

Investigación

Método de obtención de células madre de cordón umbilical y su potencial uso en la odontología y hematología

Methodology of umbilical cord stem cells obtention and their potential use in dentistry and hematology

AUTORES

C. GARCÍA SAMARTINO ^{1,2}

S.A. CARMINATI ^{1,3}

M. AGUILERA ^{1,3}

M. MORAS ⁴

M.A. OSTUNI ⁴

C.M. FADER ^{1,3}

1 Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO), Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Cuyo,

Mendoza Argentina, 2 Laboratorio de Citometría de Flujo, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina; 3 Laboratorio de Biología Molecular y Celular, Instituto de Histología y Embriología (IHEM-CONICET), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina; 4 Integrated Biology of Red Blood Cells, INTS, Paris Diderot University, Paris, France.

Corresponding author: cfader@fodonto.uncu.edu.ar, cfader@mendoza-conicet.gob.ar

RESUMEN

Las posibles aplicaciones terapéuticas de las células madre estromales mesenquimales (MSC) han despertado un gran interés en el campo de la ingeniería biomédica como terapia regenerativa. Las MSC son células madre adultas multipotentes que poseen un alto potencial de diferenciación, baja inmunogenicidad, propiedades inmunomoduladoras y capacidad de expansión in vitro eficiente. Las células madre derivadas de cordón umbilical humano (hUC-MS) pueden diferenciarse a otros tipos celulares y ser utilizadas con fines terapéuticos. En este trabajo mostramos la metodología a través de la cual obtuvimos hUC-MS, con la finalidad de diferenciarlas dentro del linaje eritropoyético. Así mismo, evaluamos y discutimos el potencial de estas hUC-MS, en la diferenciación osteoblástica y su aplicación en la práctica odontológica.

ABSTRACT

The possible therapeutic applications of mesenchymal stromal stem cells (MSC) have aroused great interest in the field of biomedical engineering, such as regenerative therapy. MSC's are multipotent adult stem cells that have a high potential for differentiation, low immunogenicity, immunomodulatory properties and efficient in vitro expandability. Stem cells derived from human umbilical cord (hUC-MS) can be differentiated into other cell types and may be used for therapeutic purposes. In this work we show the methodology by which we obtained hUC-MS, in order to differentiate them within the erythropoietic lineage. Likewise, we evaluate and discuss the potential of these hUC-MS, in osteoblastic differentiation and its application in dental practice.

INTRODUCCIÓN

El uso de las células madre en la práctica clínica para tratar distintas enfermedades se ha incrementado de forma exponen-

cial en los últimos 20 años. En los tejidos adultos existen células madre que pueden ser utilizadas para tratar enfermedades gracias a su capacidad regenerativa (1,2).

Las células madre mesenquimales (MSC) son células multipotenciales primitivas, con morfología fibroblastoide, originadas a partir de la capa germinal mesodermal,

Método de obtención de células madre de cordón umbilical y su potencial uso en la odontología y hematología

C. García Samartino; S. A. Carminati; M. Aguilera; M. Moras; M. A. Ostuni; C. M. Fader

que se autorenewan y son capaces de diferenciarse a otros linajes como el osteogénico, condrogénico, adipogénico, eritropoyético y miogénico, aunque también se ha demostrado su capacidad de diferenciarse a células de origen no mesenquimal como las del tejido nervioso (3-6). Se establecieron tres criterios mínimos para definir las MSC humanas. El primero corresponde a la capacidad de adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; el segundo, al fenotipo celular determinado idealmente por citometría de flujo en la que las células madre mesenquimales provenientes de cordón umbilical, deben expresar proteínas específicas tales

como los CD (Cluster of differentiation) CD105, CD73 y CD90, CD34 y no expresar otros antígenos como CD45, y CD14 entre otros; y el tercero, hace referencia a la capacidad de diferenciarse in vitro a los linajes osteogénico, condrogénico, hematopoyético y adipogénico (4,5). Como se puede observar en la figura 1, las células madre de origen hematopoyético, dependiendo de los estímulos a los que se encuentren expuestas, pueden diferenciarse a los distintos linajes, tales como glóbulos rojos o macrófagos (osteoclastos). (Ver Figura 1)

