UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería,
Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

Tesis Doctoral

Desarrollo de estrategias para el cultivo, proliferación y diferenciación de progenitores mesenquimales de médula ósea dirigidas a la búsqueda de terapias regenerativas esqueléticas

Silvia Claros Gil

Directores: Dr. José A. Andrades Gómez

y Dr. José Becerra Ratia

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Málaga, 2009

AUTORA: Silvia Claros Gil

https://orcid.org/0000-0002-3428-8378

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode
Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.
No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. JOSÉ A. ANDRADES GÓMEZ, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y

D. JOSÉ BECERRA RATIA, Catedrático de Biología Celular, del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN

Que Doña Silvia Claros Gil, Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo recogido en la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada "Desarrollo de estrategias para el cultivo, proliferación y diferenciación de progenitores mesenquimales de médula ósea dirigidas a la búsqueda de terapias regenerativas esqueléticas" para la obtención del Título de Doctor en Biología.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga a 27 de mayo de 2009.

Fdo. José A. Andrades Gómez

Fdo. José Becerra Ratia

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. JOSÉ BECERRA RATIA, Director del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

INFORMA

Que Doña Silvia Claros Gil, ha realizado en los laboratorios de este departamento el trabajo experimental que ha permitido la elaboración de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firmo la presente en Málaga a 27 de mayo de 2009.

Fdo. José Becerra Ratia

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Quisiera agradecer a todas estas personas que han hecho posible la realización de este trabajo, por todo su apoyo, ayuda desinteresada y consejos. ***MUCHAS GRACIAS A TODOS.***

Gracias a mis directores de tesis, José Antonio Andrades y José Becerra, por ser mis referentes como investigadores, por ser personas apasionadas con su trabajo, que decidieron elegir el camino del saber como forma de vida. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio y confiar en mí, por ser mis guías científicos y por haberme ayudado tanto en esta última etapa. Sin vuestra ayuda no hubiese sido posible.

Gracias a mis padres y a Luis, gracias por todo, porque sin vosotros jamás hubiese sido posible. Gracias mamá por compartir tantas cosas conmigo, por ser como eres, tienes estrella e iluminas a quien se cruza en tu camino. Gracias papá, por tu apoyo, cariño y generosidad, por haber sido un luchador y demostrarme que cuando uno quiere puede, porque no hay mejor ejemplo que tú. Gracias Luis, por ser parte de mí, por aguantarme una y otra vez, por tu comprensión, por tu ilusión y alegría ilimitadas que me contagias tantas veces, gracias por dejarme formar parte de tu vida y hacer la mía tan feliz. Gracias una vez más, esta tesis es en parte vuestra.

Gracias a Ricardo Pardal, Juanjo Toledo y José López Barneo, por acogerme tan amablemente en el laboratorio y darme la oportunidad de aprender tanto de vosotros.

Gracias a A. Hari Reddi, porque ha sido increíble conocer a alguien de su categoría, como persona e investigador, y comprobar la sencillez y cercanía de la que sólo las personas de tanta entidad como usted poseen.

Gracias a José Manuel García Verdugo y Carmen Bellver, del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, y a Jerónimo Blanco y Nuria Rubio, del Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC) de Barcelona, por su ayuda desinteresada en la microscopía electrónica y el ensayo con bioluminiscencia no invasiva. Mil gracias.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Gracias a David, del Servicio de Microscopía óptica y confocal y Citometría de la Universidad de Málaga, por ayudarme en todo momento y por amenizar las horas de trabajo delante del ordenador y el microscopio.

Gracias a todas las personas, que me han ayudado en mayor o menor medida en la realización de este trabajo: Helen, Lolín y Mónica; Liz, Will y Pedro; Patri, Luis y Ruth; Belén, Alicia y Diana; Noela; David, Inés y Raquel; José Estebán; Pilar, Rick, Leonor, Dani, Iván y Eva; Jesús Santamaría; Pepi; Manolo; José Manuel; Antonio; Jesús Mateos; María Dolores; Marga; Antonia; Ángel; Ana; y mis niñas de Sevilla, Ana, Ana Belén, Elena, Nela y Rocío.

Gracias a todos mis amigos, con los que he compartido tantos momentos y experiencias, por permitirme conoceros y descubrir personas maravillosas en cada uno de vosotros. Gracias por estar ahí.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecerme a mí misma la tenacidad y voluntad mostradas hasta la fecha. Porque todos vosotros habéis sido más o menos importantes, pero como me dice Luis todos los días, soy una campeona!

El presente trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía (FPDI, 2003), Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS PI061855), Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2006-03599), Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (TCRM 0012/2006), Proyectos de Excelencia de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (P07-CVI-2781) y Red de Terapia Celular. Instituto de Salud Carlos III. RD06/0010/0014.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

A mis padres

A Luis

-Sorprendernos por algo es el primer paso

de la mente hacia el descubrimiento-

Louis Pasteur

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS

A

7-AAD 7-amino-actinomicina D

ADH Cultivo de células en monocapa

ADH-MCO Cultivo de células adherentes con el MCO

ASC-2P Ascorbato-2-fosfato

B

BLI Bioluminiscencia no invasiva

BMP Proteína morfogenética ósea

BMPR Receptor de la BMP

BMSC *Bone Marrow-derived Multipotent Stem Cell*

BNF 10% Solución fijadora de formalina neutra tamponada al 10%

BSA Albúmina sérica bovina

C

CCD Dispositivo de acoplamiento de carga (*charged coupled device*)

CDMP Proteína derivada del cartílago

CFU-F Unidades formadoras de colonias fibroblásticas

CK-18 Citoqueratina-18

D

DAB 3,3'-diaminobencidina

Dex Dexametasona

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMEM-12 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*

DMEM-HG *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

E

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

EEM Error estándar de la media

F

FA Fosfatasa alcalina

FACS Clasificador de células activadas por fluorescencia (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*)

FBS Suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*)

FC Factor de crecimiento

FGF Factor de crecimiento fibroblástico

FISH Hibridación *in situ* con fluorescencia (*fluorescence in situ hybridization*)

FS *Forward Scatter*

G

GDF Factor de crecimiento/diferenciación

GFAP Proteína ácida fibrilar glial

GFP Proteína verde fluorescente

GH Hormona del crecimiento

β-GP β-glicerolfosfato

H

HGF Factor de crecimiento de hepatocitos

HIF-2α Factor de transcripción inducido por hipoxia-2α

HLA Antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad

HNF-1 Factor nuclear de hepatocitos-1

HSC Célula madre hematopoyética

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

I

IGF Factor de crecimiento insulínico

IGFBP Proteína de unión para factor de crecimiento tipo insulínico

Ihh *Indian hedgehog*

IP Ioduro de propidio

ISCT Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*)

M

MAPC Célula progenitora adulta multipotencial (*Multipotent Adult Progenitor Cell*)

MAPK Proteína quinasa activada por mitógeno

MASC Célula troncal adulta multipotencial (*Multipotent Adult Stem Cell*)

MCO Método de capacitación osteogénica

MCO-ADH Cultivo de células procedentes del MCO en monocapa

MEC Matriz extracelular

MIAMI *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cell*

MMP Metaloproteinasa de la matriz extracelular

MOD Matriz ósea desmineralizada

MSC Célula madre mesenquimática (*Mesenchymal stem cell)*

N

NO ADH Células del MCO que no se adhieren al plástico

O

OP Proteína osteogénica

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

P

PB Tampón fosfato

PBS Tampón fosfato salino

PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PF 4% Solución fijadora de paraformaldehído al 4%

PLuc Luciferasa de *Photinus Pyralis*

pNPP p-nitrofenol fosfato

PTHrP Hormona paratiroidea

S

SP *Side population*

SS *Side Scatter*

SSEA *Stage-specific embryonic antigen*

α-SMA α-actina de músculo liso

T

TCSC Célula madre comprometida a un tejido (*tissue committed stem cell*)

