

Recibido: 2 de febrero del 2012 Aprobado: 13 de abril del 2012

## CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES: UNA ALTERNATIVA PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA

### MESENCHYMAL STEM CELLS: AN ALTERNATIVE FOR BONE REGENERATION

Lina María Franco-González,<sup>1</sup> Luz Marina Restrepo-Múnera<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) residen en la médula ósea y tienen la capacidad de autorenovación y diferenciación a múltiples linajes: osteogénico, condrogénico, adipogénico, tenogénico. Además, sirven como reservorios involucrados en la homeostasis, mantenimiento y regeneración celular. Su aplicación en alteraciones óseas (defectos traumáticos, enfermedades inflamatorias y degenerativas) ha llevado al desarrollo de nuevas terapias osteo-conductivas o inductivas. Durante el proceso de diferenciación de las CMM al linaje osteogénico se requiere de la progresión de varios estadios celulares para alcanzar el desarrollo de la célula madura —osteocito—, responsable del balance y regulación de la formación de hueso; a su vez, las CMM pueden también diferenciarse a osteoclastos, involucrados en la pérdida de hueso (osteoclastogénesis). Diferentes vías de señalización han sido propuestas para comprender los mecanismos de este proceso de diferenciación osteogénica; sin embargo, aún no han sido completamente comprendidos debido a la complejidad de las vías de señalización y que además convergen en puntos comunes de activación, que finalmente llevan a las CMM a un fenotipo osteogénico.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales, diferenciación, osteogénesis.

#### ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells (MSC) are found in the bone marrow and have the capacity for self-renewal and differentiation in multiple lineages: osteogenic, condrogenic, adipogenic and thenogenic. They also serve as reservoirs involved in homeostasis, maintenance and cellular regeneration. Their application in bone alterations (traumatic defects, inflammatory and degenerative diseases) has led to the development of new osteo/conductive and/or inductive therapies. During the differentiation process of MSCs to the osteogenic lineage, the progression of several cellular states is required to achieve development of the mature cell —osteocyte—, responsible for the balance and regulation of bone formation; MSCs can also be differentiated from osteoclasts, which are involved in bone loss (osteoclastogenesis). Different signaling pathways have been proposed to understand the mechanisms of this process of osteogenic differentiation; however, these have not yet been completely understood due to the complexity of signaling pathways and because they converge in common activation points, finally leading the MSCs to an osteogenic phenotype.

**Keywords:** mesenchymal stem cell, differentiation, osteogenesis.

Cómo citar este artículo: Franco-González LM, Restrepo-Múnera LM. Células madre mesenquimales: una alternativa para la regeneración ósea. Revista Nacional de Odontología. 2012; 8(15): 79-86.

<sup>1</sup> Odontóloga. Cirujana oral maxilofacial. Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad de Antioquia. Docente de la Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad

de Odontología, sede Envigado. Correos electrónicos: linarancog@yahoo.es, lina.franco@campusucc.edu.co

<sup>2</sup> Bióloga de la Universidad de Antioquia. Doctora en Ciencias de la Universidad de París. Profesora titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Correo electrónico: grupoitto@yahoo.es

