticas del ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, para la experimentación con animales de laboratorio (protocolo CBA #420 FMUCH). En este estudio hubo un especial cuidado en mantener el bienestar de los animales. Se consideró el principio de las tres R de Russell & Burch (1959). Los procedimientos quirúrgicos y cuidados posteriores fueron realizados por dos médicos veterinarios y un médico con especialidad en cirugía. Se utilizó la pauta de supervisión de animales propuesto por Morton & Griffiths (1985) que permite cuantificar el dolor y aflicción del animal con el fin de aliviarlos rápidamente. Este protocolo consideró las siguientes cinco características: peso, aspecto corporal, comportamiento espontáneo, comportamiento frente a la manipulación y frecuencia cardíaca o respiratoria.

Fase 1 prequirúrgica. En esta fase se obtuvo el tejido adiposo de cada rata. Se suministró preoperatoriamente penicilina benzatina 40.000 U/kg IM (Penicilina G benzatina, Laboratorio Chile). La anestesia se administró en forma intraperitoneal y consiste en una solución compuesta de Ketamina 80 mg/kg (Ketamina 50, Holliday – Scott S.A.) y Xilacina 8 mg/kg (Acedan inyectable, Holliday – Scott S.A.), permitiendo un tiempo de anestesia profunda entre 30 a 45 min. Se realizó una incisión de 2 cm en la región inguinal izquierda disecando el panículo adiposo subcutáneo derecho, obteniendo una pieza con un peso promedio de 1,42 g, la cual se corta en múltiples fragmentos. Se realiza hemostasia, y se sutura la incisión en 1 plano con seda 4.0.

Fase 2 laboratorio. El tejido adiposo fraccionado se lavó con solución buffer-fosfato 1x (PBS) y se procedió a la digestión de la matriz extracelular con 0,075% de colagenasa II a 37°C durante 1 h. Posteriormente, para neutralizar e inactivar la enzima, se agregó un volumen equivalente de medio de cultivo, constituido por Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco®) con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibióticos. Las muestras se centrifugaron a 1200 g por 10 minutos, obteniéndose un precipitado de alta densidad. El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo. La solución obtenida del pellet resuspendido fue sembrada en una placa de cultivo celular de 100 x 20 mm. Las placas son mantenidas en incubadora por 48 h a 37°C y 5% CO₂. A las 48 h se pudo observar la adherencia de la ASCs a la superficie del plástico. Con el fin de pasar al segundo pasaje, se procedió a la tripsinización de la muestra a 37°C por 5 minutos, luego se neutralizó, centrifugó y resuspendió dentro de una nueva placa, manteniéndose en condiciones de cultivo por 72 h.

Fase 3 quirúrgico. Finalizadas las 72 h de incubación, se procedió a la tripsinización, neutralización y centrifugación de la muestra, obteniéndose un pellet que fue resuspendido en 0,2 ml de medio de cultivo, conservándose en la incubadora mientras se realiza la cirugía. Utilizando la misma técnica anestésica (Ketamina-Xilacina), se realizó la incisión en la región medial del muslo izquierdo para lograr una fractura completa a nivel de la diáfisis del fémur me-

dian­te el uso de una gubia quirúrgica. Para ac­ceder a este nivel, se pro­ce­dió a reali­zar una disección de los mús­cu­los ubi­ca­dos a nivel me­dial, hasta la vi­su­ali­za­ción de la pro­tu­beran­cia del fémur, bajo el cual se reali­zó la frac­tu­ra. En este pun­to se im­plan­tó el me­dio de cul­ti­vo más ASC's autó­lo­gas en 12 ratas (6 de cada grupo), y 0,2 ml de me­dio de cul­ti­vo sin cé­lu­las a las otras 12 ratas. Como me­dio de fi­ja­ción y es­ta­bi­li­za­ción de la frac­tu­ra, se uti­li­zó (a mo­do de cla­vo me­du­lar) una agu­ja 25G es­té­ril.

Fase 4 postoperatorio. Una vez reali­za­do cada pro­ce­di­mien­to se ve­ri­fica la fre­cuen­cia res­pi­ra­to­ria y man­te­ni­en­do es­pe­cial pre­o­cu­pa­ción por con­ser­var su tem­pe­ra­tu­ra cor­po­ral, para lo cual se uti­li­zó una lám­pa­ra de luz in­can­de­scen­te. Lue­go de in­gre­sar a la jau­la, cada rata se man­tu­vo con ali­men­ta­ción y agua ad li­bi­tu­m. Se su­mi­nis­tró Me­ta­mi­zol Só­di­co (Di­pi­ro­na, La­bo­ra­to­rio Chi­le) como anal­ge­sia in­tra­mus­cu­lar, en una do­sis de 25 mg/kg.