Las MSC pueden obtenerse a partir distintas fuentes, como sangre del cordón

umbilical, sangre periférica (8), tejido adiposo (9-11), folículo capilar (12), ligamento periodontal (13) y pulpa dental (14), entre otros. La ventaja que poseen las MSC para ser utilizadas como terapia regenerativa, es que son fáciles de obtener y expandir en cultivo, tienen una gran plasticidad y pueden migrar hacia los tejidos lesionados (15), actúan en forma paracrina, poseen propiedades inmunomoduladoras (1,5,16-19), antiapoptóticas y antifibróticas (4). También son capaces de promover angiogénesis, producir múltiples tipos de tejido conectivo y disminuir la respuesta inflamatoria. A su vez, la utilización de MSC no involucra el dilema ético que se

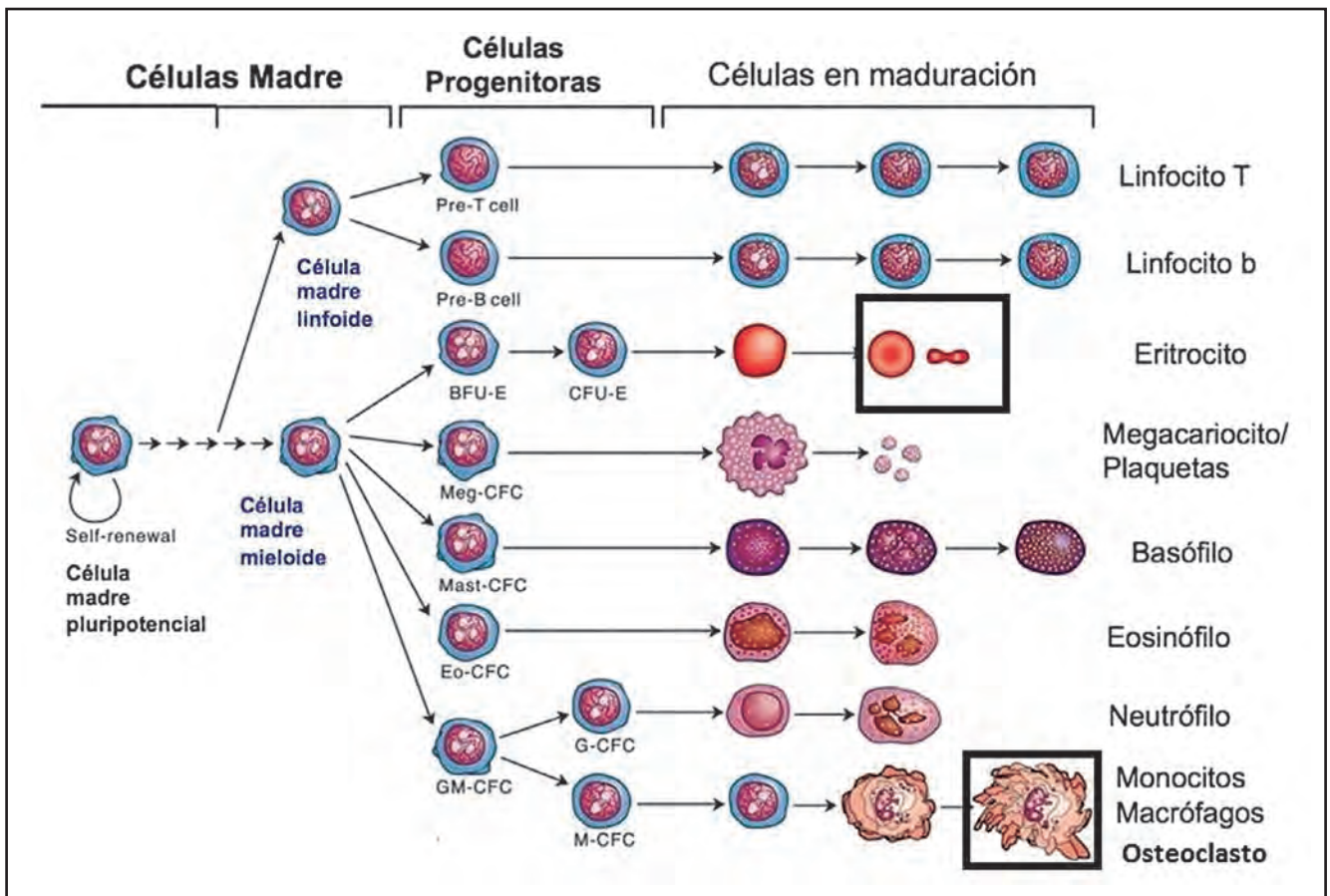


Figura 1: Esquema de diferenciación de células madre pluripotenciales a linajes hematopoyéticos. En el recuadro superior se observa la diferenciación a glóbulo rojo y en el inferior la diferenciación a macrófagos (osteoclastos). Imagen modificada de Sistema hematopoyético de la médula ósea, por OpenStax College, Anatomy & Physiology.

Método de obtención de células madre de cordón umbilical y su potencial uso en la odontología y hematología

C. García Samartino; S. A. Carminat; M. Aguilera; M. Moras; M. A. Ostuni; C. M. Fader



Figura 2: Protocolo de obtención de células CD34 positivas.

presenta con el manejo de las células madre embrionarias (1,4,16). Por todo esto, las células madre mesenquimales, son utilizadas en múltiples estudios clínicos, como terapia regenerativa, para tratar enfermedades como infarto del miocardio, diabetes, alteraciones cerebrales y de médula espinal, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Crohn (4) y otras que involucran el

tejido óseo y cartilaginoso (6,10,20-22). Con el fin de desarrollar un modelo para la aplicación clínica de las células madre mesenquimales en patologías hematológicas y lesiones óseas, se evaluó su capacidad de diferenciación in vitro ya que las células mesenquimales cumplen su papel de regeneración y reparación del tejido afectado, lo que podría llegar a ser una estrategia exitosa en la búsqueda de una nueva alternativa para su administración