## Introducción

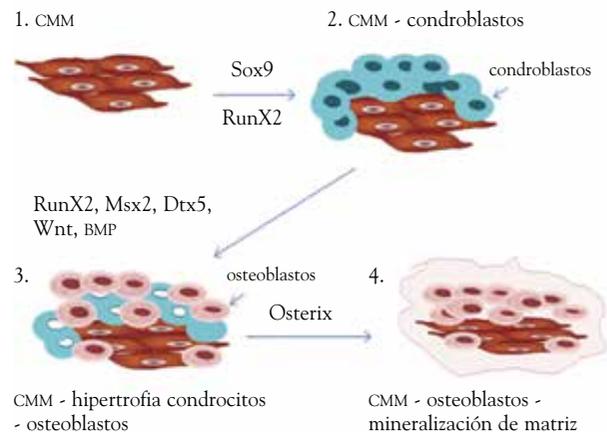
Macroscópicamente, el hueso cuenta con una cubierta externa llamada cortical o hueso compacto y una matriz interna medular que le confiere óptimas propiedades mecánicas.<sup>1</sup> De forma microscópica, el hueso está constituido por unidades básicas llamadas osteones o sistema Haversiano, que ayudan al intercambio celular y nutricional. A su vez, el hueso está compuesto por una matriz mineral (hidroxiapatita 65%), una matriz orgánica fibrilar (colágeno 90%, lípidos y proteínas), agua y tres sistemas celulares principales: células madre hematopoyéticas (CMH), células madre mesenquimales (CMM) y células endoteliales.<sup>2</sup>

El desarrollo del hueso fetal se denomina osteogénesis, proceso activo iniciado por las CMM que permite, en los estados adultos, contribuir al mantenimiento y remodelación ósea mediante la interacción de varios factores como son: 1) participación de células específicas (osteoclastos y osteoblastos); 2) tipo de la matriz (hidroxiapatita y moléculas de matriz extracelular); 3) expresión de moléculas solubles (citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, iones y vitaminas) y 4) estímulos mecánicos (movimientos, fuerzas, estrés).<sup>3</sup>

La osteogénesis se inicia con la formación de cúmulos de CMM, dentro de los cuales ocurre la diferenciación a linaje condrogénico (CMM-condroblastos-condrocitos), los cuales bordean los cúmulos de CMM para conformar el pericondrio y secretar colágeno tipo 2a1 y agregan; además, expresa el factor de transcripción Sox9 que participa en la diferenciación al linaje condrogénico y el Runx2 que está involucrado en la proliferación e hipertrofia de los condrocitos y en la diferenciación de CMM al linaje osteoblástico.<sup>4,5</sup>

En el proceso final de formación ósea ocurre la hipertrofia de los condrocitos que sufren apoptosis, dejando una matriz de cartílago para ser colonizada por los osteoblastos y vasos sanguíneos. Durante esta etapa final de formación de hueso se expresan diversas moléculas osteogénicas alrededor del pericondrio como proteínas morfogenéticas óseas (BMP del inglés Bone Morphogenetic Protein) 2, 4 y 7, péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PrHPT) e Indian hedgehog (Ihh), que regulan la diferenciación

osteoblástica (CMM-osteoblastos-osteocitos), mediante la activación de vías de señalización independientes e interconectadas<sup>6</sup> (figura 1).



Nota: 1) agrupación de CMM; 2) expresión de los factores de transcripción Sox9 y RunX2 para diferenciación de CMM a condroblastos y luego a condrocitos (azul); 3) producción de otros factores de transcripción que inducen la hipertrofia de los condrocitos y diferenciación de CMM a osteoblastos (rosa); 4) expresión de factor de transcripción Osterix que induce la mineralización de la matriz.

**Figura 1.** Proceso de diferenciación de CMM a linaje osteoblástico

Fuente: las autoras

En los adultos la pérdida de masa ósea es frecuente y se atribuye a trauma y a patologías óseas; en estos casos la reconstrucción o formación de hueso nuevo puede ser compleja y está condicionada por diferentes factores (el tamaño del defecto, la perfusión sanguínea, la disponibilidad del tejido donante y el proceso de cicatrización) que determinan el buen pronóstico en la recuperación.

