

Primera aplicación terapéutica en Uruguay de células estromales mesenquimales en un canino con no-unión ósea femoral

First regenerative treatment in Uruguay with mesenchymal stromal cells of a non-union femoral bone defect in a canine

Semiglia G¹, Filomeno A¹, Yaneselli K², Díaz H², Zunino J³, Benavides U², Maisonnave J^{*2i}

Recibido: 15/7/2014
Aprobado: 3/11/2014

RESUMEN

La no-unión es una patología de la reparación, en la que las condiciones de regeneración ósea normales, se encuentran alteradas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el tratamiento alternativo de una no-unión ósea de fémur en un canino de 3 años de edad, raza Poodle, con células estromales mesenquimales (CEM) derivadas de médula ósea (MO). Luego del tratamiento inicial convencional (cirugía y fijación externa) de una fractura de fémur que no evolucionó favorablemente a la consolidación, se recurrió a una técnica de regeneración tisular estimulada por la aplicación percutánea en el foco de no-unión, de CEM-MO autólogas. La evaluación del paciente

SUMMARY

Non-union is a pathologic bone repair process, where normal conditions of osseous regeneration are altered. The objective of the present study was to assess the alternative treatment of a femoral non-union fracture in a 3 year old male Poodle dog, using bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSc). After a former conventional surgical treatment of the femoral fracture (open reduction plus external fixation), a non-union was established after two months post-surgery. Thus, a tissue regenerative technique was essayed: percutaneous injection of autologous BM-MSCs at the non-union site. The patient was clinically and radiologically evaluated every 15 days up

¹ Departamento de Pequeños Animales-Perfil Quirúrgico, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacés 1620, Montevideo, Uruguay ² Área de Inmunología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacés 1620, Montevideo, Uruguay. ³ Banco de Tejidos, INDT, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. *Autor de contacto: <mailto:jacmaiso@gmail.com>

se realizó clínica y radiológicamente cada 15 días, hasta los 2 meses post tratamiento con CEM-MO. La terapia celular indujo regeneración ósea ya a partir de las 2 semanas post-aplicación de las células. A las 8 semanas la terapia celular aplicada en la no-uni3n, permiti3 la consolidaci3n 3sea y por consiguiente, la recuperaci3n funcional del miembro. Nuevas investigaciones deben ser realizadas para evaluar la aplicaci3n de CEM como terapia alternativa en casos de no-uni3n para mejorar y acelerar los procesos regenerativos en lesiones 3seas.

Palabras Clave: terapia celular, no-uni3n, c3lulas estromales mesenquimales, canino

to 2 months. Observed results seem to demonstrate that the cellular therapy induced bone regeneration starting, two weeks post regenerative treatment. At 8 weeks, clinical and radiological improvement was observed. Cell therapy applied to the femoral non-union enabled bone healing, thus allowing the patient to regain its limb's function. Further studies are needed to evaluate the application of BM-MSc as an alternative therapy in osseous non-union cases, in order to improve and accelerate the regenerative process in bone lesions.

Keywords: cellular therapy, non-union, BM - MSC, canine

INTRODUCCI3N

El tejido 3seo es uno de los pocos tejidos del organismo que cuando ocurre una fractura es capaz de regenerarse totalmente, si se hallan presentes los componentes biol3gicos y mec3nicos apropiados. Sin embargo, existe la no-uni3n 3sea, la cual es una fractura en la que la progresi3n de la cicatrizaci3n aparentemente ha cesado, hay movimiento en el sitio y la curaci3n es improbable sin intervenci3n. Existen diversas causas como estabilidad inadecuada de la fractura, mala reducci3n o aposici3n de la fractura, inadecuada irriga-

ci3n, infecci3n o fragmento 3seo faltante (Millis y Jackson, 2006; Schulz, 2009).

En caninos, el tratamiento tradicional consiste en utilizar un implante 3seo aut3logo o en el peor de los casos la amputaci3n del miembro (Millis y Jackson, 2006; Schulz, 2009). Sin embargo, para utilizar un implante 3seo aut3logo, la extracci3n de hueso esponjoso posee un riesgo sobre el paciente y la cantidad de hueso que se puede extraer es limitada (Henrich Younger y Chapman, 1989; Yoo y col., 2005; Yu y col., 2013). Para evitar los riesgos de extracci3n de

un implante autólogo, se han desarrollado otras metodologías tales como implantes alogénicos (Barckman y col., 2013; da Silva Filho y col., 2013) o xenogénicos (Semiglia y col., 2006).