Fase 5. Eutanasia y obtención del fémur con fractura. La eu­ta­na­sia se reali­zó con Ti­o­pen­tal Só­di­co (Ti­o­pen­tal só­di­co 1G, Ri­ch­mond, Di­vi­sión Ve­te­ri­na­ria S.A.) vía in­tra­pe­ri­to­neal, en do­sis de 90 mg/kg de pe­so cor­po­ral. Una vez com­pro­ba­da la ausen­cia de sig­nos vi­ta­les, se pro­ce­dió a di­se­car la mus­cu­la­tu­ra aso­cia­da al fémur, el cual fue fi­ja­do en for­ma­li­na 10% tam­pona­da para su pos­te­rior es­tu­dio his­to­ló­gi­co.

Fase 6. Técnica histológica. Las mues­tras fue­ron fi­ja­das con for­ma­li­na al 10%. Lue­go se pro­ce­dió a: i) des­cal­ci­fi­ca­ción con Áci­do Ní­tri­co 3% por 24 h, ii) La­va­do en agu­a cor­ri­en­te por 2 h, iii) Des­hi­dra­ta­ción en ba­te­ría de 3 al­co­ho­les as­cen­den­tes hasta 95 gra­dos 1 ho­ra c/u y iv) ba­te­ría de 3 xilol por 1 h c/u. Las mues­tras fue­ron in­clu­i­das en pa­ra­plast y cor­ta­das sa­gi­tal­men­te a cin­co mi­cro­nes de es­pe­sor en for­ma se­ria­da con un mi­cró­to­mo (MICROM HM315). Los cor­tes fue­ron ad­he­ri­dos a los por­ta­ob­je­tos si­la­ni­za­dos con kit de mon­ta­je (Protex®) so­bre un ba­ño de agu­a (Ba­ño de pa­ra­fi­na 1052, GFL). Es­tos cor­tes se pro­ce­sa­ron con té­cni­cas his­to­ló­gi­cas: He­ma­to­xi­li­na-Eo­sin-azul de Alcían y Tri­có­mi­co de Mal­lo­ry.

Fase 7. Estudio microscópico de la muestra (mm²). Se uti­li­zó un mi­cro­scopio óp­ti­co (Carl Zeiss) con cá­ma­ra in­cor­po­ra­da (Canon

Power Shot A640). El aná­li­sis de las imá­ge­nes, la cuan­ti­fi­ca­ción de las tra­bé­cu­las óseas nue­vas y la den­si­dad vas­cu­lar se efec­tuó con el pro­gra­ma in­for­má­ti­co para mor­fo­me­tría (STEPanizer final ver­sion 1, sub­ver 0.22), uti­li­zan­do el mé­to­do di­se­ctor. Para con­tar las tra­bé­cu­las se to­ma­ron imá­ge­nes con un au­men­to de 400X. En este caso se uti­li­zó el sis­te­ma de prue­ba con lí­neas cua­dri­cu­la­das, y se con­si­de­ra­ron to­das las neo­tra­bé­cu­las que se ubi­can den­tro de los 9 cua­dran­tes cen­tra­les. En cam­bio para me­dir la den­si­dad vas­cu­lar, el au­men­to de las imá­ge­nes fue de 100X, y se usó un sis­te­ma de prue­ba con lí­neas pa­res. En este caso se con­si­de­ra dos ve­ces el nú­me­ro de in­ter­se­c­io­nes de los va­so­sa­n­guí­neos con es­tas lí­neas, di­vi­di­do por la lon­gi­tud to­tal de las lí­neas, ex­pre­san­do sus re­sul­ta­dos en $\mu-1$.

Fase 8. Estudio estadístico. Los re­sul­ta­dos se ex­pre­san en pro­me­dios. Se uti­li­zó la prue­ba de t-stu­dent para mues­tras pa­rea­das con el ob­je­to de de­ter­mi­nar di­fe­ren­cias es­ta­dís­ti­cas sig­ni­fi­ca­ti­vas. Un va­lor de $p < 0,05$ fue con­si­de­ra­do es­ta­dís­ti­ca­men­te sig­ni­fi­ca­ti­vo.

RESULTADOS

Las 24 ratas se man­tu­vie­ron en bue­nas con­di­cio­nes de sa­lud. La pér­di­da de pe­so fue in­fe­rior al 10%. El as­pec­to cor­po­ral se carac­te­ri­zó por una pos­tu­ra nor­mal, no hu­bo sig­nos de des­hi­dra­ta­ción y el pe­la­je no su­frió mo­di­fi­ca­ción al­gu­na. El com­por­ta­mien­to espón­ta­neo fue nor­mal y los ani­ma­les se des­pla­za­ron ade­cua­da­men­te en sus jau­las, El com­por­ta­mien­to fren­te a la ma­ni­pu­la­ción como tam­bién la fre­cuen­cia car­dí­aca y res­pi­ra­to­ria fue­ron nor­ma­les. No se ob­ser­va­ron sig­nos de in­fec­ción ni in­fla­ma­ción ex­ce­si­va en los si­tios de in­ter­ven­ción qui­rúrgica.