TGF-β Factor de crecimiento transformante beta

TGFβR Receptor del TGF-β

V

VEGF Factor de crecimiento del endotelio vascular

VSEL *Very Small Embryonic Like Stem Cell*

vWF Factor de von Willebrand

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN 1

1.1. CÉLULAS TRONCALES O CÉLULAS MADRE 1

1.1.1. Células troncales embrionarias 2

1.1.2. Células troncales adultas 3

1.1.2.1. Células madre mesenquimales 4

1.1.2.1.1. Inmunofenotipo de las MSCs 5

1.1.2.1.2. Nicho de las MSCs 7

1.1.2.2. Células side population 12

1.1.2.3. Células progenitoras adultas multipotenciales (MAPCs) 13

1.1.2.4. Células CD133+ 14

1.2. FACTORES DE CRECIMIENTO 15

1.2.1. Factor de crecimiento transformante β (TGF-β) 18

1.2.1.1. Isoformas y receptores del TGF- β 19

1.2.1.2. TGF- β1 21

1.2.2. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) 23

1.2.2.1. Actividad biológica de las BMPs 24

1.2.2.2. Isoformas y receptores de las BMPs 26

1.2.2.3. BMP-2 27

1.3. HISTOGÉNESIS DEL HUESO 28

1.3.1. Osificación intramembranosa 29

1.3.2. Osificación endocondral 30

1.3.2.1. Factores reguladores de la osificación endocondral 34

1.4. CITOMETRÍA DE FLUJO 37

1.4.1. Características 37

1.4.2. Fundamentos 37

1.4.3. Aplicaciones 39

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 41

MATERIAL Y MÉTODOS 43

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN **43**

2.2. EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA DE RATA **43**

2.3. ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA HUMANA **44**

2.4. MÉTODO DE CAPACITACIÓN OSTEOGÉNICA (MCO) **44**

2.5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS **46**

2.5.1. Cuantificación de ADN **46**

2.5.2. Análisis de la expresión de fosfatasa alcalina **47**

2.6. CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES **47**

2.7. CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES CON EL MCO (ADH-MCO) **47**

2.7.1. Diferenciación osteogénica **48**

2.7.1.1. Cuantificar ADN en placas de 35 mm **48**

2.7.1.2. Expresión de fosfatasa alcalina en placas de 35 mm **50**

2.7.1.3. Determinación de fosfato cálcico en placas de 35 mm **51**

2.7.2. Diferenciación condrogénica **51**

2.7.3. Diferenciación adipogénica **52**

2.7.4. Diferenciación hacia el linaje endotelial **52**

2.7.5. Diferenciación hacia linajes neuroectodérmicos **53**

2.7.6. Diferenciación hacia linajes endodérmicos **53**

2.8. CITOMETRÍA DE FLUJO **53**

2.8.1. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio fenotípico **53**

2.8.2. Preparación de las muestras para el estudio fenotípico **55**

2.8.3. Preparación de las muestras para el análisis de ADN **55**

2.8.4. Procedimiento de análisis en el citómetro **55**

2.9. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA **56**

2.10. IMPLALNTES ECTÓPICOS **57**

2.11. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO **59**

2.11.1. Histoquímica **59**

2.11.2. Inmunohistoquímica **60**

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.12. ENSAYO DE BIOSEGURIDAD **62**

2.12.1. Metodología **62**

2.12.1.1. Imágenes adquiridas **63**

2.13. TRATAMIENTO DE-DATOS **64**

APÉNDICE I: PROTOCOLOS Y RECETAS **65**

APÉNDICE II: PRODUCTOS Y EQUIPOS EMPLEADOS **78**

RESULTADOS **85**

3.1. CULTIVOS ADHERENTES DE MÉDULA ÓSEA **85**

3.2. SELECCIÓN DE PROGENITORES DE MÉDULA ÓSEA TRAS CULTIVOS EN GEL DE COLÁGENO: CAPACITACIÓN OSTEOGÉNICA **89**

3.3. CARACTERIZACIÓN DE PROGENITORES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA TRAS CULTIVOS ADHERENTES Y MCO **93**

3.3.1. Tamaño y granularidad celular **93**

3.3.2. Marcadores de superficie celular **95**

3.4. SELECCIÓN DE PROGENITORES PLURIPOTENCIALES HUMANOS Y SU DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* **101**

3.4.1. Diferenciación hacia linajes mesodérmicos **104**

3.4.1.1. Diferenciación osteogénica **104**

3.4.1.2. Diferenciación condrogénica **107**

3.4.1.3. Diferenciación adipogénica **108**

3.4.1.4. Diferenciación hacia el linaje endotelial **109**

3.4.2. Diferenciación hacia linajes neuroectodérmicos **111**

3.4.3. Diferenciación hacia linajes endodérmicos **114**

3.5. ESTUDIOS *IN VIVO*. HISTOGÉNESIS EN IMPLANTES ECTÓPICOS **115**

3.5.1. Implantes con células no adherentes (NO ADH) **115**

3.5.2. Implantes con células de los cultivos MCO y ADH **119**

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.5.1.1. Implantes con células cultivadas en el gel de colágeno (MCO) **120**

3.5.1.2. Implantes con células adherentes (ADH) **122**

3.5.1.3. Implantes con células de los cultivos MCO y ADH **124**

3.6. ESTUDIOS DE IMPLANTES ECTÓPICOS PROLONGADOS POR BIOLUMINISCENCIA NO INVASIVA **127**

DISCUSIÓN **131**

4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA SELECCIONADAS TRAS CULTIVOS 3D Y 2D **132**

4.2. EL CULTIVO 3D EN GEL DE COLÁGENO COMO FORMA DE SELECCIÓN DE PROGENITORES PLURIPOTENTES **139**

4.3. LOS IMPLANTES ECTÓPICOS PARA EL ESTUDIO DE LA CAPACITACIÓN CONDRO-OSTEOGÉNICA *IN VIVO* **143**

4.3.1. Implantes con células NO ADH **143**

4.3.2. Implantes de células de los cultivos MCO y ADH **145**

4.4. BIOSEGURIDAD **146**

CONCLUSIONES **149**

BIBLIOGRAFÍA **151**

PUBLICACIONES **187**

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.1. CÉLULAS TRONCALES O CÉLULAS MADRE

La célula madre o más adecuadamente denominada troncal, se define como aquella célula que es capaz de dividirse de manera ilimitada, siendo sus hijas capaces de diferenciarse hacia distintos linajes, tanto morfológica como funcionalmente. Las células troncales se han clasificado en totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales. Las totipotenciales corresponden a las células embrionarias que conforman el embrión hasta su fase de mórula (8 a 16 células), después de la fecundación. En esta fase cada célula es capaz de generar un embrión completo (tejido embrionario y extraembrionario). Las pluripotenciales son las células embrionarias que se encuentran en la masa celular interna del blastocisto (60 a 100 células), hasta el día 14 después de la fecundación. También son pluripotenciales las denominadas células troncales germinales (GSC del inglés, *germinal stem cell*), que se obtienen de las crestas germinales de fetos abortados con cinco a nueve semanas de gestación en humanos. Todas estas células tienen la habilidad de diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias. Las multipotenciales son aquellas células capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencial a tejidos derivados de la capa embrionaria a la que pertenece, es decir, tejidos derivados mesodérmicos, ectodérmicos o endodérmicos. Las unipotenciales son células del organismo adulto, derivadas de las células troncales multipotenciales, que se conocen como células progenitoras o precursoras adultas y que son capaces de producir un único tipo celular (Weissman *et al*., 2001).

Desde el punto de vista de su origen dividimos a las células troncales en embrionarias (derivan del embrión) y adultas o somáticas (derivan de alguno de los tejidos adultos).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.1.1. Células troncales embrionarias

Las células troncales embrionarias se han obtenido bien a partir de la masa celular interna del blastocisto, en el estadio de embrión preimplantatorio (Thomson *et al.,* 1998), o bien de las cresta gonadal (Shamblott *et al*., 1998). Aunque las primeras líneas celulares embrionarias de ratón fueron obtenidas en 1981 por Evans y Kaufman, la obtención de las primeras células embrionarias humanas no fue posible hasta 1998 (Shamblott *et al*., 1998; Thomson *et al.,* 1998).

Las células madre embrionarias son pluripotenciales, es decir, son capaces de proliferar manteniéndose en un estado indiferenciado y de diferenciarse, bajo determinadas condiciones, a cualquier tejido del organismo, incluyendo tejidos somáticos (corazón, hígado, hueso, pulmón, cerebro,...) y células germinales (oocitos y espermatozoides) como se ha podido demostrar en los últimos años (Shamblott *et al.,* 2001; Hubner *et al.,* 2003; Toyooka *et al.,* 2003; Geijsen *et al*., 2004).