La medicina regenerativa en veterinaria es un campo emergente, conocido también como “Ingeniería de Tejidos”. El objetivo de esta disciplina es obtener tejidos vivos que puedan reemplazar estructuras perdidas y contribuir al retorno funcional. Consiste en estimular o suministrar células, factores de crecimiento, tejido vivo funcional mediante un soporte (natural, sintético o mezcla de ambos), para promover la regeneración del tejido original y conseguir volver a la estructura funcional normal. En medicina ortopédica se han utilizado células madre mesenquimales (CMM) para promover la regeneración ósea en caninos, tanto con la aplicación de células autólogas (Bruder y col., 1998), como alogénicas (Arinze y col., 2003; Yaneselli y col., 2013).

Friedenstein y col. (1968) fueron los primeros en describir que en la médula ósea existen células estromales mesenquimales (CEM) multipotentes, lo que les permite diferenciarse *in vitro* en diversos linajes celulares, el trilineaje característico es: adiposo, cartilaginoso y óseo (Jung y col., 2008), cuando se comprueba dicho potencial en conjunto a otras características son denominadas CMM (Horwitz y col., 2005). Las CMM poseen

tres características relevantes para su aplicación terapéutica: promover la angiogénesis (Imanishi y col., 2008), poseer multipotencialidad (Vieira y col., 2010) y ser inmunomoduladoras (Carra-de y Borjesson, 2013). Estas características las convierten en una alternativa atractiva para ser utilizadas como terapia celular en medicina veterinaria (de Bakker y col., 2014; Volk y Theoret, 2013; Jung y col., 2008; Yaneselli y col., 2013). Sin embargo, de la población celular de la médula ósea aproximadamente 1 en 25,000 hasta 1 en 100,000 son CMM (Banfi y col., 2001; Muschler y col., 2001; Strem y col., 2005), por lo tanto, es necesario expandir *in vitro* (aislamiento, expansión, criopreservación) para aumentar su número original y obtener una mayor cantidad de células para su aplicación terapéutica (Jung y col., 2008; Volk y col., 2012; Yamada y col., 2004).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el tratamiento alternativo de una no-unión ósea de fémur en un canino, con células estromales mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea (CEM-MO).

MATERIALES Y MÉTODOS

Paciente

Un canino macho de 3 años de edad, raza Poodle, con fractura expuesta de fémur derecho (Figura 1A) fue atendido en el Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Se realizó el tratamiento tradicional con fijación externa (Figura 1B). A las 8 semanas posteriores al tratamiento tradicional, fijación, fue evaluado clínicamente, no existiendo una evolución positiva, rechazando el apoyo con una claudicación de grado 10, según una matriz con una

escala de puntuación del 0 al 10 (la numeración aumenta a medida que el grado de claudicación es más severo), apoyo normal = 0, rechaza al comenzar el apoyo = 1, del 2 a 8 existe mayor grado de rechazo al apoyo, apoya cuando está de pie, pero lo rechaza cuando está en movimiento=9 y no soportan peso en absoluto sobre el miembro = 10, descrito por Summer y Smith (1988), confirmandose radiológicamente una no-unión de fémur. En el foco de fractura no existían evidencias de regeneración ósea ni de osteomielitis (Figura 1C).