Desarrollo de la técnica de obtención de ASCs en rata. En el pri­mer pa­sa­je del cul­ti­vo, a los 2 días de su ex­tra­cción, se ob­ser­vó la ad­he­sión de las cé­lu­las al plás­ti­co. Su mor­fo­lo­gía va­ria­ba en­tre cé­lu­las po­li­é­dri­cas, y cé­lu­las con pro­lon­ga­cio­nes ci­to­plasmá­ti­cas. Se ob­tu­vo un pro­me­dio de $4,77 \times 10^5$ cé­lu­las/ml. Lue­go del se­gun­do pa­sa­je, las cé­lu­las ad­he­ri­das mos­tra­ron una mor­fo­lo­gía si­mi­lar a cé­lu­las me­sen­qui­má­ti­cas,

presentando múltiples prolongaciones celulares. Además se evidencia la presencia de varias gotas lipídicas en su interior.

Se evidenció la presencia del callo óseo regenerativo en el 100% de los fémures extraídos. A los 11 días se observó en los individuos de ambos grupos un hematoma propio de la regeneración, mientras que a los 21 días, en el grupo tratado había sido reemplazado casi en su totalidad por tejido de granulación, no así en el grupo control. El callo se encuentra constituido principalmente por tejido conectivo denso, muy vascularizado y con gran cantidad de células de aspecto mesenquimal en el sitio de la fractura. Éste se puede formar directamente desde el periostio o del hueso preformado del borde de la fractura. En un inicio se conforma como callo blando, con variables focos de tejido cartilaginoso, que se generan sin establecer un patrón espacial dentro del callo, para luego ser reemplazado por trabéculas óseas, sin embargo, al final del estudio aún no alcanza el desarrollo completo de un callo óseo. También se forman nuevas trabéculas desde el periostio.

A los 11 días, se evidencia tanto en el grupo tratado con ASCs como en el grupo control, un callo perióstico blando de composición heterogénea, con cartílago hialino y tejido óseo (Fig. 1). En el grupo control de 11 d, se observan condrocitos conformando grupos isógenos en una matriz homogénea, como también células

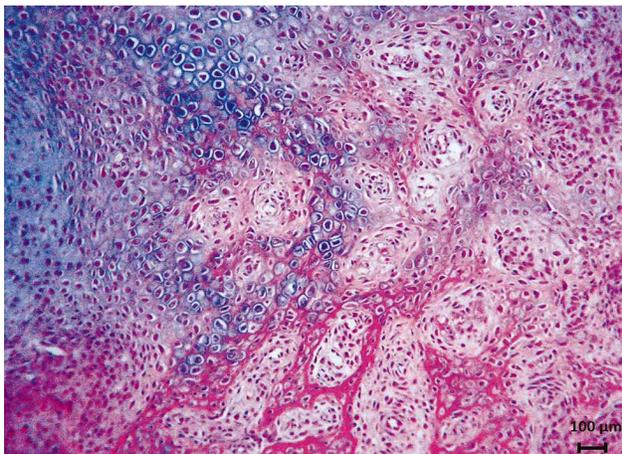


Fig. 1. Grupo control 11 d. Se observa formación de cartílago hialino similar a cartílago de crecimiento constituido por condrocitos aplanados, condrocitos hiperplásicos e hipertróficos como también formación de trabéculas y espacios medulares primitivos sanguíneos H-E azul Alcian.

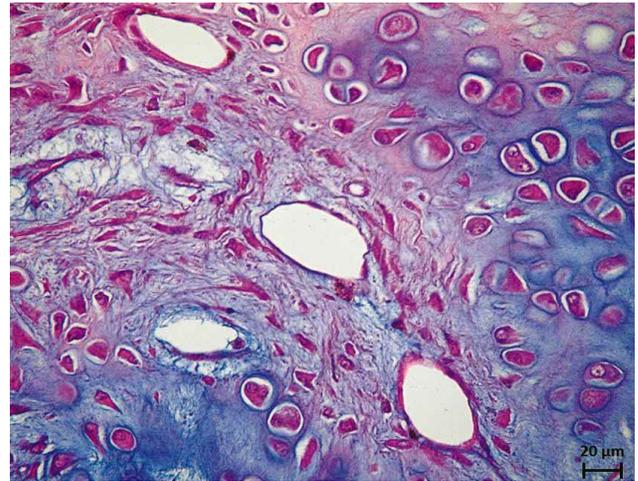


Fig. 2. Grupo control 11 d. Se observa condrocitos inmersos en matriz homogénea conformando grupos isógenos, como también células mesenquimales en una matriz más fibrosa y capilares sanguíneos, Hematoxilina-Eosina-Azul de Alcian.

mesenquimales de aspecto estrellado o fusiforme en una matriz fibrosa y capilares sanguíneos (Figs; 1 y 2). Entre las zonas cartilaginosas hay tejido conectivo y de granulación. En el grupo tratado con ASCs y evaluado a los 11d se identifican células cromofobas de núcleos bien definidos que contienen el ADN en forma de eucromatina o heterocromatina, además presentan uno o dos nucléolos prominentes (Fig. 3). En ambos grupos, se observa un centro fibroso dentro del foco cartilaginoso, constituido