y aplicación clínica en medicina regenerativa.

RESULTADOS Y METODOLOGÍA DE TRABAJO.

Obtención de células madre de cordón

Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo M. Osturi, del INTS (Instituto Nacional de la transfusión sanguínea), de la Universidad de Paris Diderot, en Pa-

Método de obtención de células madre de cordón umbilical y su potencial uso en la odontología y hematología

C. García Samartino; S. A. Carminati; M. Aguilera; M. Moras; M. A. Ostuni; C. M. Fader

rís Francia. Luego de realizar el convenio pertinente con la institución donante y habiendo conseguido la aprobación del protocolo de obtención de células madre por el comité de ética, la sangre de cordón umbilical fue obtenida en bolsa de recolección hematológica para hUC-MSC (figura 2A) y conservada a 4°C e inmediatamente transportada al laboratorio de cultivo celular para ser procesada en esterilidad, bajo campana de flujo laminar. Como se muestra en la figura 2B, la sangre fue recolectada en frascos de cultivo celular y disuelta en buffer PBS. Posteriormente, esta sangre fue trasvasada cuidadosamente a tubos plásticos estériles de 50 ml que contenían percoll (Pancoll), a fin de generar un gradiente de separación por densidad (Figura

2C). Luego las fases de sangre y percoll se centrifugaron a 2500 RPM durante 5 minutos. Una vez finalizado este proceso se recolectó suavemente la capa de células blancas PMN (polimorfonucleares) (Figura 2D) las cuales fueron incubadas en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-CD34 (proteína marcadora de células madres hematopoyéticas) unido a esferas magnéticas durante 40 minutos. Posteriormente, las células se pasaron por una columna de separación unida a un magneto, a fin de retener la población de células CD34+ y descartar el resto de las células (Figura 2E). Luego se sacó la columna de retención, del magneto y se eluyeron las células madre CD34+ en un tubo ependorf de 1,5 ml. Finalmente las células

fueron centrifugadas a 1500 RPM durante 5 minutos (Figura 1F) y resuspendidas en el medio de cultivo adecuado para su posterior amplificación y diferenciación. (Ver Figura 2)