Sin embargo, existen limitaciones importantes para el uso terapéutico de estas células. Por una parte, el cultivo prolongado de estas células puede dar lugar a cambios genéticos y epigenéticos que podrían potenciar su capacidad de producir tumores (Draper *et al.,* 2004). Además, el trasplante de células embrionarias tendría que producirse necesariamente entre dos sujetos inmunológicamente diferentes, lo cual exigiría la utilización de medicación inmunosupresora y los consiguientes efectos adversos. Para evitar este problema, se ha propuesto la utilización de técnicas de transferencia nuclear somática, que permitirían generar embriones autólogos de los que aislar la masa celular interna, y así obtener células troncales embrionarias autólogas. Todo ello sin olvidar también, las restricciones legales y éticas con las que cuenta la utilización de estas células.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.1.2. Células troncales adultas

Las células troncales adultas se han identificado en la mayoría de los tejidos del individuo totalmente desarrollado tales como médula ósea, sistema nervioso central, sistema gastrointestinal, músculo esquelético, músculo cardiaco, epidermis, intestino, testículo, hígado, páncreas y pulmón. Poseen las características de auto-renovación y diferenciación mencionadas anteriormente, pero a diferencia de las células troncales embrionarias, se considera que su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación (plasticidad) es significativamente menor (Raff *et al.,* 2003). Tradicionalmente, se pensaba que las células troncales adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a un tipo celular procedente de su mismo tejido de origen, o al menos de su misma capa embrionaria, como las células procedentes de lipoaspirado o de músculo esquelético que muestran capacidad osteogénica (Alonso *et al*., 2008; Claros *et al*., 2008), o las células de la médula ósea que pueden diferenciarse a músculo esquelético (Ferrari *et al*., 1998). Sin embargo, esta idea ha sido reevaluada por varios grupos de investigadores cuyos estudios sugieren que las células troncales adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen (Lagasse *et al*., 2000; Orlic *et al*., 2001; Grant *et al*., 2002), incluso algunos de estos grupos han sido capaces de probar la pluripotencialidad de células troncales adultas procedentes de la médula ósea o del sistema nervioso central (Jiang *et al*., 2002; Herzog, *et al*., 2003). Este fenómeno, denominado transdiferenciación, no está exento de controversia, ya que mientras algunos estudios lo apoyan, otros trabajos lo cuestionan, justificando algunos de los hallazgos de plasticidad como fenómenos de fusión celular (Terada *et al.,* 2002; Ying *et al.,* 2002; Wang *et al.,* 2003).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.1.2.1. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales, también denominadas células madre estromales o MSCs (del inglés *mesenchymal stem cells*), se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos, tales como la médula ósea (Friedenstein *et al*., 1976), la sangre periférica (Zvaifler *et al*., 2000), el cordón umbilical (Troyer y Weiss, 2008), el hueso trabecular (Nöth *et al*., 2002), el tejido adiposo (Pittenger *et al*., 1999), el tejido sinovial (De Bari *et al*., 2001), el músculo esquelético (Jankowski *et al*., 2002) y en algunos tejidos del feto (Hu *et al*., 2003).

Las MSCs son células de morfología fibroblástica con capacidad de diferenciarse hacia diversos linajes celulares, como osteocitos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, células del estroma y otras células mesenquimales (**Figura 1.1.1.**). No obstante, existen evidencias que sugieren que las MSCs también pueden expresar características fenotípicas de células endoteliales, neuronales, mioblastos esqueléticos y miocitos cardíacos (Kopen *et al*., 1999; Toma *et al*., 2002; Bossolasco *et al*., 2004; Oswald *et al*., 2004).

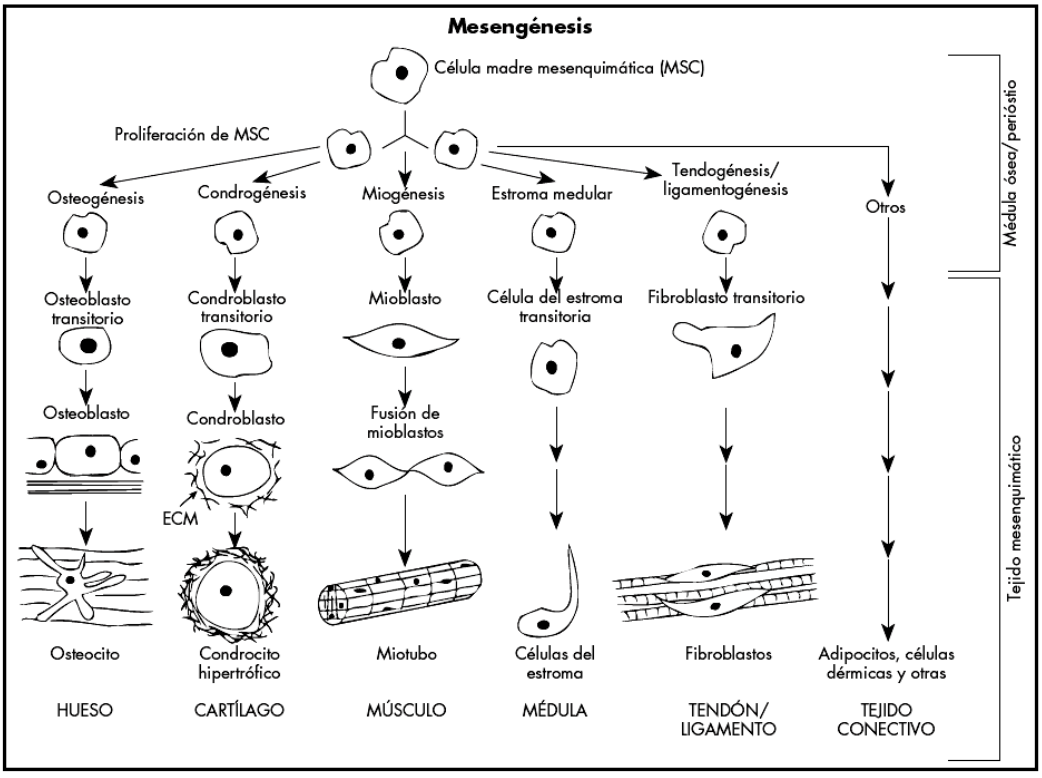


Figura 1.1.1. Principales vías de diferenciación de MSCs (Adaptado de Caplan, 1991).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Aunque las MSCs se encuentran presentes durante toda la vida del individuo, su número total está inversamente correlacionado con la edad. En humanos se ha demostrado que, mientras el número de células madre hematopoyéticas (HSCs) varía muy poco con la edad, el de MSCs lo hace enormemente; si en el recién nacido se encuentra una MSC por cada 10.000 células de médula ósea, a los 80 años de edad sólo se puede encontrar una por cada dos millones (Caplan *et al*., 1991). En cambio, su capacidad de diferenciarse en cartílago y hueso es independiente de la edad del donante (Caplan, 2007).

1.1.2.1.1. Inmunofenotipo de las MSCs

En los últimos años se han descrito distintos marcadores de superficie que han permitido identificar y aislar las MSCs, tales como CD44, CD71, CD73 (SH3/4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), HLA-ABC ó clase I (antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I), STRO-1, y las moléculas de adhesión CD29, CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM), ICAM-1, entre otras. También se caracterizan por la ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD11, CD14, CD34, CD45, HLA-DR ó clase II, y las moléculas coestimuladoras CD18 (LFA-1), CD31 (PECAM-1), CD40, CD56 (molécula de adhesión neuronal-1), CD80 y CD86. Sin embargo, no existe una caracterización fenotípica bien conservada de una población pura de estas células. Por ejemplo, las MSCs aisladas directamente de la médula ósea son positivas a CD34, aunque su expresión se pierde con el tiempo de cultivo *in vitro*.

En el 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT (*Internacional Society for Cellular Therapy*) propuso tres criterios para definir las MSCs; primero, éstas células deben ser adherentes en cultivo; segundo, tienen que expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de los marcadores CD34 y CD45; y tercero, las MSCs deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Deans *et al*., 2000; Bianco *et al*., 2001; Beyer *et al*., 2006; Dominici *et al*., 2006; Rasmusson *et al*., 2006).

De este modo, la molécula CD73 se presenta como un marcador de linaje para las MSCs. Se trata de una glicoproteína cuya función biológica consiste en hidrolizar nucleótidos extracelulares para permitir el ingreso de nucleósidos y así generar ATP y GTP como fuente de energía celular en células diferenciadas. No obstante, el papel que juega en las MSCs se cree que está más relacionado con mecanismos de adhesión celular, ya que se ha encontrado co-expresado con integrinas del tipo β2, lo que ha propuesto a CD73 como un mediador de la adhesión celular en MSCs (Airas *et al*., 1997; Sträter *et al*., 2006).

Las MSCs, aisladas de médula ósea, también expresan la molécula CD90, una proteína que forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas y cuyo principal ligando es CD45 (Craig *et al*., 1993; Barboni *et al*., 1995), expresándose en el 10-40% de las células CD34, y en mayor proporción en el tejido conectivo y en células del estroma medular. Aunque no se conoce su función en las MSCs, hay estudios que demuestran que las células CD90+, cuando son sometidas a estrés mecánico, se diferencian hacia células similares a osteoblastos, disminuyendo notablemente la expresión de CD90, lo que podría mostrar que este antígeno es un marcador de precursores mesenquimales tempranos que pueden diferenciarse en osteoblastos (Wiesmann *et al*., 2006).