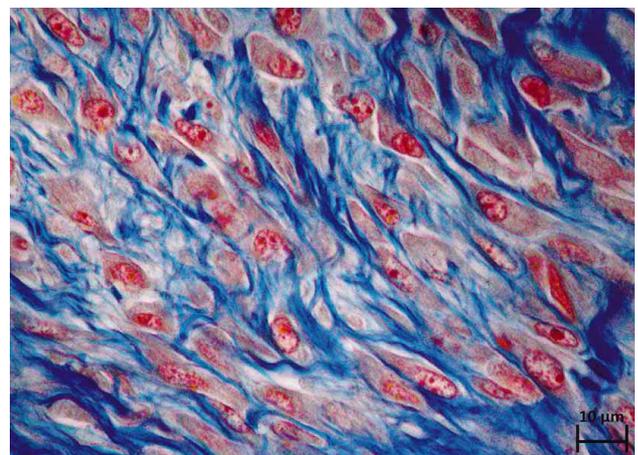


Fig. 3. Grupo tratado con células ASCs y evaluado a los 11 días. Células mesenquimales elaborando matriz extracelular y constituyendo el callo. Estas células presentan un núcleo bien definido que contiene el ADN en forma de eucromatina o heterocromatina, además presentan uno o dos nucléolos prominentes Técnica Tricrómico.

por tejido conectivo denso con capilares sanguíneos y células mesenquimales (Fig. 4).

En el grupo tratado con ASCs y evaluados 21 d después, se observa la formación de nuevas trabéculas óseas desde el periostio celular. Se constituyen además nuevos espacios medulares (Fig. 5). El tejido conjuntivo circundante a la zona de fractura se continúa con el periostio fibroso.

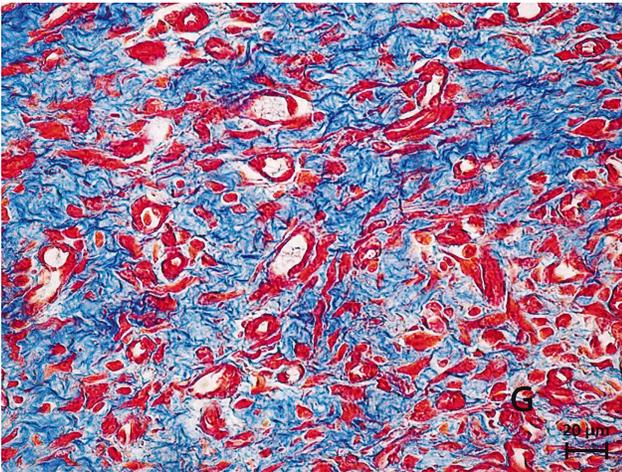


Fig. 4. Grupo control 11 días. Se observa tejido conectivo denso (azul) con múltiples capilares sanguíneos y algunas células de aspecto mesenquimal. Técnica tricrómico.

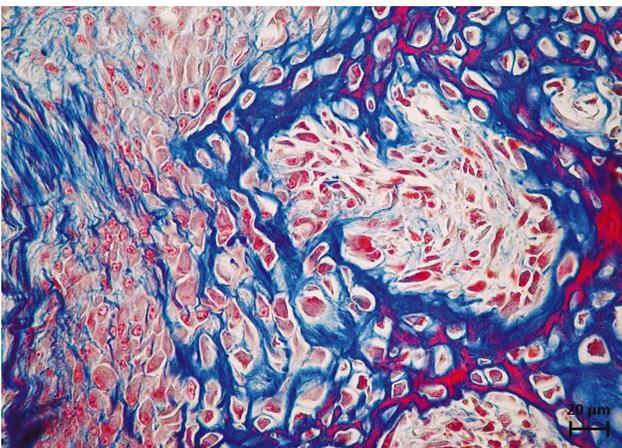


Fig. 5. Grupos tratado con células ASCs y evaluados 21 días después. Formación de nuevas trabéculas óseas desde el periostio celular. Las células osteógenas y osteoblastos producen matriz extracelular quedando incluidas en ella. Se constituyen además nuevos espacios medulares. Técnica Tricrómico.

La neoformación de trabéculas óseas mostró diferencia significativa, siendo mayor en las

ratas tratadas que en las ratas del grupo control. Esta diferencia se observó tanto a los 11 como a los 21 días de tratamiento. El estudio comparativo dentro de un mismo grupo, arrojó resultados con significancia estadística significativa en el grupo tratado, siendo mayor el número de trabéculas a los 21 días que a los 11 días. La comparación dentro del grupo control no arrojó resultados con significancia estadística (Fig. 7).