Diferenciación a eritrocitos

Fase de expansión clonal: en una primera etapa las células obtenidas se cultivaron en presencia de medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) suplementado con 15% de BIT (albúmina sérica bovina, insulina y transferrina), 3% de suero humano, 2% de plasma humano, 3 U/ml de heparina, 1 ng/ml de IL-3 y 10 ng/ml de IL-6 durante 3 días a 37°C y 5 % de CO₂. Finalmente se resuspendieron las

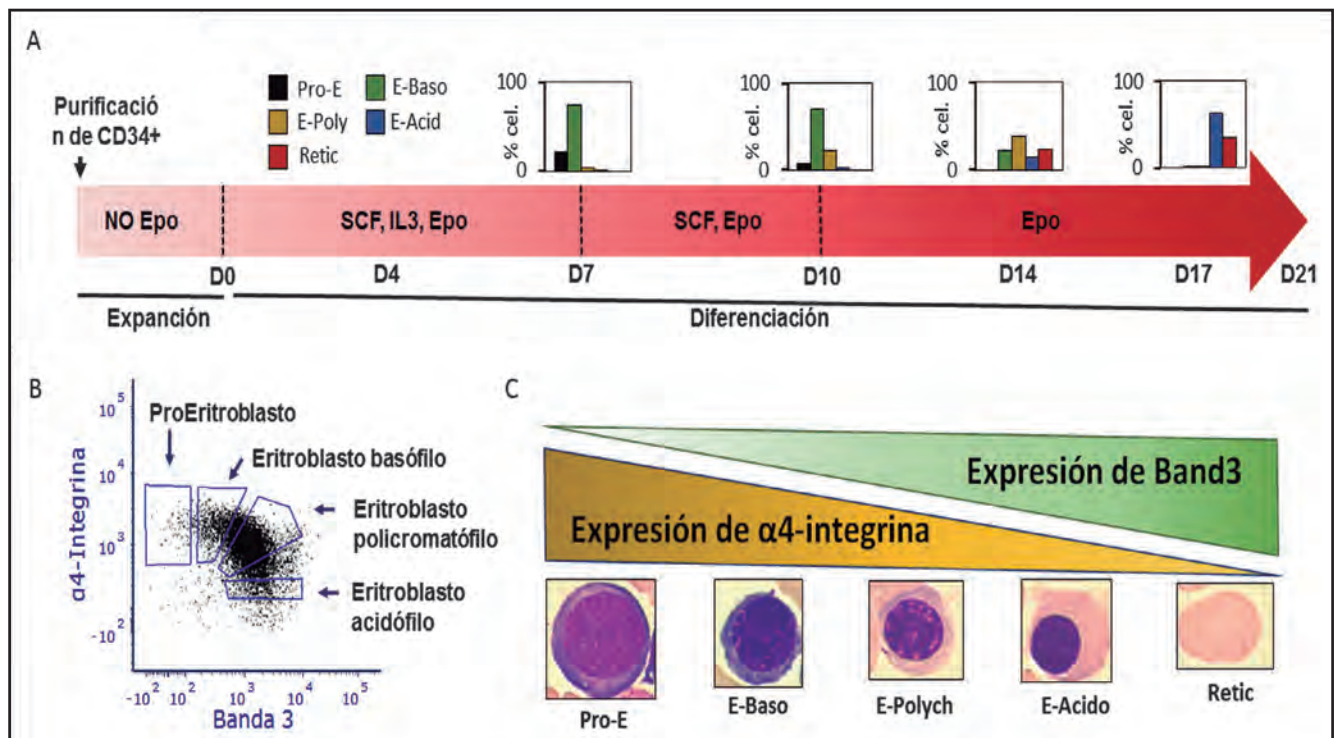


Figura 3: A) Esquema de la expansión clonal de células CD34+ (medio de cultivo sin eritropoyetina (Epo)) y diferenciación de células CD34+ a eritrocitos, durante 21 días de incubación en presencia de Epo. B) Citometría de flujo al día 10 de diferenciación, en el que se midieron los niveles de las proteínas banda 3 y alfa 4 integrina. C) Esquema en el que se muestra el aumento o la disminución de las proteínas banda 3 y alfa 4 integrina desde los estadios inmaduros hasta los más maduros durante la eritropoyesis (proeritroblasto (Pro-E), eritroblasto basófilo (E-Baso), eritroblasto policromatófilo (E-Polych), eritroblasto acidófilo (E-Acido) y reticulocito (Retic)). Las células se visualizaron mediante la tinción de May-Grünwald Giemsa.