A diferencia de la osteogénesis, la recuperación de hueso en los adultos involucra procesos de inflamación, fuerzas mecano-sensitivas y disminución de la población de CMM en el sitio de la lesión, implicando dos mecanismos de osificación, que pueden darse de forma independiente o combinada, dependiendo del tipo de fractura: 1) osificación intramembranosa, aquí las CMM que se encuentran en un área altamente vascularizada son inducidas a la diferenciación de osteoblastos y luego a osteocitos, los cuales sintetizan una

matriz ósea rica en colágeno, y 2) osificación endocondral (formación de callo) en la que las CMM se diferencian en condroblastos y luego en condrocitos que producen una matriz cartilaginosa.<sup>7</sup>

Hasta ahora, las estrategias convencionales para la recuperación de hueso han involucrado el uso de injertos óseos *autólogos* provenientes de la cresta iliaca, peroné, tibia y costilla, *aloinjertos* entre los que se tienen la hidroxiapatita, fosfato  $\beta$ -tricálcico y xenoinjertos, comúnmente de origen bovino; todos con diferentes características estructurales y técnicas quirúrgicas de osteodistracción y procedimientos microvasculares.<sup>8</sup> Sin embargo, estas estrategias presentan inconvenientes entre los que se destacan la morbilidad del sitio donante, la poca disponibilidad de tejido, enfermedad injerto *vs* huésped al utilizar aloinjertos, altos porcentajes de reabsorción en el tiempo (xenoinjertos o materiales sintéticos) y cicatrización ósea parcial. Estas desventajas han llevado al surgimiento de nuevas terapias que utilizan las CMM como herramienta para la recuperación de defectos traumáticos, enfermedades inflamatorias y degenerativas del tejido óseo y conectivo.<sup>9</sup>

## Células madre mesenquimales

### Generalidades

Las CMM fueron identificadas inicialmente por Friedenstein y colaboradores en 1968<sup>10</sup> en el hueso medular adulto; se describieron como una población celular con morfología ahusada, adherentes y con capacidad de regenerar hueso *in vivo*.<sup>11</sup> Pero fue Caplan quien en 1991<sup>12</sup> describió su capacidad multipotente y estimó su presencia entre 0,01 y el 0,001% de la población total de las células de médula ósea en adultos.<sup>13</sup> Otros nichos de CMM son el folículo piloso, tejido subcutáneo,<sup>14</sup> adiposo,<sup>15</sup> ligamento periodontal,<sup>16</sup> timo, bazo, placenta, cordón umbilical, gelatina de warton,<sup>17</sup> pulmón, sangre e hígado.<sup>15</sup> No obstante, las fuentes más comunes y que presentan entre 80 y 100% de eficiencia en su obtención son médula ósea, tejido adiposo y sangre de cordón umbilical.<sup>18</sup> Aunque las CMM pueden ser expandidas en cultivo como poblaciones homogéneas sin diferenciarse, ciertas condiciones en el microambiente pueden modular su diferenciación hacia linajes celulares de origen mesodérmico

(osteoblastos, condroblastos, adipocitos y tenocitos), ectodérmico y endodérmico (cardiomiocitos, hepatocitos, neuronas, células endoteliales, epiteliales pulmonares y pancreáticas).<sup>19-22</sup>

Para la identificación de estas células se ha propuesto un grupo de moléculas que se expresan en su membrana y comprenden: moléculas de adhesión (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, LFA-3, ALCAM, CD72), receptores de matriz extracelular como las integrinas  $\alpha$  e isoformas  $\beta$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  *av*,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ),<sup>22-24</sup> receptor de colágeno ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ), laminina ( $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ), fibronectina ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ) y vitronectina ( $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ), moléculas que participan en las interacciones célula-célula y célula matriz-extracelular (tabla 1). Sin embargo, estos marcadores también pueden estar presentes en células endoteliales y musculares y se pueden expresar de forma transitoria durante el proceso de diferenciación.<sup>25</sup>