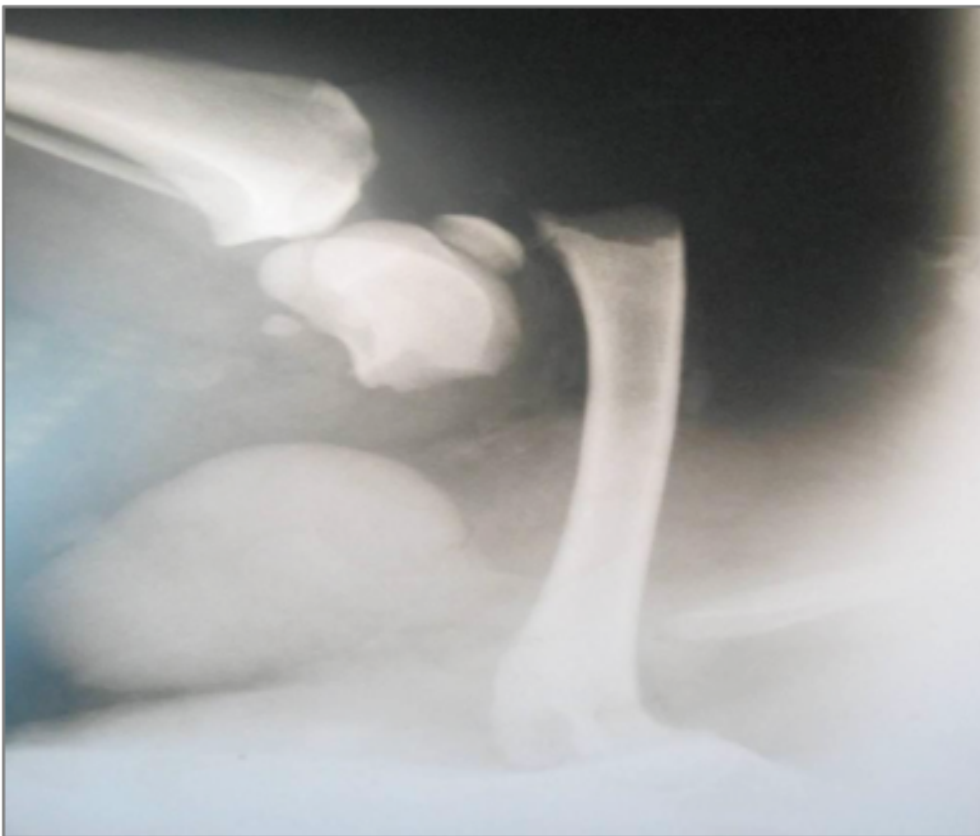


Figura 1: A Radiografía lateral de la fractura del fémur pre tratamiento tradicional



Figura 1B Fijación externa del miembro posterior derecho.



Figura 1C Radiografía lateral de fémur: se aprecia no-unión crónica 2 meses post-fijación externa.

Aislamiento, expansión y criopreservación de las CEM-MO

El protocolo de extracción de médula ósea y la aplicación de las CEM-MO fue previamente autorizado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), UdelaR. El protocolo de aislamiento de CEM-MO utilizado fue adaptado del descrito por Jung y col. (2008), brevemente fue aspirada, con una aguja medular de Hamchidi® conteniendo 5000 IU/mL heparina (0,1mL), 7 mL de médula ósea (MO) proveniente del húmero derecho del paciente. Este procedimiento se realizó en forma percutánea bajo sedación (acepromacina 1% (0,01 mg/kg), midazolam 0,5% (0,25 mg/kg) y ketamina 5% (5mg/kg) en forma I/V. Como analgesia se utilizó Tramadol (2 mg/kg). Se aplicó en forma profiláctica Penicilina-Streptomina S/C. La MO se colocó sobre un colchón de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare), se centrifugó a 400 G durante 20 minutos y se colectó la capa flogística y se sembró a una densidad de 4×10^5 células / cm^2 en una botella de cultivo de 75 cm^2 . El medio de crecimiento utilizado fue Minimal Essential Medium (MEM), 15% suero fetal bovino (SFB) y 100 mg/mL gentamicina e incubado a $37 \text{ }^\circ\text{C} + 5\% \text{ CO}_2$. A las 48 horas se cambió el medio de crecimiento para remover las células no adherentes. Se controlaron las características morfológicas y de adherencia al plástico

de los cultivos celulares. Al llegar al 80-90% de confluencia, las células se levantaron utilizando 0,25% Tripsina/EDTA y se expandieron 1:3, de cada pase se criopreservaron 1×10^6 CEM-MO. La criopreservación se realizó en un medio de congelación con 50% MEM, 40% SFB, 10% dimetilsulfóxido (DMSO) y las células se mantuvieron en N_2 líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$), hasta su utilización.

Terapia celular con CEM-MO autólogas

Con la misma sedación mencionada anteriormente, fueron implantadas 1×10^6 CEM-MO autólogas en pase 4, de forma percutánea sobre el sitio de no-unión (detectado por palpación) (Figura 2).