Método de obtención de células madre de cordón umbilical y su potencial uso en la odontología y hematología

C. García Samartino; S. A. Carminat; M. Aguilera; M. Moras; M. A. Ostuni; C. M. Fader

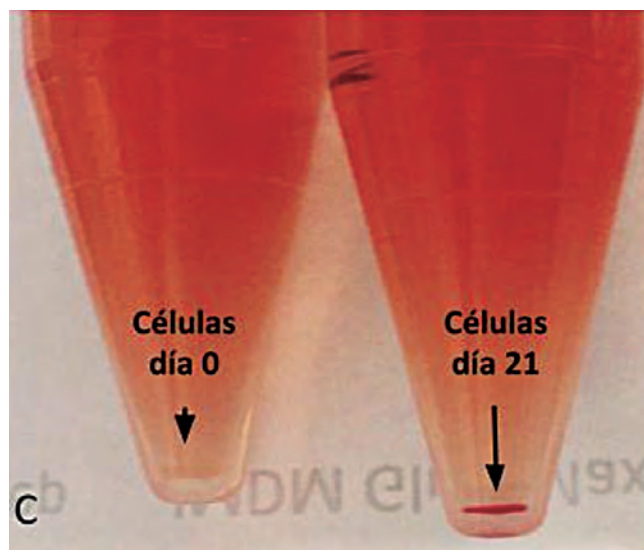
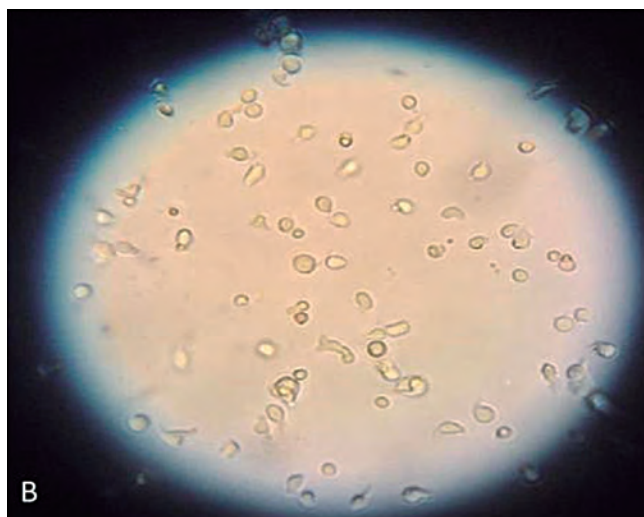
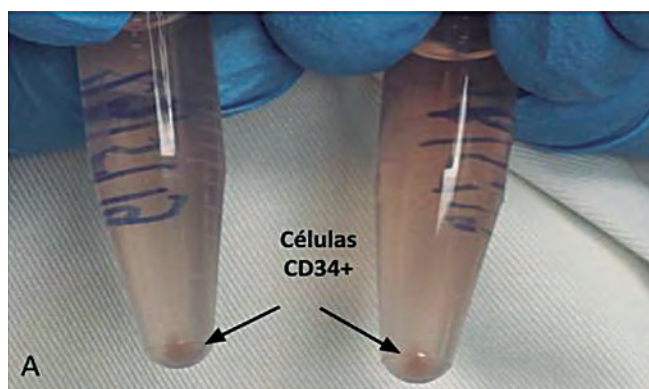


Figura 4: Expansión y maduración de células CD34+. A) Células incubadas por 3 días a 37°C y 5 % de CO₂ en presencia de Medio de expansión. B) Microscopía de luz transmitida (20X) de las células CD34+ expandidas. C) Células incubadas a día 0 (D0) y día 21 (D21) con medio de diferenciación. En D21 se observa un aumento de la coloración roja del pellet celular debido a un aumento de la hemoglobina (glóbulos rojos).

células de la placa de cultivo y se trasladaron a una nueva placa a fin de eliminar las células adheridas a la primera placa de cultivo (células no hematopoyéticas). Este proceso permite la división y expansión de las células progenitoras a fin de tener suficiente número de células para inducir su maduración (Figura 3A fase de expansión clonal).