CD105, también conocida como endoglina, es una glicoproteína que forma parte del complejo del receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), lo que sugiere que juega un papel importante en la diferenciación condrogénica de las MSCs y sus interacciones con las células hematopoyéticas (Barry *et al*., 1999). Está presente en la superficie celular de monocitos activados, macrófagos activados, precursores eritroides, fibroblastos, células foliculares dendríticas, melanocitos, células cardiacas, células vasculares de músculo liso y células endoteliales; es decir, se expresa en la mayoría de las células derivadas de la médula ósea, exceptuando osteocitos y osteoblastos (Haynesworth *et al*.,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1992; Tuan, 2004). También se conoce que CD105 interviene en la regulación de distintos componentes de la MEC como fibronectina y colágeno, razón por la cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular (Cheifetz *et al.,* 1992; Fonsatti *et al.,* 2004). Además, se sugiere que su expresión en MSCs humanas es determinante en la generación de cardiomiocitos (Roura *et al.,* 2006).

Además de los antígenos sugeridos por la ISCT, otros autores proponen moléculas como STRO-1, CD44 y CD166 para la tipificación de las células mesenquimales. En 1991 se identificó a STRO-1 como un antígeno específico para MSCs aisladas de médula ósea (Simmons *et al.,* 1991). STRO-1 es un marcador que se expresa en el desarrollo temprano de dichas células, declinando su expresión cuando factores asociados a la diferenciación y expansión osteogénica, como Runx2, interactúan con osteopontina y osteocalcina (Gonçalves *et al.,* 2006). La población positiva para STRO-1 ha demostrado ser capaz de diferenciarse hacia los distintos tejidos del linaje mesengénico, incluyendo células estromáticas, adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Dennis *et al.,* 2002). CD44 es una molécula de adhesión que actúa mediante la interacción con el ácido hialurónico, osteopontina, colágeno, anquirina, fibronectina y metaloproteinasas (Lesley *et al.,* 2000), y contribuye en procesos de adhesión, migración y proliferación de MSCs (Zhu *et al.,* 2006). Además de STRO-1 y CD44, se ha señalado que la molécula CD166 interviene en el proceso de osteogénesis durante la morfogénesis del hueso (Bruder *et al.,* 1998), así como en la hematopoyesis, participando en el mantenimiento del estado indiferenciado de HSCs y MSCs (Bianco *et al.,* 2001; Ohneda *et al.,* 2001).

1.1.2.1.2. Nicho de las MSCs

El concepto de "nicho" de células troncales fue introducido por primera vez por Schofield en 1978 (Schofield, 1978), la idea ha ido ganando adeptos, particularmente en los últimos años. El nicho comprende todos los elementos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

que rodean a la célula troncal cuando se encuentra en su estado nativo, incluyendo las células no troncales que puedan estar en contacto directo con ellas, así como la matriz extracelular y las moléculas solubles que se encuentran localmente. Todos ellos actúan de forma conjunta para mantener las células troncales en su estado de indiferenciación. Esto sugiere que de alguna forma se puede influir o actuar en el nicho para dar una señal a las células troncales para que éstas inicien el proceso de regeneración o repoblación del tejido (Kolf *et al*., 2007). En el nicho hay que distinguir tres componentes: el componente celular; el componente soluble y el componente de matriz extracelular.

Componentes celulares del nicho

Los estudios recientes sugieren la naturaleza perivascular del nicho de las MSCs (Shi y Gronthos, 2003; Crisan *et al.,* 2008; da Silva *et al.,* 2008), basándose en la expresión de α-actina de músculo liso (α-SMA) en las MSCs aisladas de tejidos y en la localización de células CD31- CD45- Sca-1+ Thy-1+ (**Figura 1.1.2.**). Las MSCs de médula ósea humana se encontraron, usando marcadores STRO-1, próximas o bordeando los vasos sanguíneos. Estas células también expresan α-SMA y 3G5, un marcador de superficie celular asociado a pericitos. Ambos tipos celulares expresan una mezcla de marcadores de células endoteliales y MSCs, incluyendo CD29, CD44, CD106, CD146, 3G5, STRO-1, α-SMA, Sab-1 y Sab-2, y exhiben una morfología fibroblástica en cultivo *in vitro* (Shi y Gronthos, 2003, Tintut *et al.,* 2003; Crisan *et al.,* 2008; Jones y McGonagle, 2008; Traktuev *et al.,* 2008). Además, MSCs y pericitos parecen desempeñar un papel similar, actúan como soporte, migran hacia los vasos sanguíneos en respuesta a factores secretados por células endoteliales, e incrementan la formación de los vasos (Armulik *et al.,* 2005; Gruber *et al.,* 2005; von Tell *et al.,* 2006; Traktuev *et al*., 2008). Estas similitudes fortalecen la hipótesis de que las MSCs son un tipo de pericito. Algunos autores han mostrado que los pericitos también pueden diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Doherty *et al*., 1999), y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

que interactúan con Wnts, que son importantes en la biología de las MSCs (Nelson *et al*., 2004).

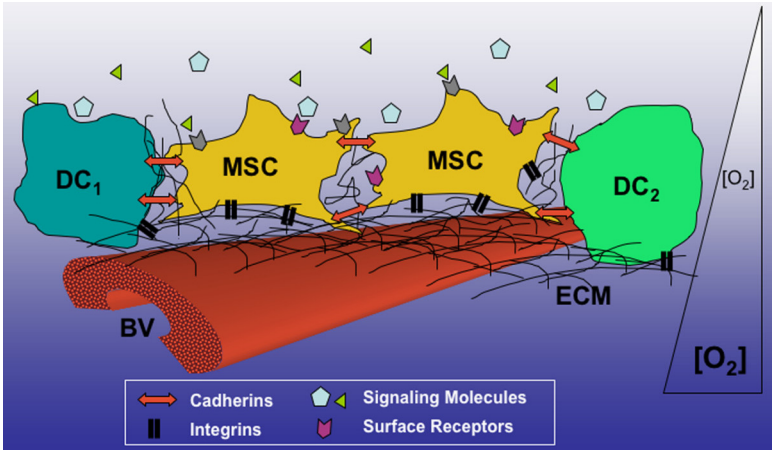


Figura 1.1.2. Nicho perivascular de las MSCs. Las MSCs se muestran interaccionando con varios tipos de células diferenciadas (DC_1, DC_2) mediante moléculas de adhesión celular como cadherinas, la matriz extracelular (ECM) mediante receptores de integrinas; y moléculas de señalización, las cuales deben incluir factores autocrinos, paracrinos y endocrinos. Otra variable es la tensión de oxígeno, ya que este tipo de nicho está asociado con hipoxia. BV: vaso sanguíneo (Kolf et al., 2007).

El concepto de nicho se ha extendido a otros tejidos. Las preparaciones de células troncales derivadas del tejido adiposo tanto del humano como de animales muestran una capacidad de diferenciación similar a la MSCs (Caplan, 2007; Lee *et al*., 2004; Katz *et al*., 2005). Sin embargo, la impresión es que estas células semejantes a las MSCs están asociadas a los vasos sanguíneos (Tavian *et al*., 2005). Los estudios de Caplan (2007) sugieren que hay gran correlación entre el título de las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) y la densidad vascular en todas las muestras de tejido adiposo estudiado. Esta correlación entre el patrón vascular y los títulos de MSCs ha sido puesta en evidencia también por otros autores (Kubis *et al*., 2007).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Componentes solubles del nicho

Que el medio de la médula ósea es hipóxico es de una relevancia particular. La comparación de que las células MSCs cultivadas en condiciones de hipoxia *versus* normoxia (2% y 20% de oxígeno, respectivamente) muestran que la capacidad proliferativa es mayor en hipoxia (Grayson *et al*., 2006). Otros datos sugieren que la hipoxia no sólo incrementa la proliferación sino también la plasticidad de las MSCs, ya que aumenta la expresión de Oct-4 y Rex-1, genes expresados por las células troncales embrionarias. El mecanismo de acción de la hipoxia en las MSCs es desconocido, aunque la sobreproducción de Oct-4 por el factor de transcripción HIF-2α (factor inducido por hipoxia-2α) puede estar relacionada (Covello *et al*., 2006).

Sin embargo, se desconoce el papel que tienen las proteínas solubles en el nicho de las MSCs. El descubrimiento de una o más proteínas solubles que inhiban la diferenciación mientras permitan la proliferación sería un mecanismo excelente para expandir MSCs *ex vivo.*

Componentes de la matriz extracelular del nicho

En la actualidad, no se ha identificado componente alguno de la matriz extracelular del nicho que ayude a conocer el mantenimiento de las MSCs en su estado nativo y definir cómo debería de ser la matriz típica de un nicho. Sin embargo, hay evidencias de que la matriz sola puede regular la diferenciación de las MSCs (Datta *et al.,* 2005).