Evaluación clínica y radiológica

Fue evaluada la claudicación del paciente según la escala de puntuación descrita por Summer y Smith, (1988). Fueron realizadas evaluaciones clínicas y radiológicas cada 15 días post-implante de CEM-MO, hasta las 8 semanas. La evaluación clínica consistió en detectar signos de inflamación local y sistémica. Los signos de inflamación local estudiados fueron: rubor, calor, dolor y edema. Los signos de inflamación sistémica evaluados fueron: temperatura corporal, frecuencia cardiaca y respiratoria, color de mucosas, piel y estado de los nódulos linfáticos regionales.



Figura 2: Aplicaci3n percut3nea de CEM-MO en la no-uni3n.



Figura 3: Evoluci3n radiol3gica de la no-uni3n: Radiograf3a lateral de f3mur 8 semanas post-terapia celular: se aprecia una zona m3s radiodensa en la zona de no-uni3n, indica comienzo de actividad de osteog3nesis.

RESULTADOS

Las CEM-MO destinadas a la terapia tenían una morfología fibroblástica y eran adherentes al plástico. Comenzaron a evidenciarse signos radiológicos de regeneración ósea en el foco de fractura a partir de las 2 semanas posteriores al implante. A las 8 semanas post tratamiento regenerativo se observó un aumento de la densidad ósea, progresando la radio-opacidad (figura 3).

La evolución radiológica fue acompañada de una evolución clínica con retorno gradual al apoyo en el mismo lapso y el paciente fue capaz de caminar apoyando el miembro continuamente con una claudicación de 1 en la escala de Summer y Smith, (1988).

DISCUSIÓN

Una no-uni3n se produce cuando el proceso de regeneraci3n 3sea aparentemente ha cesado, hay movimiento en el sitio y la curaci3n es improbable sin intervenci3n (Millis y Jackson, 2006). En el presente caso cl3nico, el paciente presentaba una no-uni3n de resoluci3n inviable, bordes sin vascularizaci3n, no llen3ndose completamente la brecha, con bordes redondeados y sin aparente desencadenamiento del proceso osteog3nico (Mi-

llis y Jackson, 2006).

Los tratamientos tradicionales consisten en desbridar los bordes para favorecer la vascularizaci3n y utilizar un injerto 3seo aut3logo (Schwartz y col. 2009) o heter3logo. Este tratamiento exige una maniobra cruenta para extraer el autoimplante de hueso esponjoso o en caso de implantes heter3logos el riesgo del rechazo (Bennett y Rizolo, 1998; Henrich Younger y Chapman, 1989). Se han utilizado implantes de hueso heter3logo bovino desantigenizado, debido a que con el mismo se evita el rechazo al xenoinjerto y una intervenci3n quir3rgica adicional, que requiere el implante aut3logo (Semiglia y col. 2006).

En el presente caso, post- tratamiento tradicional, fractura fijada, no existieron evidencias de comienzo de procesos de osteog3nesis en los bordes, 8 semanas post-fijaci3n.

La aplicaci3n de CEM-MO con caracter3sticas de c3lula madre tiene varias ventajas comparada con los tratamientos tradicionales, debido a que las mismas poseen potente efecto inmunomodulador, as3 como angiog3nesis y osteopro-g3nesis (Carrade y Borjesson, 2013). Adem3s, la terapia celular requiere de una leve sedaci3n y su aplicaci3n puede ser percut3nea, que evita el procedimiento quir3rgico tradicional de colocar un implante y utilizar anestesia general, lo que implica

un riesgo para el paciente.

The International Society of Cellular Therapy (ISCT) determinó que, para denominar a unas CEM de CMM, tiene que tratarse de una fracción celular del estroma que posea características de ser adherentes al plástico, expandidas en cultivos celulares, tener morfología tipo fibroblástica, además de comprobar otras características como la diferenciación *in vitro* en tri-linaje (adiposo, cartilagosos y óseo) y realizar el inmuno-fenotipaje (Horwitz y col., 2005). Sin embargo, en CMM de especies domésticas no tiene tanta importancia el inmunotipicaje de las células por la escasez o ausencia de marcadores específicos de especie (Horwitz y col., 2005; Requicha y col., 2012).