Fase de diferenciación celular: Las células que se obtuvieron de la expansión clonal fueron incubadas en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) en presencia de 15% de BIT (albúmina sérica bovina, insulina y transferrina), 3% de suero humano, 2% de plasma humano, 3 U/ml de heparina, 1ng/ml de IL-3 y 3 u/ml de EPO (eritropoyetina) durante 21 días a 37°C y 5% de CO₂. Este medio permite la diferenciación de las células eritropoyéticas desde sus estadios de proeritroblasto, eritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto acidófilo, reticulocito y finalmente glóbulo rojo (GR). Se tomaron muestras de este cultivo al día 0, 4, 7, 10, 14, 17 y 21 a fin de estudiar la diferenciación de la población celular (Figura 3A fase de diferenciación celular).

Este proceso de diferenciación puede ser observado por el aumento o la disminución de algunas proteínas, por citometría de flujo, tales como la proteína citosólica hemoglobina (aumentan en el GR ma-

duro) o las proteínas de membrana plasmática Banda 3, glicoforina A (aumentan en el GR maduro) o la α 4-integrina (disminuye en el GR maduro). Al día 10 de la diferenciación se realizó una citometría de flujo, donde se evaluaron los niveles de expresión de la proteína de banda 3 y alfa 4 integrina, como parámetro de madurez. Se observó la clásica "forma de cascada" indicando el aumento progresivo de las formas maduras dentro de la eritropoyesis (Figura 3B y 3C)

Asimismo, para corroborar los niveles de

maduración de las células CD34+, se observó el aumento de la proteína citosólica hemoglobina evidenciado por la coloración rojiza de las células posterior a la centrifugación de las mismas al día 21 de la fase de diferenciación (Figura 4)

Diferenciación a osteoclastos

El protocolo utilizado fue propuesto por el grupo de J.F. Gomez Clavel et al. Las células se incubaron en medio de diferenciación osteogénica: DMEM con suplemento de 10% SFB, penicilina 100 U/ml,

Método de obtención de células madre de cordón umbilical y su potencial uso en la odontología y hematología

C. García Samartino; S. A. Carminati; M. Aguilera; M. Moras; M. A. Ostuni; C. M. Fader

estreptomycin 100 µg/ml, dexametasona 0,1 µM, ascorbato-2-fosfato 50 µM y α-glicerol fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich). El medio de inducción se reemplazó dos veces por semana durante tres semanas, incubando las células a 37°C y 5 % de CO₂. Como control negativo se utilizaron células incubadas en medio de cultivo convencional y todos los ensayos se realizaron por triplicado. A la primera semana de inducción se evaluó la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, un marcador temprano de diferenciación osteogénica, mediante la tinción de Fast Red. Además, a las tres semanas de incubación con el medio de inducción las células se tiñeron para detectar depósitos de calcio (núcleos de calcificación) utilizando la tinción de von Kossa (Sigma-Aldrich).

DISCUSIÓN

Aplicaciones de las MSC

La importancia del estudio de estas células madre (MSC) se ve claramente al tomar en cuenta las múltiples aplicaciones terapéuticas en las que pueden ser implementadas. Su gran potencial de proliferación y su capacidad de diferenciación han hecho que sean muy atractivas para terapias regenerativas.

Muchas aproximaciones experimentales han sido realizadas con estas células para reparación de órganos dañados tales como los pulmones, el hígado, los riñones y el corazón, además de utilizarlas para disminuir efectos de inflamación excesiva en algunas regiones del cuerpo.

Las MSC también son utilizadas en modelos de infarto, mostrando que al ser aplicadas luego de un infarto del miocardio la aplicación de las mismas logra disminuir la formación de cicatrices y acercar el funcionamiento cardíaco post-infarto a su funcionamiento normal. Además han demostrado tener propiedades angiogénicas, y de reparar tejidos dañados por radioterapia, seguramente gracias a que son capaces de liberar el factor de crecimiento vascular endotelial.