Los componentes de la matriz extracelular son el resultado de la expresión específica de las células del nicho. En la formación endocondral del hueso se produce gran cantidad de matriz extracelular con diferentes tipos de colágenos, proteoglucanos y glucoproteínas que estructuran la formación de hidroxiapatita, dan elasticidad y mantienen la comunicación celular.

El diseño de matrices artificiales que puedan imitar el microambiente tisular *in vivo* y regular la diferenciación de las células troncales es una propuesta con

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

prometedoras aplicaciones terapéuticas. Pero para ello, debemos conocer más sobre las interacciones MSCs y los demás elementos del nicho.

Anidamiento de las MSCs en el lugar de lesión (homing)

Otro fenómeno relacionado con el nicho de las células troncales es el anidamiento de las células troncales en el lugar de la lesión, *homing*, y la subsecuente reparación de la lesión. Aunque la reparación de algunos tejidos se acompaña de la división de células diferenciadas del propio tejido. De esta forma, se requiere el envío de señales a las células troncales o progenitoras para habitar o anidar el lugar de la lesión y diferenciarse en el tipo de células necesarias. Aún en tejidos sanos, las MSCs son capaces de anidar en otros tejidos además de la médula ósea, tales como el pulmón o los músculos (Francois *et al*., 2006). La capacidad de una MSC para anidar parece que está relacionada en parte con su expresión de STRO-1 (Bensidhoum *et al*., 2004). Respecto a la migración de la MSCs, en estudios *in vitro* se ha observado que está regulada por el factor-1/CXCR4 derivado del estroma y por el complejo factor de crecimiento hepatocítico/c-Met, así como por las metaloproteinasas de la matriz (Son *et al*., 2006).

Además, parece que las células maduras de un tejido lesionado son capaces de segregar no sólo señales de anidamiento sino también señales de diferenciación (Santa María *et al*., 2004). Asimismo, estudios preliminares han demostrado que el co-cultivo de MSCs con osteoblastos incrementa la osteogénesis, así como el co-cultivo con células del hígado es capaz de inducir hepatogénesis (Lange *et al*., 2005). Aunque, las células maduras no siempre inducen la diferenciación hacia su propio linaje, por ejemplo, el contacto directo con condrocitos induce únicamente osteogénesis (Gerstenfeld *et al*., 2003). Definitivamente, el ambiente de las MSCs es un factor crítico que define su identidad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.1.2.2. Células side population

Esta población celular fue identificada por Goodell y cols. en 1996. Los estudios iniciales en ratones empleando Hoechst 33342 y citometría de flujo, permitieron comprobar la existencia de una subpoblación de células primitivas con baja intensidad de fluorescencia, a la que denominaron *side population* (SP). Al principio se pensaba que esta débil emisión era un reflejo de hipoactividad metabólica y quiescencia. Sin embargo, hoy en día se conoce que es debido a la presencia de al menos dos transportadores de membrana, miembros de la familia ABC (*ATP-binding cassette*), el ABCG2 y la glicoproteína P, que confieren a estas células la capacidad de eliminar el colorante de forma más rápida (Eaker *et al*., 2004).

Las SP tienen una frecuencia media del 0.05% en la médula ósea y del 0.02% en la sangre periférica movilizada (Guo *et al*., 2003), y se caracterizan por expresar el antígeno Sca-1 y ser negativas para CD45 y c-kit (Howell *et al*., 2003). Además, formando parte de ellas se han detectado subpoblaciones CD34+ y CD34-, aunque en humanos la mayoría son CD34- (Pearce *et al*., 2004). Por otro lado, algunos investigadores han señalado que la expresión del transportador ABCG2 es característica de células madre muy primitivas (Scharenberg *et al*., 2002).

Las SP se han aislado tanto a partir de médula ósea como de músculo, y se sabe que son capaces de diferenciarse en HSCs en humanos, roedores y otras especies (Jackson *et al*., 2001; Asakura *et al*., 2002). Además, algunos estudios describen que las SP podrían dar lugar a otros tipos de células especializadas e integrarse en distintos tejidos *in vivo*. Así, el grupo de Jackson y cols. demostró que las SP podían diferenciarse en células con características de músculo cardíaco y endotelio en un modelo murino de infarto de miocardio (Jackson *et al*., 2001).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.1.2.3. Células progenitoras adultas multipotenciales (MAPCs)

En los últimos años, se han creado nuevas expectativas en la comunidad científica ante la posibilidad de que algunas células troncales adultas puedan tener capacidad de diferenciación muy similar a las células madre embrionarias. Esto está estrechamente relacionado con el aislamiento, en cultivos de médula ósea de ratas, ratones y humanos, de células progenitoras adultas multipotenciales con una versatilidad inusual, pues manifiestan la capacidad de diferenciarse rápidamente en múltiples tipos celulares según las condiciones de cultivo (Jiang *et al.,* 2002; Verfaillie, 2005; Pelacho *et al.,* 2007; Ji *et al.,* 2008). Estas células se han denominado con las siglas MAPCs derivadas de su nombre en inglés *multipotent adult progenitor cells*. Se ha demostrado, mediante experimentos de clonación, que es una única célula la que puede diferenciarse en la mayoría de los tipos celulares derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias (Verfaillie *et al.,* 2002). Del mismo modo sucede *in vitro* cuando se someten a determinadas condiciones de cultivo (Jiang *et al.,* 2003; Körbling *et al.,* 2003). Aunque no hay evidencias concretas de que las MAPCs existan como tales en los tejidos, éstas se pueden obtener mediante cultivos a largo plazo de células estromales de la médula ósea mantenidas en condiciones específicas (Daley *et al.,* 2003).

A diferencia de las células troncales embrionarias, las MAPCs se pueden obtener de la médula ósea autóloga, con lo que se evita la reacción de rechazo que se puede producir debido a la expresión en las células embrionarias de antígenos de histocompatibilidad diferentes a los del receptor de esas células. Por otra parte, no se ha observado en éstas el potencial teratogénico que tienen las embrionarias. Se ha señalado que las MAPCs son capaces de proliferar *in vitro* con más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento, ya que mantienen niveles altos de telomerasa, y al igual que en las células troncales embrionarias, en las MAPCs se detecta la activación de los factores de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

transcripción Oct-4, Nanog y Rex-1, que son necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado (Chu *et al.,* 2008). En cuanto a su inmunofenotipo, las MAPCs son negativas para CD34, CD44, CD45, CD106, c-kit, HLA-I y HLA-II, expresan niveles bajos de Flk-1, Sca-1 y Thy-1, y altos de CD13, CD49b, SSEA-1 (rata/ratón) y SSEA-4 (humano) (Körbling *et al.,* 2003). Los antígenos SSEA-1, -3 y -4 (*stage-specific embryonic antigens*), se detectan mediante anticuerpos monoclonales que se emplearon originalmente para identificar las primeras etapas del desarrollo del ratón. Las células pluripotenciales de los primates expresan SSEA-3 y SSEA-4, pero el SSEA-1 sólo se manifiesta después de su diferenciación. En las células embrionarias del ratón ese patrón de expresión antigénica se invierte (Verfaillie *et al.,* 2002). Los mayores limitantes que se plantean para el empleo de las MAPCs son las condiciones tan especializadas que se necesitan para su cultivo. Por otra parte, las condiciones que se requieren para que se diferencien en tipos celulares específicos no están totalmente esclarecidas, por lo que esto es un asunto de gran interés y objeto en la actualidad de diversas investigaciones (Daley *et al.,* 2003; Ji *et al.,* 2008). Aunque, indudablemente, la identificación y estudio de las MAPCs abren nuevas perspectivas no sólo en su posible aplicación terapéutica, sino también para el mejor conocimiento de la biología de las células troncales.

1.1.2.4. Células CD133+

Otro tipo de células troncales obtenidas de médula ósea e incluso de sangre periférica es la formada por las células CD133+ (Amrani y Port, 2003; Stamm *et al.,* 2003; Agbulut *et al.,* 2004), que pueden diferenciarse en células endoteliales maduras, contribuyendo a la neovascularización. Están caracterizadas por los marcadores de superficie CD133, CD34, CD49a y el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Se conoce que estas células pierden gradualmente sus propiedades de células progenitoras y migran a la circulación sistémica, expresando marcadores de células endoteliales maduras, como son

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CD146, VE-cadherina, óxido nítrico sintasa endotelial y el factor de Von Willebrand (Hristov y Weber, 2004), siendo útiles como estrategia para promover angiogénesis, por su capacidad natural de ser incorporadas en los focos de neovascularización y segregar potentes ligandos angiogénicos y citoquinas (Kamihata *et al.*, 2001).