En el presente trabajo utilizamos la nomenclatura de CEM para las células utilizadas, dado que sólo se comprobó que eran adherentes al plástico y que tenían morfología fibroblástica. No fueron caracterizadas por citometría de flujo, ni comprobada su multi-diferenciación. A pesar de esto, el método de aislamiento de las CEM-MO utilizado y las características de las células obtenidas de poseer morfología tipo fibroblástica y adherencia al plástico, concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores (Bruder y col., 1998; Jung y col., 2008; Martin y col., 2003), que sí caracteri-

zaron las células implantadas. En nuestro trabajo existió una evolución positiva del paciente con evidencias radiológicas y clínicas, comparando las imágenes correspondientes al inicio de la terapia celular y las de la semana 8 post-tratamiento de CEM sin andamio, donde se evidenciaron los bordes óseos del defecto y radio-opacidad, indicando que comenzaban los procesos de regeneración ósea con una reactivación del proceso regenerativo óseo. Nuestros resultados indican una consolidación acelerada a las 8 semanas, y concuerdan con lo descrito por Bruder y col. (1998) que en caninos con defectos de no-unión utilizaron CMM-MO autólogas y alogénicas (Arinzhe y col., 2003). Las células fueron asociadas a un andamio de cerámica que tiene propiedades osteo-conductoras (su composición es en su mayoría de calcio), y observó a las 8 semanas apariencia radio-opaca indicando la mineralización del tejido.

Resultados similares a los obtenidos en el presente reporte se obtuvieron en Uruguay con terapia celular con CMM alogénicas, Yaneselli y col. (2013), donde se aplicaron 10×10^6 CMM derivadas de tejido adiposo alogénicas, sobre una no-unión de radio asociada a un proceso de osteomielitis, en un canino adulto. Como resultado el paciente volvió utilizar el miembro afectado 16

semanas post-tratamiento y radiológicamente fue evidenciada la resolución del proceso de osteomielitis, comenzando los procesos de osteogénesis y no evidenciándose rechazo al aloimplante.

Los reportes que describen el uso de CMM como terapia alternativa a patologías óseas crónicas son escasos. En humanos fue tratada con éxito la osteonecrosis de la cabeza del fémur con la aplicación local de CMM-MO sobre el sitio necrosado, cabeza de fémur (Handschel y Meyer 2011; Kikuri y col., 2010); este trabajo coincide con la metodología empleada en el presente trabajo, aplicación de las células directamente en el sitio afectado. Los resultados obtenidos por (Gangji y col., 2011; Zhao y col., 2012) fueron reducción en los síntomas, reversión de la osteonecrosis y no existió reacción adversa. Estos tratamientos coinciden con los resultados obtenidos en el presente caso, donde hubo una evolución clínica positiva del paciente y promoción de la osteogénesis.

A pesar de las diferencias de tratamiento en cuanto a cantidad de células y el tipo de patologías óseas crónicas tratadas, existe un punto de convergencia en los resultados de los distintos trabajos planteados donde el efecto de las CEM y las CMM promueven la recuperación del paciente obteniendo una evolución positiva del paciente con evidencias radiológicas y clínicas. Ello se

atribuye a que las células utilizadas poseen características de inmunomodulación, angiogénesis y osteoprogenitoras. (Yaneselli y col., 2013; Kikuri y col., 2010; Zhao y col., 2012). Esto coincide con los resultados del presente trabajo donde existió una recuperación favorable del paciente.

En el presente tratamiento, hasta las 8 semanas post-tratamiento, no existieron evidencias de reacciones adversas (no hubo respuesta inflamatoria local o sistémica) en el paciente, coincidiendo con los resultados de otros autores (Arinzeh y col., 2003; Bruder y col., 1998; Jung y col., 2008; Yamada y col., 2004), que utilizaron en caninos implantes de CEM-MO caracterizadas como CMM, y demostraron que las CMM alogénicas tampoco provocaron una reacción inmune adversa al no detectar anticuerpos contra las células alogénicas implantadas.