La propiedad inmunosupresora de las MSC es aplicada en modelos de diabetes tipo 1, enfermedad autoinmune que lleva al propio cuerpo a eliminar las Células Beta de los Islotes de Lagerhans en el páncreas (Ezquer et al., 2008). Esta propiedad también es utilizada para tratar la Enfermedad de Injerto Contra Huésped (EICH), enfermedad asociada al trasplante alogénico de HSC (Hematopoietic Stem Cells) con un gran índice de mortalidad.

Las MSC, al estar en cultivo, generan una gran cantidad de moléculas bioactivas hacia su medio externo, entre ellas se encuentran factores de crecimiento, citoquinas y quemoquinas las cuales tienen grandes efectos en la dinámica celular local. A este medio de cultivo, que se encuentra enriquecido en dichos compuestos, se le denomina medio condicionado (MC). Estos compuestos han sido estudiados como una alternativa a la aplicación directa de las MSC, así como a la aplicación de medio condicionado. La primera evidencia de que el MC puede tener aplicaciones clínicas, demostró que en hígados dañados la aplicación de éste inhibía la muerte de los hepatocitos y estimulaba potencialmente su regeneración, lo que abrió nuevas puertas para el tratamiento en contra una falla hepática fulminante. También se ha detectado la presencia de varias citoquinas en el MC, entre ellas el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), la interleucina 1 beta, el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y el factor de crecimiento tipo insulina. La aplicación de medio condicionado de las MSC cultivadas logró contribuir a la mejora en el funcionamiento cardíaco luego de un infarto del miocardio (Takhashi et al., 2006). En lo que concierne a la odontología, la reparación de defectos óseos que se producen por trauma, tumores, infecciones, trastornos bioquímicos, tratamientos (como por ejemplo, la exodoncia) son situaciones clínicas que requieren una intervención quirúrgica para subsanar dichas alteraciones.

Los tipos de material disponible para el tratamiento de estos problemas incluyen hueso autólogo (del mismo paciente), hueso heterólogo (de un donante), matrices desmineralizadas, así como una amplia gama de biomateriales sintéticos como metales, cerámicas, polímeros y materiales compuestos. El uso de injertos óseos en la práctica clínica presenta varios inconvenientes como la escasez de donantes, la transmisión de enfermedades, la morbilidad del sitio de extracción y la incapacidad de los materiales para remodelarse y reaccionar ante condiciones fisiológicas, con un alto porcentaje de pérdida por complicaciones como la falta de unión, la reabsorción osteoclástica, el incremento en la prevalencia de microfracturas y la disminución en la densidad mineral ósea. Para reducir tales problemas, la ingeniería de tejidos se ha convertido en una estrategia encaminada a reparar, reconstruir o regenerar tejido vivo utilizando células y biomoléculas en una matriz tridimensional para la formación y el crecimiento de los nuevos tejidos a ser empleados en la reconstitución morfológica y funcional del tejido perdido (23, 27)

La célula madre ideal para la ingeniería de tejidos debe encontrarse en abundancia, ser obtenida con mínima morbilidad, ser diferenciada de manera confiable por diferentes vías y ser trasplantada de manera eficaz y segura. Las MSC cumplen con todos los criterios y también son capaces de diferenciarse en otros tejidos mesenquimales, como adipocitos, condrocitos, miocitos y osteoblastos.

En este trabajo hemos logrado aislar y cultivar células madre de cordón umbilical y diferenciarlas a otros linajes, generando células de la línea eritropoyética y de osteoclastos. Esto abre un abanico de posibilidades importante para nuestro grupo de investigación, dentro del CIO (Centro de Investigaciones Odontológicas), en el campo de la biología celular y molecular, mediante la de obtención y manipulación de células madre. Así mismo, nuestro pro-

Método de obtención de células madre de cordón umbilical y su potencial uso en la odontología y hematología

C. García Samartino; S. A. Carminati; M. Aguilera; M. Moras; M. A. Ostuni; C. M. FaderA

pósito dentro de esta área de trabajo, no es solo utilizar células madre de cordón umbilical, sino también poner a punto el aislamiento, la obtención y maduración de