1.2. FACTORES DE CRECIMIENTO

Cuando se produce una lesión esquelética, las células y las moléculas señalizadoras aparecen en el sitio de la lesión para repararla de forma parecida a como ocurre en la embriogénesis. En el momento inicial de la lesión se desencadena una respuesta inflamatoria con activación del complemento y rotura de vasos; la degradación proteolítica de la matriz extracelular (MEC) aporta factores quimiotácticos para los monocitos y los macrófagos, y una vez que éstos se activan liberan el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) que estimula a las células endoteliales. La sangre extravasada forma un coágulo, y las plaquetas que lo integran tienen una función dual: la hemostasis y la liberación de factores moduladores para el proceso de reparación, como el plaquetario (PDGF), TGF-β, y FGF. La zona dañada presenta una hipoxia debido a la rotura de los vasos sanguíneos y como consecuencia se produce una disminución del pH, condiciones necesarias para que actúen los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares que eliminan los detritus celulares, a la vez que secretan factores que promueven la quimiotaxis y la mitogénesis. Después de tres a cinco días desde la lesión, se constituye un tejido de granulación consistente en vasos, colágeno y células. El colágeno será el sustrato que una los factores de crecimiento (FCs) a los que serán sensibles las células y constituirá el lugar al que ellas se anclarán cuando lleguen a través de los vasos, del periostio, del endostio y de la médula ósea, diferenciándose posteriormente en osteoblastos y condroblastos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Durante las diferentes fases de la reparación ósea, como durante el desarrollo esquelético, los FCs desempeñan un papel fundamental, siendo la "señal" que estimula a las células a realizar una función determinada (Bolander, 1992; Erlebacher *et al.*, 1995; Mundy, 1996).

Los FCs son sustancias de naturaleza polipeptídica, solubles, cuya función forma parte de la inmensa red de comunicaciones intercelulares, que actúan en puntos críticos tales como la división celular, síntesis de matriz y diferenciación tisular. Dependiendo de la proximidad entre los lugares de síntesis y acción, los FCs se clasifican como autocrinos, endocrinos y paracrinos, usándose también los términos yuxtacrino e intracrino para las interacciones a corta distancia (**Figura 1.2.1.**). Por consiguiente, un FC puede tener efecto en múltiples tipos de células e inducir diferentes funciones celulares en diversos tejidos (Barnes *et al.*, 1999; Lieberman *et al.*, 2002). Los FCs óseos realizan sus efectos a nivel local de forma autocrina o paracrina.

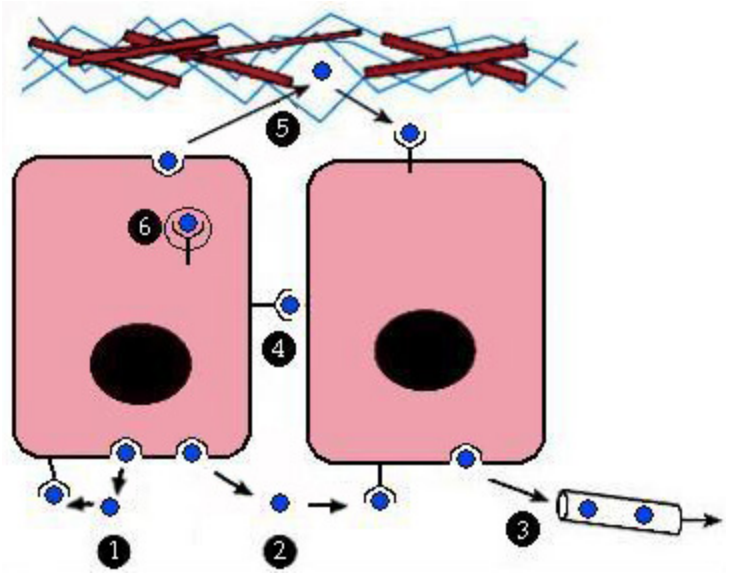


Figura 1.2.1. Vías de acción de los FCs. Los FCs (azul) son producidos por las células, pudiendo actuar en el interior de las mismas, en sus proximidades, o en lugares más alejados, modulando su acción al interaccionar con receptores específicos. Estas vías pueden ser: (1) autocrina, (2) paracrina, (3) endocrina, (4) yuxtacrina, (5) mediada por la matriz extracelular, o (6) intracrina. (Adaptado de Nimni, 1997)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Cuando un FC se une al receptor de una célula diana induce un sistema de transducción de señales intracelulares que finalmente llega hasta el núcleo y produce una respuesta biológica. La unión del FC a su receptor se conoce como interacción ligando-receptor. Estas interacciones son muy específicas y pueden oscilar de simples, con un FC específico unido a un único receptor celular, a complejas, con uno o varios ligandos unidos a uno o varios receptores. Asimismo, este sistema biológico presenta una redundancia tal que varias isoformas del mismo FC pueden unirse a un único receptor, o a distintos receptores. También diferentes receptores celulares pueden ser activados por un mismo FC con la puesta en marcha de diferentes acciones, que es lo que se conoce como acción pleiotrópica (Yoon y Boden, 2002). Una vez establecida la interacción ligando-receptor, el receptor se activa al producirse un cambio en su configuración. Los receptores poseen dominios extracelulares que se unen al ligando y dominios intracelulares que se unen al sistema de transducción de señales, en el que interviene el denominado factor de transcripción, proteína intracelular que se activa como parte de las vías de señalización iniciadas por el dominio intracelular del receptor. El factor de transcripción activado viaja al núcleo, se une al ADN nuclear e induce la expresión de un gen o un grupo de genes nuevos. La expresión de estos genes nuevos por parte de la célula es la que, en última instancia, modifica las características de dicha célula. Esta secuencia de acontecimientos es similar a la que se produce con otros agentes, como las hormonas esteroideas, que se unen a los receptores intracelulares e inducen diversos tipos de vías de señalización intracelular.

Actualmente existe un gran interés por estudiar y determinar cuáles son los FCs implicados en los procesos de reparación tisular, por su prometedora perspectiva terapéutica. El avance de las nuevas técnicas en biología molecular está permitiendo descubrir nuevos FCs, aunque aún no conocemos con exactitud qué relevancia presentan en cuanto a sus acciones e interacciones.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En la actualidad los FCs más estudiados en la proliferación celular y reparación de los tejidos incluyen: TGF-βs, proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), FGF ácido y básico, PDGF, factor de crecimiento insulínico I y II (IGF-I y II) y factor estimulador de granulocitos. El TGF-β1 es uno de los factores más abundantes. Se libera en forma activa durante la reabsorción ósea (Pfeilschifter y Mundy, 1987), estimula la proliferación de osteoblastos (Noda y Camilliere, 1989), causa quimiotaxis entre osteoblastos e incrementa la formación de hueso (Mackie y Trechsel, 1990). Las BMPs pertenecen a esta familia pero sus efectos difieren de los del TGF-β propiamente dichos. Las BMPs realzan la diferenciación de células óseas *in vitro* y parecen estar implicadas en dirigir las células a lo largo del linaje osteoblástico (Harris *et al.,* 1994). Son únicas en producir la formación de hueso ectópico (Urist, 1965; Redds, 1992; Wozney, 1992), lo que no producen los TGF-βs. Otros FCs como FGF, PDGF e IGF I y II han mostrado ciertos efectos en proliferación y diferenciación de células óseas, siendo también usados en el campo de la investigación por sus perspectivas terapéuticas (Ishibe *et al.,* 1995; Mundy, 1996).

En los últimos años, los avances en el campo de la biología molecular y el desarrollo de técnicas de ingeniería genética, han permitido obtener grandes cantidades de estos FCs gracias a las técnicas de recombinación génica. A partir de esta técnica se obtienen FCs recombinantes que mantienen su propiedades, incorporando importantes ventajas, como mayor cantidad y pureza, así como evitar reacciones de tipo inmunitario.

1.2.1. Factor de crecimiento transformante β (TGF-β)

El TGF-β se encuentra en muchos tejidos pero su localización más importante y abundante son las plaquetas, células mesenquimales, osteoblastos, condrocitos y hematoma fracturario, donde se localiza en las primeras 24 horas tras el traumatismo. El efecto de estimular la síntesis proteica en condrocitos y osteoblastos *in vitro*, su elevada concentración en la matriz ósea extracelular y la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

liberación por parte de las plaquetas en el hematoma de la fractura, hacen pensar que el TGF-β es el mayor FC implicado en la regulación de la formación ósea y cartilaginosa tras una lesión, así como durante el crecimiento normal y la remodelación de esos tejidos.

La superfamilia del TGF-β está formada por un gran grupo de polipéptidos extracelulares con ciertas características estructurales comunes, que participan en procesos de crecimiento, desarrollo, diferenciación y homeostasis a través de su interacción con receptores de la membrana celular (Massagué, 1990; Sporn y Roberts, 1990). En ella se engloban, además de los TGF-βs, proteínas como las BMPs, activitas, inhibinas, sustancia inhibidora de Müller y nodal (Reddi, 1994).