CONCLUSIÓN

La terapia celular con CEM-MO aplicada sobre la no-unión contribuyó a la consolidación ósea y el retorno funcional del miembro. Nuevas investigaciones deben ser realizadas para evaluar la aplicación de CEM como terapia alternativa en casos crónicos de no-unión ósea para mejorar y acelerar los procesos regenerativos óseos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arinze TL, Peter SJ, Archambault, MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala, S. (2003). Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85:1927-1935.
2. Banfi A, Bianchi G, Galotto M, Cancedda R, Quarto R. (2001). Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment. *Leuk Lymphoma* 42:863-870
3. Barckman J, Baas J, Sørensen M, Bechtold JE, Søballe K. (2013). Rinsing of allograft bone does not improve implant fixation: a study in 12 dogs. *Acta Orthop* 84:307-313.
4. Bennett J, Rizzolo A. (1998). Bone grafting and its essential role in implant dentistry. *Dent Clin North Am* 42:91-98.
5. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80:985-996.
6. Carrade DD, Borjesson DL. (2013). Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med* 63:207-217.
7. da Silva Filho OG, Ozawa TO, Bachega C, Bachega MA. (2013). Reconstruction of alveolar cleft with allogeneous bone graft: Clinical considerations. *Dental Press J Orthod* 18:138-147
8. de Bakker E, Van Ryssen B, De Schauwer C, Meyer E. (2013). Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. *Vet Q* 33:225-233.
9. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurlesova AI, Frolova GP. (1968). Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6:230-247.
10. Gangji V, De Maertelaer V, Hauzeur J. (2011). Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone* 49:1005-1009.
11. Handschel J, Meyer U. (2011). Infection, vascularization, remodelling - are stem cells the answers for bone diseases of the jaws? *Head & Face Medicine* 7:5.
12. Henrich Younger EM, Chapman MW. (1989). Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3:192-195.
13. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans

- RJ, Krause DS, Keating A. (2005). International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 7:393-395.
14. Imanishi Y, Saito A, Komoda H, Kitagawa-Sakakida S, Miyagawa S, Kondoh H, Ichikawa H, Sawa Y. (2008) Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 44:662-671.
15. Jung DI, Im Ha J, Kim JW, Kang BT, Yoo JH, Park C, Lee JH, Park HM. (2008). Canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow: isolation, characterization, multidifferentiation, and neurotrophic factor expression in vitro. *J Vet Clin* 25:458-465.
16. Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, Chen C, Chen W, Wang S, Le AD, Shi S. (2010). Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 25:1668-1679.
17. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. (2003). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 30:879-886.
18. Millis DL, Jackson AM. (2006). Uniones demoradas, no uniones y maluniones. En: Slatter D. *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales* 3. ed. Buenos Aires, Inter-Médica pp.2116-2129.
19. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. (2001). Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 19:117-125
20. Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, Azevedo JM, Reis RL, Gomes ME (2012). Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev. & Rep* 8:1211-1222.
21. Schulz K. (2009). Fundamento de la cirugía ortopédica y manejo de las fracturas. In: Fossum T, Hedlund C, Johnson A, Schulz K, Seim H, Willard R, Bahr A, Carroll G, editors. *Cirugía en pequeños animales*. 3rd ed. Barcelona: Elsevier Mosby pp. 1333-1356.
22. Schwartz CE, Martha JF, Kowalski P. (2009). Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome. *Health Qual Life Outcomes* 7:49.

23. Semiglia G, Izquierdo D, Zunino J. (2006). Reparación de defectos esqueléticos en pequeños animales mediante implantes óseos xenogénicos desantigenizados: resultados preliminares. *Veterinaria (Montevideo)* 41:45-48.
24. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132-141.
25. Volk SW, Theoret C (2013). Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen* 21:382-394.
26. Volk SW, Wang Y, Hankenson KD. (2012). Effects of donor characteristics and ex vivo expansion on canine mesenchymal stem cell properties: implications for MSC-based therapies. *Cell Transplant* 21:2189-2200.
27. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K & Nagasaka T. (2004). Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 10:955-964.
28. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Arce C, Rial A, Muñoz N, Moreno M, Erickson K, Maisonnave J. (2013). Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 4:39-44.
29. Yoo HJ, Yoon SS, Park S, Park, WS, Kim DJ, Lee EB, Song YW. (2005). Production and characterization of monoclonal antibodies to mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. *Hybridoma (Larchmt)* 24:92-97.
30. Yu HJ1, Qiu LX2, Wang XZ1. (2013). Long-term follow-up of autogenous canine transplants with application of guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 43:355-361.
31. Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, Liu B, Yu X. (2012). Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone* 50:325-330.