**Tabla 1.** Marcadores usados para la identificación de CMM<sup>26, 27</sup>

|  |  |
|--|--|
| Marcadores positivos comúnmente usados para la identificación de CMM | CD9, CD13, CD73, CD90, CD105, CD146, CD157, SH3, D7-FIB, STRO-1, HLA I   |
| Otros marcadores usados para la identificación de CMM                | CD44, CD50, CD54, CD56, CD58, CD62L, CD102, CD106, CD166   |
|  | CD29, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD49f, CD51, CD61, CD104   |
|  | CD71, CDw119, CD120, CD121, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, FGFR, CD271  |
| Marcadores negativos para CMM  | CD1a (T6), CD14 (receptor de lipopolisacáridos), CD34, CD45 (antígeno común de leucocitos), CD123 (AC123, precursor-células madre hematopoyéticas) |
|  | CD3, CD11a, CD14, CD15, CD28, CD31, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD80, CD86, CD117, CD144, MHC II  |

Fuente: el autor, basado en Pountos et al.<sup>26</sup> y Owen<sup>27</sup>

La capacidad inmunomoduladora es una propiedad interesante de las CMM, pues inhiben el reconocimiento de aloantígenos por parte de las células T, células presentadoras de antígenos y las células asesinas naturales. Además, secretan citoquinas y factores de crecimiento del tipo TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-1, IL-10 y Factor de Crecimiento Hepático que promueven la actividad inmunosupresora.<sup>23, 28</sup>

### Diferenciación de cmm a linaje osteogénico

Las CMM son consideradas como un análogo del sistema hematopoyético, ya que residen en el hueso medular y mantienen una capacidad de renovación y diferenciación a varios tipos de tejido conectivo incluyendo el linaje osteogénico. Su diferenciación *in vivo* a este linaje está dada por tres estados de actividad celular: proliferación, maduración de la matriz extracelular y mineralización de la misma, y está regulada por factores transcripcionales esenciales como Runx2 (Cbfa1) y PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptors gamma),<sup>29</sup> que incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina, la producción de colágeno tipo I y la osteocalcina.<sup>30</sup>

Aunque las vías de señalización involucradas no se han esclarecido totalmente, se sugiere que las implicadas son: 1) RANK/RANKL, involucrada en el proceso de osteogénesis y osteoclastogénesis (regulación de la pérdida de la masa ósea);<sup>2, 31</sup> 2) TNF- $\alpha$ , que activa el NF- $\kappa$ B induciendo las vías específicas para el linaje osteogénico que incluye a los receptores BMP-2, Factor de Crecimiento Insulinoide 1 (IGF1) y Factor de Crecimiento Fibroblástico 2 (FGF 2), que participan en la diferenciación de las CMM. Esta vía también interviene en funciones del sistema inmune y en la regulación de la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y muerte celular;<sup>32, 33</sup> 3) Proteínas Smad, que median la señalización de los receptores BMP, que son reguladores del crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares, pertenecen a la familia de los receptores TGF- $\beta$  y se clasifican en: i) tipo I: receptores ALK-3, ALK-6 y ALK-2<sup>34, 35</sup> y ii) receptores tipo II: receptores BMP tipo II (BMPRII) y receptores activin tipo II y tipo IIB (ActRII y ActRIIB).<sup>36, 37</sup> Actualmente, han sido identificados cerca de 20 ligandos que interaccionan con estos receptores, siendo los ligandos

BMP-7 y BMP-2 los que están implicados en la formación de hueso nuevo *in vivo*,<sup>38</sup> mientras que BMP-4 y BMP-6 participan en la diferenciación osteogénica de CMM *in vitro*;<sup>33</sup> 4) Vías de señalización activadas por las proteínas CCN (proteínas ricas en cisteína) involucradas en los procesos de adhesión, migración y supervivencia celular, y que, además, se han asociado con la remodelación y reparación de hueso, cartílago, músculo, sistema vascular y sistema nervioso. Entre las vías activadas por estas proteínas están: la CYR61/CCN1 que es una vía común para la diferenciación de CMM a linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico, mientras que CTGF/CCN2, WISP2/CCN5 y WISP3/CCN6 son específicas para la función y progresión de las CMM hacia la vía osteogénica;<sup>39</sup> y 5) Vía de señalización Wnt que regula el desarrollo, proliferación y movilidad celular. Involucra dos cascadas: i) Wnt canónicas (vía dependiente de  $\beta$  catenina) que comprende las proteínas Wnt 1, 2, 3, 3a, 8 y 8b y ii) Wnt no canónicas en la que participan las proteínas Wnt 4, 5a, 5b, 6, 7a y 11. Ambas cascadas se relacionan con el control de los diferentes linajes en los que se pueden diferenciar las CMM.<sup>40, 41</sup> En el establecimiento del linaje osteogénico, la vía que predomina es Wnt canónica, que induce la expresión de los factores de transcripción RUNX2, Dlx5.<sup>42</sup>