El TGF-β1, prototipo de la superfamilia, fue inicialmente identificado en el medio de cultivo de varias líneas celulares, tanto transformadas como no transformadas (Moses *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1981). Más tarde se logró su purificación en plaquetas (Chilods *et al.*, 1982; Assoian *et al.*, 1983), y la subsiguiente clonación de su cDNA (Derynck *et al*., 1985). A partir de ese momento se fueron descubriendo el resto de miembros de la superfamilia que hasta el momento se conocen, los cuales se clasificaron en diversas subfamilias por similitud entre ellos. Los diferentes miembros se han aislado en una gran diversidad de organismos, desde mamíferos hasta insectos, lo cual nos da una idea de la importancia que tienen en los procesos que están bajo su control, y de ahí que su señalización no se haya perdido a lo largo de la evolución.

1.2.1.1. Isoformas y receptores del TGF- β

La subfamilia del TGF-β engloba cinco isoformas, que son sintetizadas como proteínas precursoras inactivas (Massagué *et al.*, 1987). Las tres primeras, TGF-β1, TGF-β2, y TGF-β3, son altamente homólogas entre sí, tienen distintos patrones de expresión y sus funciones son mediadas por los mismos receptores. Los TGF-β1 y TGF-β2, entre los que hay una homología del 70%, son sintetizados por muchos tipos celulares, mientras que el TGF-β3, homólogo con

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

el TGF-β2 en un 79%, se expresa principalmente en células mesenquimales (Barnard *et al.*, 1990). Además, estos factores se encuentran en todos los mamíferos, mientras que las isoformas β4 y β5 se han identificado en aves y en anfibios, respectivamente (Massagué *et al.*, 1990; Sporn *et al.*, 1992).

Asimismo, se han identificado al menos tres tipos de receptores diferentes para el TGF-β: receptores funcionales, que son los del tipo I y II (TGFβRI y TGFβRII); y receptores no funciones, llamados del tipo III (TGFβRIII) (Massagué *et al.*, 1987; Massagué, 1992).

Diversos estudios han demostrado que existe una correlación entre la ausencia de los receptores TGFβRI y TGFβRII, y la pérdida de las respuestas celulares inducidas por el TGF-β1. Al mismo tiempo, existe una afinidad diferencial entre TGF-β1, 2 y 3, y la unión por los diferentes receptores. Por ejemplo, TGFβRI y TGFβRII se unen al TGF-β1 y al TGF-β3 con mayor afinidad que al TGF-β2. Sin embargo, no existe relación directa entre la afinidad de unión y el efecto biológico, ya que el TGF-β2 es equivalente al TGF-β1 en la mayoría de las actividades biológicas. Respecto a la cooperación entre TGFβRI y TGFβRII, existe una dependencia funcional entre ambos. TGFβRI requiere de TGFβRII para unirse al ligando, mientras que TGFβRII requiere de TGFβRI para la señalización funcional. En presencia del TGF-β1, estos receptores de tipo I y II tienen la habilidad para interactuar uno con otro y formar un complejo tetramérico a través del cual se transducen las señales. Este complejo molecular es la unidad receptora de señales que media la repuesta biológica del TGF-β1 (Massagué, 1996).

Los receptores del tipo III, que son las proteínas transmembrana betaglicanos y endoglina, no son verdaderos receptores ya que no implican respuesta intracelular, y por eso se les conocen como receptores no señalizantes de TGF-β. Los betaglicanos están ampliamente distribuidos en células mesenquimales, epiteliales y neuronas, se unen a través de su región extracelular, y poseen una región citoplásmica corta y una región intracelular

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

que no participa en la transducción de señal. La endoglina es similar a los betaglicanos, particularmente en la región citoplásmica, y está presente en altos niveles en las células endoteliales. Sobre ellos, se ha sugerido que controlan la disponibilidad del TGF-β1 en el microambiente extracelular local y regulan su presentación activa a los receptores funcionales de clase I y II. Conjuntamente, se ha señalado que los receptores TGFβRI, TGFβRII y betaglicanos se unen a los TGF-β1, 2 y 3, mientras que la endoglina se une a los TGF-β1 y 3 (Cheifetz *et al.*, 1990).

Respecto al mecanismo de señalización, los receptores tipo I y II son proteínas quinasas del tipo serina/treonina. La unión del ligando a estos receptores desencadena la cascada de información hacia el núcleo celular a través de las proteínas transductoras de señales de la familia Smad. Cuando esa información llega al núcleo se forman complejos que interaccionan con genes diana y producen cambios en la transcripción, lo cual desencadena proliferación, diferenciación, o cualquier otra de las actividades. Las Smad son selectivas para el tipo de TGF-β, por ejemplo, el TGF-β estimula las Smad 2 y 3, mientras que las BMPs estimulan las 1, 5 y 8 (Heldin *et al.*, 1997; Massagué, 1998 y 1999).

De modo que los efectos de las distintas isoformas del TGF-β están asociados a su disponibilidad, a la combinación de los tipos de receptores y a la vía de señalización intracelular que inducen (Lin y Wang, 1992; Wrana *et al.*, 1992).

1.2.1.2. TGF- β1

El TGF-β1, homodímero no glicosilado de 25 KDa de peso, es el miembro de la familia más ampliamente estudiado (Herndon *et al.*, 1993). Entre los mamíferos, la secuencia de aminoácidos del TGF-β1 está altamente conservada (100%), ya que es idéntica en humano, cerdo, vaca y mono, y difiere sólo en un

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

aminoácido en ratón, lo que nos indica que esta proteína cumple funciones básicas para el mantenimiento de la especie (Barnard *et al.*, 1990).

El TGF-β1 puede ser considerado como el prototipo de citoquina multifuncional, debido a los efectos que tiene sobre los diferentes blancos celulares. Tres son los papeles fundamentales de los TGF-β: modular la proliferación celular, generalmente como supresor; mejorar la deposición de MEC aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación; y actuar como inmunosupresor a través de varios mecanismos.

Uno de los efectos más evidentes de la acción del TGF-β1 corresponde a la inhibición del ciclo celular, conociéndose como el inhibidor más potente de la proliferación de células de origen mieloide, mesenquimal, epitelial, linfoide, endotelial y de varios tipos de células malignas. Sin embargo, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales, de células no epiteliales y ciertos tipos de células mesenquimales como los osteoblastos (Sporn y Roberts, 1992).

Por otra parte, es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de MEC por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales, además de aumentar la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de la MEC (Barnard *et al.*, 1990). Streuli y cols. (1993) demostraron que la expresión del gen del TGF-β1 está vinculada a la presencia o ausencia de proteínas de la MEC, sugiriendo un posible mecanismo de autorregulación *in vivo*. Estos autores señalaron que la disminución de las interacciones celulares con proteínas de la MEC induce la expresión de TGF-β1, lo cual conlleva la síntesis de varias proteínas de la MEC, y esto a un descenso de la expresión de TGF-β1.

En el contexto de la respuesta inmune, dependiendo de la concentración del TGF-β1, induce o inhibe la producción de citoquinas por monocitos; promueve la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos y neutrófilos; *in vivo*, aumenta las funciones efectora y de memoria de los linfocitos T CD4+ antígeno-específicos; estimula la secreción de IgA; inhibe la proliferación de linfocitos, células

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

endoteliales, hepatocitos, queratinocitos y ciertas líneas celulares tumorales; inhibe la secreción de IgG e IgM; suprime la hematopoiésis dependiente de IL-3, la megacariopoyesis y la esteroidogénesis en las células adrenocorticales, e inhibe la diferenciación de adipocitos y miocitos (Rizzino *et al.*, 1988; Palladino *et al.*, 1990). Además, se ha demostrado en estudios clínicos que puede inducir inmunosupresión en el trasplante de órganos e injertos de piel, en el contexto de la activación de subpoblaciones de linfocitos T (Sporn y Roberts, 1989).

En resumen, el TGF-β1 tiene un espectro muy amplio de funciones, las cuales dependen del estado de activación celular, de su concentración, del balance de expresión de otras citoquinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa; por este motivo, la distribución de su expresión *in situ* e *in vivo* está directamente asociada con el estado de diferenciación celular.

1.2.2. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)

Fue en 1945 cuando Lacroix postuló que el hueso contenía una sustancia, que denominó osteogenina, que era capaz de iniciar la formación de hueso. Sin embargo, fue Marshall R. Urist en 1965 quien descubrió la propiedad morfogenética de las BMPs. Demostró que al implantar un extracto de matriz ósea desmineralizada (MOD) en el músculo de la rata, tenía lugar la formación de hueso en dicha zona (Urist, 1965). El análisis bioquímico e histológico permitió observar la aparición de cartílago después de cinco a diez días de realizar el implante, posteriormente este cartílago se mineralizaba y finalmente era reemplazado por hueso. Los eventos celulares observados tras el implante de esta matriz desmineralizada en lugares ectópicos imitaban a los ocurridos en la formación del esqueleto en el embrión y en el proceso normal de reparación de fracturas (Reddi y Huggins, 1972).