MSC de ligamento periodontal o de pulpa dental. De obtener resultados positivos, esta metodología nos permitiría en un futuro cercano poder utilizar dichas células

para el estudio y generación de modelos de terapia regenerativa, siendo un objetivo importante y ambicioso su posterior uso en la práctica odontológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. ZHANG X, TANG T, SHI Q, FERNANDES JC, DAI K. *The immunologic properties of undifferentiated and osteogenic differentiated mouse mesenchymal stem cells and its potential application in bone regeneration. Immunobiology.* 2009;214:179-86.
2. SETHE S, SCUTT A, STOLZING A. *Aging of mesenchymal stem cells. Ageing Res Rev.* 2006;5:91-116.
3. SALASZNYK RM, KLEES RF, WILLIAMS WA, BOSKEY A, PLOPPER GE. *Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Exp Cell Res.* 2007;313:22-37.
4. MEIRELLES LDA S, FONTES AM, COVAS DT, CAPLAN AL. *Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:419-27.
5. SALEM HK, THIEMERMANN C. *Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. Stem Cells.* 2010;28:585-96.
6. KRAMPERA M, PIZZOLO G, APRILI G, FRANCHINI M. *Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. Bone.* 2006;39:678-83.
7. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, ET AL. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science.* 1999;284:143-7.
8. ROUFOSSE CA, DIREKZE NC, OTTO WR, WRIGHT NA. *Circulating mesenchymal stem cells. Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36: 585-97.
9. DICKER A, LE BLANC K, ASTROM G, VAN HARMELEN V, GOTHERSTROM C, BLOMQVIST L, ET AL. *Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. Exp Cell Res.* 2005;308:283-90.
10. LEVI B, LONGAKER MT. *Osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells in mouse and human: In vitro and in vivo methods. J Craniofac Surg.* 2010;22:388-91.
11. LEVI B, NELSON ER, BROWN K, JAMES AW, XU D, DUNLEVIE R, ET AL. *Differences in osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells from murine, canine, and human sources in vitro and in vivo. Plast Reconstr Surg.* 2010;128:373-86.
12. SHIH DT, LEE DC, CHEN SC, TSAI RY, HUANG CT, TSAI CC, ET AL. *Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. Stem Cells.* 2005;23:1012- 20.
13. KAWANABE N, MURATA S, MURAKAMI K, ISHIHARA Y, HAYANO S, KUROSAKA H, ET AL. *Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. Differentiation.*
14. YAMADA Y, FUJIMOTO A, ITO A, YOSHIMI R, UEDA M. *Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (bDPSCs) and human mesenchymal stem cells (bMSCs) for tissue engineering cell therapy. Biomaterials.* 2006;27:3766-81.
15. BARRY FP, MURPHY JM. *Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:568-84.
16. CHIDGEY AP, LAYTON D, TROUNSON A, BOYD RL. *Tolerance strategies for stem-cell-based therapies. Nature.* 2008;453: 330-7.
17. MARIGO I, DAZZI F. *The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. Semin Immunopathol.* 2011;33:593- 602.
18. DAZZI F, KRAMPERA M. *Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24:49-57. b
19. SHANTI RM, LI WJ, NESTI LJ, WANG X, TUAN RS. *Adult mesenchymal stem cells: Biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:1640-7.
20. BEHNIA H, KHOJASTEH A, SOLEIMANI M, TEHRANCHI A, KHOSHZABAN A, KESHEL SH, ET AL. *Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108:e1-6.
21. AICHER WK, BUHRING HJ, HART M, ROLAUFFS B, BADKE A, KLEIN G. *Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells-potential and pitfalls. Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:342-51.
22. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *Clinical trials.gov*
23. ANITUA E, ANDIA I, ARDANZA B, NURDEN P, NURDEN AT. *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost.* 2004;91:4-15.
24. JONES E, YANG X. *Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. Injury.* 2011;42:562-8.45. Hsiong SX, Mooney DJ. *Regeneration of vascularized bone. Periodontol 2000.* 2006;41:109-22.
25. CANCEDDA R, GIANNONI P, MASTROGIACOMO M. *A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. Biomaterials.* 2007;28:4240-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.023>
26. LEVI B, LONGAKER MT. *CONCISE REVIEW: Adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. Stem Cells.* 2011;29:576-82.
27. ITALI M, LINERO, ADRIANA DONCEL, ORLANDO CHAPARRO. *Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. Biomédica* 2014;34:67-78 *Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano.*