### Aplicación de cmm en la regeneración ósea

El uso de CMM en la medicina regenerativa ofrece múltiples soluciones para defectos tisulares ocasionados por patologías o trauma, generando un campo de interés para la investigación básica aplicada a problemas de la salud.<sup>43</sup>

Diferentes estudios en modelos animales con defectos en huesos largos han demostrado que la aplicación de CMM en combinación con biomateriales mejoran el volumen de masa ósea y conservan la longitud y formación de hueso nuevo, lo que conduce a un proceso de cicatrización más eficiente y a un mejor pronóstico para la corrección del defecto.<sup>44, 45</sup>

En la ingeniería de tejidos, las matrices artificiales han servido como soporte temporal que cumple la función de matriz extracelular y ayuda a la adhesión y migración celular para la formación de tejido óseo. En la estrategia de crear nuevo hueso hay tres

elementos críticos: 1) factores de crecimiento para la osteoinducción; 2) células para la osteogénesis y 3) matrices para la osteoconducción.<sup>25</sup> Este conjunto de elementos contribuye a la secreción de sustancias químicas (factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante- $\beta$ , factor de crecimiento endotelial, y factor de crecimiento insulinoide) que participan en la proliferación, formación de matriz, síntesis de colágeno, producción osteoide y otros procesos que aceleran la regeneración del tejido.<sup>28</sup> La mayoría de matrices utilizadas son biodegradables con el objetivo de promover la unión celular y guiar a la formación de un tejido tridimensional como lo haría la matriz extracelular natural. Las matrices más comúnmente usadas son la hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TPC), absorbibles como colágeno, ácido hialurónico, quitosan, polímeros polilácticos, entre otros, que poseen tipos de degradación comparables con la de formación de nuevo hueso. Todas las matrices deben brindar características como la biocompatibilidad, suficiente estabilidad mecánica, fácil manufactura, esterilidad, porosidad para servir de nicho a osteoblastos y células ostoprogenitoras y fácil manipulación en el procedimiento quirúrgico.<sup>29, 30</sup> Por lo tanto, la plasticidad de las CMM y las propiedades que brindan las matrices pueden permitir una opción de tratamiento atractiva en la reconstrucción de los defectos óseos que garantizan la formación de nuevo hueso tridimensionalmente con menor morbilidad para el paciente.

La utilidad de esta aproximación ha sido demostrada por diferentes autores. Dong y colaboradores,<sup>46</sup> en un modelo de conejos a los que se les indujo fractura en el radio, describieron la recuperación del defecto óseo a las 12 semanas posimplantación del injerto de CMM embebidas en una matriz acelular. La recuperación fue atribuida a la diferenciación de las CMM que al término del estudio expresaron factores osteogénicos como: Cbfa1, osteocalcina, osteopontina, colágeno tipo I y fosfatasa alcalina. Los estudios radiográficos mostraron la completa cicatrización del defecto.

De otro lado, Zhao y colaboradores,<sup>47</sup> en un modelo de osteotomía femoral en ratas (defecto de 6 mm) tratadas con CMM adheridas a bloques de calcio bifásico, observaron la formación de un puente óseo en

el sitio del defecto a las 12 semanas postratamiento, a diferencia del grupo control que no se recuperó. El mayor beneficio de este abordaje terapéutico consistió en el mantenimiento de la longitud del hueso afectado y la formación de nuevo hueso.