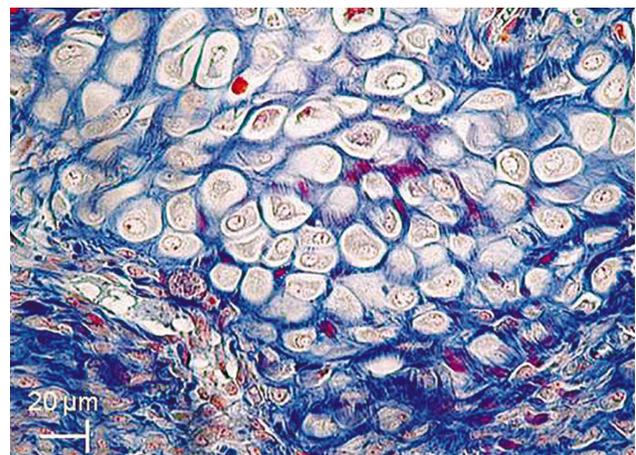


Fig. 6. Grupo control 21 días. Se observa condrocitos. Técnica Tricrómico, 400X.

En relación a la determinación de la densidad vascular las pruebas estadísticas arrojaron un valor significativamente mayor en grupos tratados con ASCs en comparación con los controles sin ASCs tanto a los 11 como a los 21 días. Esta diferencia también fue significativa al comparar los días 11 y 21 del grupo tratado, no así el grupo control (Fig. 8).

DISCUSIÓN

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

Para lograr esto se desarrolla la técnica de obtención de ASCs de acuerdo al protocolo descrito por Meruane & Rojas. La obtención de

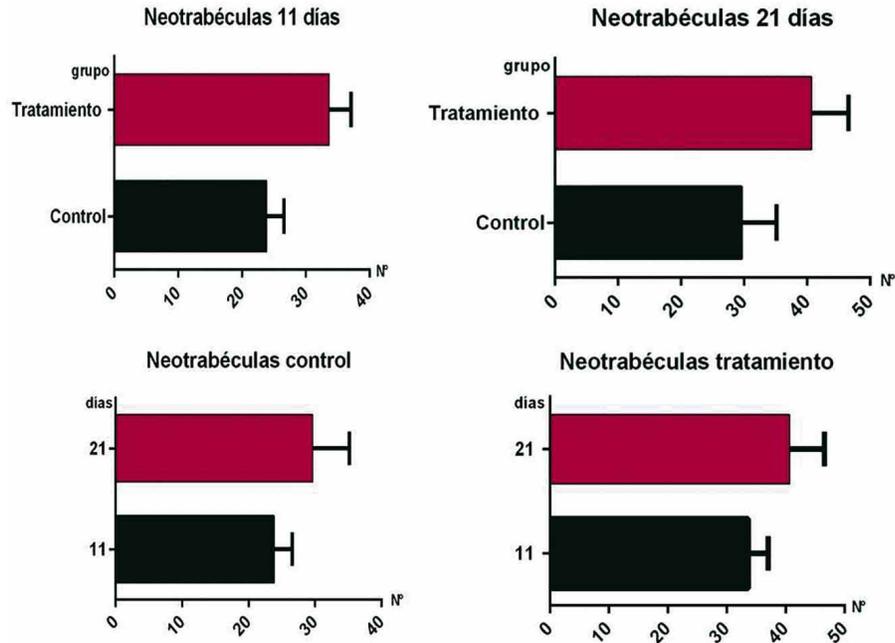


Fig. 7. Los grupos tratados con ASCs presentaron mayor número de trabéculas nuevas en comparación con el control, tanto a los 11 ds como a los 21 días después de la lesión. A los 21 días existe un mayor número de trabéculas nuevas que a los 11 días tanto en el grupo control como en el grupo tratado.

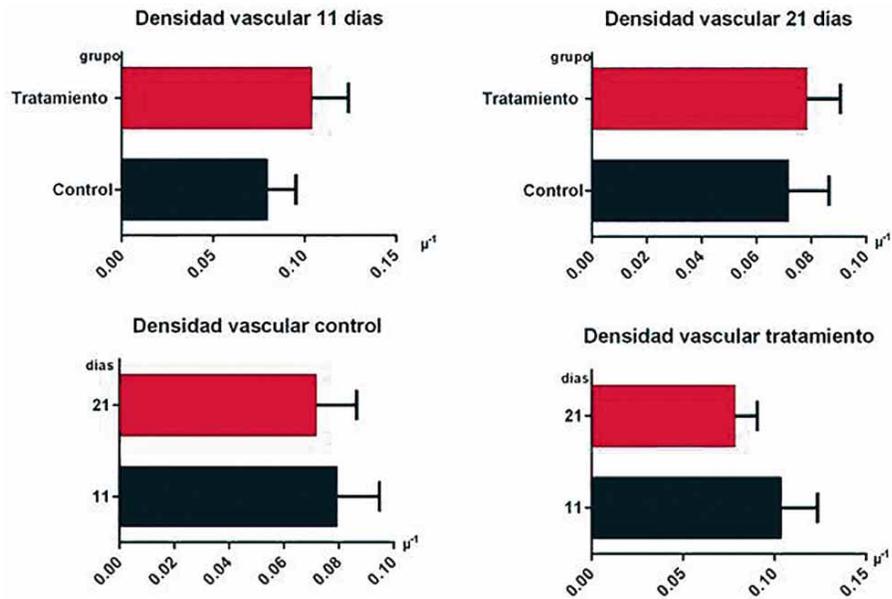


Fig. 8. Densidad vascular en animales tratados con ASCs y sin ASCs estudiados a los 11 y 21 días posteriores a la fractura. Se observa un aumento significativo en la densidad vascular en animales tratados con ASCs. Existe una mayor densidad de vasos a los 11 días después de la lesión y esta disminuye con el tiempo.

ASCs fue exitosa, ya que se obtuvo un promedio de 5×10^5 /ml células en el primer pasaje de un cultivo realizado con un promedio de 1,4 g de tejido adiposo, logrando una concentración muy similar a lo descrito por este autor. En el primer pasaje del cultivo se observó células adheridas al plástico, coincidiendo con el estudio de obtención de ASCs de Baer & Geiger (2012). En relación a las gotas lipídicas, Kou *et al.* (2014) informan que luego de 2 semanas estas gotas se pierden, y con respecto a las células pequeñas redondas que se encontraron en esta generación, Taghi *et al.* (2012) mencionan que desaparecen a partir del segundo pasaje, obteniendo células similares histológicamente (Gaiba *et al.*, 2012).

A los 11 días es posible observar un callo perióstico constituido por tejido cartilaginoso y óseo. Este último se desarrolla de forma no laminillar, coincidiendo con el estudio de Weatherholt *et al.* (2013). Otros autores como McKibbin, Epari *et al.* (2006) y Claes *et al.* (2012) sugieren que este callo se forma entre los 7 a 10 días luego de la fractura, el cual aumenta de tamaño con el movimiento interfragmentario hasta alcanzar su máximo a los 14 días post fractura (Claes *et al.*, 2006, 2012). Este tejido, que comienza a formarse en una región donde no está ni el periostio ni la vascularización interrumpida (Utvag *et al.*, 2003).

Knight & Hankenson (2013) observaron que tanto el cartílago como el hueso eran originados a partir del periostio. La regeneración que se produjo en las ratas de este estudio a partir del periostio, en el cual éste es capaz de proveer osteoblastos y nutrientes, coincide con lo descrito por Ito *et al.* (2014). La vascularización, que permite el inicio de la osificación, proviene desde el periostio y el tejido conectivo circundante. Nakahara *et al.* (1990) y Claes *et al.* (2012) creen que todos los osteoblastos involucrados en la osificación membranosa derivan de células precursoras periostales, al igual que Weatherholt *et al.*, quienes afirman que no se observan MSCs en el endostio, y Chang *et al.* (2012) y Colnot *et al.* (2012). En nuestro estudio se evidenció que estas células osteógenas provienen tanto del periostio, como del endostio de trabéculas formadas, al igual que lo observado por Knight & Hankenson.

Se evidenció un aumento significativo en

el número de neotrabéculas y neovasos formados, lo que nos sugiere una actividad sintetizadora por parte de las células multipotenciales obtenidas a partir del tejido adiposo. Apoyando esta observación un grupo de investigadores (Amable *et al.*, 2014) observaron la capacidad de estas células de sintetizar proteínas colágenas in vitro, y encontraron que las células mesenquimáticas multipotenciales derivadas del tejido adiposo secretan mayores concentraciones de colágeno I y III, en relación a las células multipotenciales derivadas de la médula ósea, y de cordón umbilical.

En este estudio se observa que la regeneración del tejido óseo sigue el modelo de diferenciación embrionario similar a lo indicado por Shapiro (2008). Por otra parte Soung *et al.* (2012) indican que esta remodelación depende de las mismas inducciones celulares y moleculares como Runx1 y Runx2. Igualmente nuestras observaciones se relacionan con los estudios de Ferguson *et al.* (1999) quien discute si la reparación de la fractura recapitula el desarrollo embrionario óseo. De la misma manera Vortkamp *et al.* (1998) también discute si existe una recapitulación de señales reguladoras de la formación ósea durante el desarrollo embrionario y crecimiento postnatal comparable con la reparación de la fractura

De acuerdo a lo anteriormente expuesto podemos afirmar que se confirma la hipótesis planteada la cual dice relación a que el número de trabéculas formadas y la vascularización son mayores en las fracturas tratadas con ASCs versus fracturas no tratadas con ASCs, ya que se encontró un aumento significativo de neotrabéculas y neovasos.

CONCLUSIÓN

Las células mesenquimáticas multipotenciales obtenidas del tejido adiposo representan un gran potencial para la regeneración del tejido ósea promoviendo la neovascularización y formación de trabéculas y espacios medulares. Se acepta la hipótesis debido a que se encontró un aumento significativo de neotrabéculas y neovasos en las fracturas tratadas con ASCs.