El uso de CMM en humanos ha mostrado resultados similares a los observados en otras especies. Horwitz y colaboradores realizaron trasplante de CMM en tres niños con osteogénesis imperfecta; a los tres meses de seguimiento se observaron cambios histológicos que indicaron formación de hueso nuevo e incremento en la masa ósea de 21 a 29 g, comparado con los valores predictivos (0 a 4 g) para niños sanos con cambios similares en el peso, además, reducción en la frecuencia de fracturas óseas.<sup>48, 49</sup>

Las CMM en humanos también han sido aplicadas en otros tipos de situaciones como la cicatrización de no-uniones en huesos largos, defectos óseos de los maxilares y labio y paladar fisurado. En el primer caso, se observó un aumento del volumen de mineralización y estabilidad del callo óseo, y aunque se evidenció la funcionalidad de este tratamiento, se presentaron diferencias en el proceso de cicatrización dependiendo del número de CMM inyectadas.<sup>50</sup> En cuanto a los defectos de los maxilares, los hallazgos clínicos y radiológicos en los pacientes a los dos meses postratamiento mostraron un hueso maduro similar al adyacente, y a los cuatro meses se observó una osificación completa que permitió realizar la rehabilitación con implantes dentales.<sup>51</sup> Por último, en malformaciones congénitas como el labio y paladar fisurado (CL/P), la aplicación de CMM y plasma rico en plaquetas indujo la recuperación hasta en un 79,1% del volumen óseo, facilitando procedimientos posteriores de vestibuloplastias y tratamientos ortodónticos.<sup>52</sup> De esta forma, se demuestra la versatilidad de las CMM en la osteoregeneración, situándolas como punto clave en las estrategias para la recuperación de defectos óseos.

## Conclusión

El hueso es una estructura compleja constituida esencialmente por una matriz mineral y un conjunto de células involucradas en los mecanismos homeostáticos. Las CMM constituyen un pequeño porcentaje de

este grupo; sin embargo, sus características funcionales las convierten en un tipo celular de alto interés en la terapia regenerativa ósea. El uso directo de CMM en la osteoregeneración ha tenido resultados significativos en la formación de hueso nuevo y la capacidad de estas células para interactuar con matrices y biomateriales que permiten optimizar el proceso de cicatrización, proporcionando otra alternativa de intervención.

Actualmente estamos trabajando en la fenotipificación de células obtenidas de un nuevo sitio donante (fragmentos de hueso córtico medular de mentón). La caracterización de estos fragmentos tendría grandes ventajas sobre el aspirado de médula ósea de cresta ilíaca convencional por su facilidad de obtención y expansión celular, menor dolor durante la intervención y poca morbilidad asociada, convirtiéndolo en una alternativa de tratamiento para defectos óseos pequeños de los maxilares en cirugía peri-implantar, preprotésica, periodontal y maxilofacial.

## Referencias

1. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* Jul 1994; 55(3): 287-99.
2. Hutchison C, Pilote M, Roy S. The axolotl limb: a model for bone development, regeneration and fracture healing. *Bone.* Ene 2007; 40(1): 45-56.
3. Noonan KJ, Hunziker EB, Nessler J, Buckwalter JA. Changes in cell, matrix compartment, and fibrillar collagen volumes between growth-plate zones. *J Orthop Res.* Jul 1998; 16(4): 500-8.
4. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays.* Feb 2000; 22(2): 138-47.
5. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* Nov 2002; 16(21): 2813-28.
6. Deschaseaux F, Sensebe L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med.* Sep 2009; 15(9): 417-29.
7. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev.* Sep 1999; 87(1-2): 57-66.
8. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* Oct 2001; 10 Suppl 2: S96-101.
9. Moreau JL, Caccamese JF, Coletti DP, Sauk JJ, Fisher JP. Tissue engineering solutions for cleft palates. *J Oral Maxillofac Surg.* Dic 2007; 65(12): 2503-11.
10. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* Mar 1968; 6(2): 230-47.
11. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* Oct 1970; 3(4): 393-403.
12. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* Sep 1991; 9(5): 641-50.
13. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* Jun 2002; 1(2): 92-100.
14. 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.* Ago 2005; 23(7): 1012-20.
15. In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.* Ago 2003; 88(8): 845-52.
16. Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A et al. Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol.* Abr-Jun 2005; 18(2): 213-21.
17. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* Abr 2000; 109(1): 235-42.
18. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med.* Jul 2008; 233(7): 901-13.
19. Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells.* 2004; 22(5): 823-31.
20. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. Pluripotency

- of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. Jul 2002; 418(6893): 41-9.
21. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. Ago 2000; 61(4): 364-70.
  22. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. May 1999; 284(5417): 1168-70.
  23. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. Mar-Abr 2003; 10(2): 228-41.
  24. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*. Jun 2001; 226(6): 507-20.
  25. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
  26. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. Sep 2007; 38 Suppl 4: S23-S33.
  27. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: Peck WA (ed.) *Bone and mineral research*. New York: Elsevier; 1985. p. 1-25.
  28. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. May 2002; 99(10): 3838-43.
  29. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. May 1997; 89(5): 747-54.
  30. Siddappa R, Fernandes H, Liu J, van Blitterswijk C, de Boer J. The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. Sep 2007; 2(3): 209-20.
  31. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*. Abr-Jun 2007; 32(2): 103-10.
  32. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. Jun 2004; 25(6): 280-8.
  33. Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, Brenner RE, Wirth T. TNFalpha promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. *Bone*. Ago 2009; 45(2): 367-76.
  34. Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE et al. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*. Sep 1994; 14(9): 5961-74.
  35. Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem*. Oct 1998; 273(40): 25628-36.
  36. Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC et al. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol*. Jul 1995; 130(1): 217-26.
  37. Nohno T, Ishikawa T, Saito T, Hosokawa K, Noji S, Wolsing DH et al. Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem*. Sep 1995; 270(38): 22522-6.
  38. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol*. Ago 2002; 4(8): 599-604.
  39. Li CL, Martinez V, He B, Lombet A, Perbal B. A role for CCN3 (NOV) in calcium signalling. *Mol Pathol*. Ago 2002; 55(4): 250-61.
  40. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*. Mar 2009; 433(1-2): 1-7.
  41. Latinkic BV, Mercurio S, Bennett B, Hirst EM, Xu Q, Lau LF et al. *Xenopus* Cyr61 regulates gastrulation movements and modulates Wnt signalling. *Development*. Jun 2003; 130(11): 2429-41.
  42. Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. Nov 2002; 115(Pt 21): 3977-8.
  43. Wongchuensoontorn C, Liebehenschel N, Schwarz U, Schmelzeisen R, Gutwald R, Ellis E 3rd et al. 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. *J Craniomaxillofac Surg*. Apr 2009; 37(3): 155-61.
  44. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med*. Ene-Mar 2005; 9(1): 72-84.
  45. Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, Xie Z, Yu ZJ, Zhu CH et al. Bone regeneration using an acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal stem cells

- expressing Cbfa1. *Biosci Biotechnol Biochem.* Oct 2009; 73(10): 2226-33.
46. Zhao Z, Yang D, Ma X, Zhao H, Nie C, Si Z. Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator. *Tohoku J Exp Med.* Oct 2009; 219(2): 115-20.
47. Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK et al. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord.* 2009; 10: doi:10.1186/1471-2474-10-20
48. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* Mar 1999; 5(3): 309-13.
49. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* Jul 2005; 87(7): 1430-7.
50. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Mar 2009; 38(3): 201-9.
51. Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Jun 2006; 35(6): 551-5.