SMOK, C.; MERUANE, M. & ROJAS, M. Implantation of autologous stem cells derived from adipose tissue in rat bone fractures. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 1(2):105-115, 2014.

SUMMARY: Stem cells derived from adipose tissue (ASCs) correspond to a major advance with respect to the bone regenerative medicine, as they have the ability for self-renewal, differentiation and paracrine stimulation to various types of tissues including bone and cartilage. The hypothesis of this study considers that fractures treated with ASCs, time decreases bone regeneration and vascularization increases, aiming to histologically evaluate bone regeneration and vascularization in these fractures. To accomplish this, 24 young male Sprague Dawley rats were used. The specimens were divided into two groups: Group A (treated) and group B (control). In both groups, the rats were euthanized at 11 and 21 days post-fracture. Statistically significant difference was observed in the number of newly formed trabeculae and vascular density in the treated group compared to control group concluded that rats treated with ASCs have a higher rate and better angiogenic bone regeneration, especially given the ability to synthesize components of the extracellular matrix of these cell, and the production of angiogenic growth factors.

KEY WORDS: Regeneration; Stem cells; Adipose tissue; Bone fractures.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amable, P.; Telles, M.; Vieira, R.; Granjeiro, J. & Borojevic, R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res. Ther.*, 5(2):53, 2014.
- Arrigoni, E.; Lopa, S.; de Girolamo, L.; Stanco, D. & Brini, A.T. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res.* 338:401-11, 2009.
- Badiavas, E. V.; Abedi, M.; Butmarc J.; Falanga, V. & Quesenberry, P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J. Cell Physiol.*, 196:245-50, 2003.
- Baer, P. & Geiger, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells Int.*, 2012:812693, 2012.
- Black, L. L.; Gaynor, J.; Gahring, D.; Adams, C.; Aron, D.; Harman, S.; Gingerich, D. A. & Harman, R. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: A randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet. Ther.*, 8(4):272-84, 2007.
- Bruder, S. P.; Jaiswal, N. & Ricalton, N. S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 355 Suppl:S247-56, 1998.
- Chang, H. & Knothe, M. L. The periosteum: tapping into a reservoir of clinically useful progenitor cells. *Stem Cells Transl. Med.*, 1:480-91, 2012.
- Claes, L.; Maurer-Klein, N.; Henke, T.; Gerngross, H.; Melnyk, M. & Augat, P. Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J. Orthop. Res.*, 24:1178-85, 2006.
- Claes, L.; Recknagel, S. & Ignatius, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 8(3):133-43, 2012.
- Colnot, C.; Zhang, X. & Knothe, M. Current Insights on the Regenerative Potential of the Periosteum: Molecular, Cellular, and Endogenous Engineering Approaches. *J. Orthop. Res.*, 30(12):1869-78, 2012.
- Córdova, L. A. *Reparación ósea mandibular con autoinjerto ilíaco: estudio celular inicial en el modelo animal *Oryctolagus cuniculus**. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, mención Morfología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Chile, 2010.
- Day, S. M.; Ostrum, R. F.; Chao, E. Y. S.; Rubin, C. T.; Aro, H. T. & Einhorn, T. A. *Bone Injury, Regeneration, and Repair*. In: Buckwalter, J. A.; Einhorn, T. A. & Simon, S. R. (Eds.). *Orthopaedic Basic Science*. 2 ed. Rosemont, American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000. pp.371-99.
- Del Bue, M.; Riccò, S.; Ramoni, R.; Conti, V.; Gnudi, G. & Grolli, S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet. Res. Commun.*, 32(1):51-5, 2008.
- Einhorn, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 355(Suppl.):S7-21, 1998.

- Epari, D. R.; Taylor, W. R.; Heller, M. O. & Duda, G. N. Mechanical conditions in the initial phase of bone healing. *Clin. Biomech.*, 21:646-55, 2006.
- Ferguson, C.; Alpern, E.; Miclau, T. & Helms, J. A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech. Dev.*, 87:57-66, 1999.
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I.; Alobera Gracia, M. A.; del Canto Pingarrón, M. & Blanco Jerez, L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 11:47-51, 2006.
- Frost, H. M. The biology of fracture healing - An overview for clinicians. Part I. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (248):283-93, 1989.
- Gaiba, S.; Pereira de França, L.; Pereira de França, J. & Masako, L. Characterization of human adipose-derived stem cells. *Acta Cir. Bras.*, 27(7):471-6, 2012.
- Gimble, J. M.; Katz, A. J. & Bunnell, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.*, 100(9):1249-60, 2007.
- Herthel, D. J. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cell and other bone marrow components. *AAEP Proceedings*, 47:319-21, 2001.
- Ito, R.; Matsumiya, T.; Kon, T.; Narita, N.; Kubota, K.; Sakaki, H.; Ozaki, T.; Imaizumi, T.; Kobayashi, W. & Kimura, H. Periosteum-derived cells respond to mechanical stretch and activate Wnt and BMP signaling pathways. *Biomed Res.*, 35(1):69-79, 2014.
- Knight, M. & Hankenson, K. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv. Wound Care*, 2(6):306-16, 2013.
- Kon, E.; Muraglia, A.; Corsi, A.; Bianco, P.; Maracci, M.; Martin, I.; Boyde, A.; Ruspantini, I.; Chistolini, P.; Rocca, M.; Giardino, R.; Cancedda, R. & Quarto, R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J. Biomed. Mater. Res.*, 49:328-37, 2000.
- Kou, L.; Lu, K.; Wu, M.; Wang, H.; Zhang, Y.; Sato, S. & Shen, J. The phenotype and tissue-specific nature of multipotent cells derived from human mature adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 444:543-8, 2014.
- Litzke, L. E.; Wagner, E.; Baumgaertner, W.; Hetzel, U.; Josimovic-Alasevic, O. & Libera, J. Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann. Biomed. Eng.*, 32:57-69, 2004.
- Lu, F.; Mizuno, H.; Uysal, C. A.; Cai, X.; Ogawa, R. & Hyakusoku, H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.*, 121:50-8, 2008.
- Mare d'ziak, M.; Marycz, K.; Smieszek, A.; Lewandowski, D. & Toker, N. The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 50(6):562-71, 2014.
- McKibbin, B. Biology of fracture healing in long bones. *J. Bone Joint Surg. Brit.*, 60:150-62, 1978.
- Meruane, M. & Rojas, M. Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo. *Int. J. Morphol.*, 28(3):879-89, 2010.
- Mizuno, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and literature review. *J. Nippon Med. Sch.*, 76(2):56-66, 2009.
- Morton, D.B. & Griffiths, P. H. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.*, 116:431-6, 1985.
- Nakahara, H.; Bruder, S. P.; Haynesworth, S. E.; Holecek, J. J.; Baber, M. A.; Goldberg, V. M. & Caplan, A. I. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*, 11:181-8, 1990.
- Puissant, B.; Barreau, C.; Bourin, P.; Clavel, C.; Corre, J.; Bousquet, C.; Taureau, C.; Cousin, B.; Abbal, M.; Laharrague, P.; Penicaud, L.; Casteilla, L. & Blancher, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Hematol.*, 129:118-29, 2005.
- Rehman, J.; Traktuev, D.; Li, J.; Merfeld-Clauss, S.; Temm-Grove, C. J.; Bovenkerk, J. E.; Pell, C. L.; Johnstone, B. H.; Considine, R. V. & March, K. L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109:1292-8, 2004.
- Rojas, M. & Meruane, M. Potencialidad celular evolutiva y medicina regenerativa. *Int. J. Morphol.*, 30(4):1243-51, 2012.

- Russell, W. M. S. & Burch, R. I. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, Methuen, 1959.
- Shapiro, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Europ. Cells Mater.*, 15:53-76, 2008.
- Shoji, T.; Li, M.; Mifune, Y.; Matsumoto, T.; Kawamoto, A.; Kwon, S.; Kuroda, T.; Kuroda, R.; Kurosaka, M. & Asahara, T. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab. Invest.*, 90:637-49, 2010.
- Smith, R. K. W.; Korada, M.; Blunn, G. W. & Goodship, A. E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.*, 35(1):99-102, 2003.
- Soung, D.; Talebian, L.; Matheny, C.; Guzzo, R.; Speck, M.; Lieberman, J.; Speck, N. & Drissi, H. Runx1 dose-dependently regulates endochondral ossification during skeletal development and fracture healing. *J. Bone Miner. Res.*, 27(7):1585-97, 2012.
- Taghi, M. B.; Kashani, H. G.; Taghi, L.; Leili, H. & Leyla, M. Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors. *Cell Biol. Int.*, 36(12):1239-49, 2012.
- Uccelli, A.; Pistoia, V. & Moretta, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.*, 28(5):220-6, 2007.
- Utvag, S. E.; Grundnes, O.; Rindal, D. B. & Reikeras, O. Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. *J. Orthop. Trauma*, 17:430-5, 2003.
- Vortkamp, A.; Pathi, S.; Peretti, G. M.; Caruso, E. M.; Zaleske, D. J. & Tabin, C. J. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech. Dev.*, 71:65-76, 1998.
- Wang, M.; Crisostomo, P.; Herring, C.; Meldrum, K. & Meldrum, D. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *AJP Regul. Interg. Comp. Physiol.*, 291:880-3, 2006.
- Weatherholt, A.; Fuchs, R. & Warden, S. Cortical and trabecular bone adaptation to incremental load magnitudes using the mouse tibial axial compression loading model. *Bone*, 52:372-9, 2013.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizumo, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P. & Hedrick, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 7:211-8, 2001.

Dirección para correspondencia:
Dra. Mariana Rojas R.
Laboratorio de Embriología Comparada
Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo
Facultad de Medicina, ICBM
Universidad de Chile
CHILE

Email: dramrojas@hotmail.com

Recibido : 11-03-2014
Aceptado: 17-04-2014