Tras estos hechos se asumió que células pluripotenciales eran atraídas hacia el lugar del implante y que éstas serían las responsables de la formación de hueso. En 1979, Urist y cols. lograron extraer del tejido óseo una mezcla proteica

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

heterogénea con capacidad para formar hueso en partes blandas, y que recibió el nombre de proteína morfogenética ósea o proteína osteogénica (OP). Dos años más tarde, Sampath y Reddi (1981) llevaron a cabo una serie de estudios basados en la purificación y clonación de estas proteínas para conseguir aislarlas, en los que comprobaron que el potencial osteoinductor era debido a una sinergia entre colágeno tipo I y las propias proteínas (Sampath y Reddi, 1983; Sampath *et al.*, 1984). Este descubrimiento permitió un avance en el aislamiento y purificación de BMPs que finalmente permitiría su clonación gracias a los avances en la tecnología del ADN. Una vez analizadas las secuencias de aminoácidos se observó que existía una gran homología con el TGF-β (Reddi, 1994). Estos acercamientos permitieron a Wozney y cols. (1988) clonar la BMP-2, BMP-2B (ó BMP-4) y BMP-3 (u osteogenina), y a Ozkaynak y cols. (1990 y 1992) la BMP-7 (OP-1) y BMP-7B (OP-2).

Desde que tuvieron lugar estos hallazgos hasta hoy día, se han descrito unas 20 proteínas morfogenéticas, y se han aislado y clonado más de 40 BMPs de diferentes tejidos (Reddi, 1997).

1.2.2.1. Actividad biológica de las BMPs

Las BMPs son reguladores pleiotrópicos, ya que realizan funciones muy importantes en el organismo durante el desarrollo embrionario y posteriormente, en el adulto, participan en numerosos procesos regenerativos. Además de ser las responsables de la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos (Katagiri y Takahashi, 2002), regulan muchas funciones celulares como la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y mecanismos de adhesión en otros tipos celulares. Participan en la organización del mesodermo ventral embrionario y están involucradas en el desarrollo de casi todos los tejidos y órganos. Por ejemplo, la deficiencia de BMP-2 en ratón provoca defectos en el desarrollo cardíaco (Zhang y Bradley, 1996); la inducción del mesodermo es inhibido por deficiencia de la BMP-4 (Winnier *et al.*, 1995); la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

BMP-6 ha mostrado estar implicada en el desarrollo de la dermis; la BMP-7 es crítica para el desarrollo de ojos y riñón (Dudley *et al.*, 1995).

El estudio realizado por van der Horst y cols. (2002) muestra cómo las BMPs pueden ejercer diferentes funciones a lo largo de todo el proceso de diferenciación hacia el linaje osteogénico y que son necesarias, no sólo en la etapa inicial de la diferencición osteoblástica, sino también en las etapas de maduración y mineralización de la matriz. Por otro lado, Cheng y cols. (2003) han tratado de determinar cuál es el papel de las distintas BMPs humanas (de BMP-2 a BMP-15) a lo largo del proceso osteoinductivo y evaluar su actividad osteoinductora. Sus resultados les llevan a proponer un modelo jerárquico para la osteogénesis (**Figura 1.2.2.**) en el que BMP-2, -6 y -9 ejercen un importante papel en la inducción de diferenciación osteoblástica de las células mesenquimales, a diferencia del resto de las BMPs que sólo pueden estimular la osteogénesis en osteoblastos maduros (excepto BMP-3 y -12).

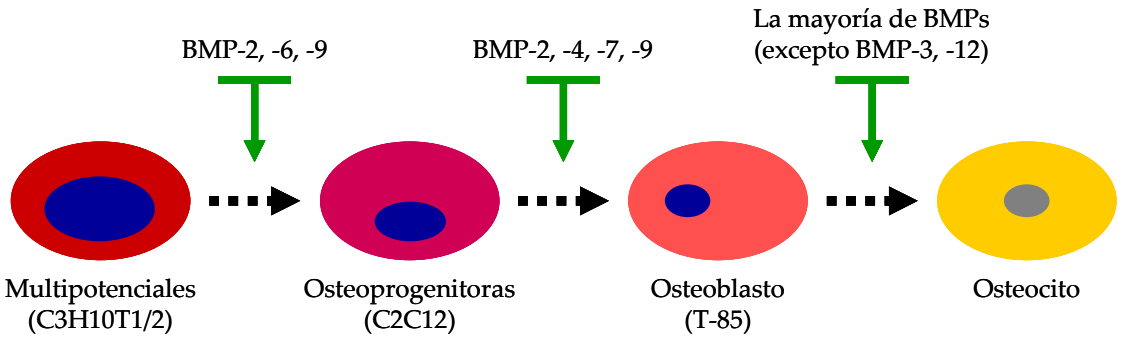


Figura 1.2.2. Capacidad osteogénica de las BMPs. C3H10T1/2: línea de células mesenquimales embrionarias de la cepa de ratones C3H; C2C12: línea celular de mioblastos de ratón; TE-85: línea celular procedente de osteosarcoma humano. (Adaptado de Cheng et al., 2003)

Por otra parte, las BMPs parecen estar implicadas en la vascularización, que es indispensable para una óptima resolución en la formación de los tejidos. Tanto estudios *in vitro* (Deckers *et al.*, 2002) como *in vivo* (Suwa *et al.*, 1998; Ripamonti *et al.*, 2000) demuestran que las BMPs estimulan la angiogénesis

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

como resultado de la inducción de la producción del VEGF-A por parte de los osteoblastos, aunque parece ser que éste no es el único mecanismo.

1.2.2.2. Isoformas y receptores de las BMPs

La familia de las BMPs se divide en, al menos, cuatro subfamilias dependiendo de la homología de las secuencias de aminoácidos de la proteína madura: la primera, constituida por la BMP-2 y BMP-4, entre las que hay un 92% de similitud; la segunda, formada por la BMP-3 u osteogenina y la BMP-3B ó GDF-10 (factor de crecimiento/diferenciación); la tercera, compuesta por BMP-5, -6, -7, -8A y -8B; y la cuarta, donde encontramos GDF-5, -6 y -7 ó CDMP-1, -2 y -3 (proteínas derivadas del cartílago), respectivamente. Otras proteínas, como GDF-2, -9B y -11, y BMP-10 y -16, también son consideradas miembros de esta familia (Reddi, 2001).

La unión de la BMP al receptor y la transducción de señales intracelulares siguen la ruta descrita para los TGF-βs. Se han identificado dos tipos de receptores: tipo I o BMPR-I, y tipo II o BMPR-II. El receptor tipo I es el que determina la especificidad de la unión al complejo BMPR, mientras que el tipo II es el que da lugar a la activación del mecanismo de transducción de la señal en el interior de la célula (Liu *et al.,* 1995; Massagué, 1998), de tal forma que la unión del ligando al complejo BMPR provoca que el BMPR-II fosforile el dominio intracelular glicina/serina del BMPR-I, lo cual puede activar dos rutas de señalización independientes: la vía de señalización "canónica" mediada por Smad o la vía de señalización "no-canónica" a través de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Botchkarev, 2003). La activación de una u otra ruta de señalización depende del mecanismo de unión del ligando a los receptores. Si la BMP se une a complejos BMPR previamente formados se activa la ruta de señalización mediada por Smad, mientras que si la BMP se une al BMPR-I, con el consiguiente reclutamiento del BMPR-II, se activa la cascada de señalización de MAPK (Nohe *et al.*, 2002).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.2.2.3. BMP-2

La BMP-2 en su forma biológicamente activa es un homodímero (Scheufler *et al.,* 1999), aunque también se han identificado al menos dos heterodímeros, BMP2/7 y BMP2/6, que han mostrado tener mayor capacidad de formación de cartílago y hueso que sus homodímeros (Aono *et al.,* 1995; Israel *et al.,* 1996). Además, la identificación de un receptor para la proteína heterodimérica BMP2/4, refuerza el concepto de que los heterodímeros son muy importantes en la biología (Mayer *et al.,* 1996).

La BMP-2 resulta ser una de las proteínas osteoinductoras más potentes, interviniendo en todas las etapas del proceso osteogénico. Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que se trata de un FC que ejerce su acción sobre diversos tipos celulares como células mesenquimales, células osteoprogenitoras, osteoblastos, condroblastos, células de osteosarcoma, e incluso otros tipos celulares apartados del linaje osteogénico, provocando su diferenciación hacia células formadoras de cartílago y hueso (Katagiri *et al.,* 1994; Sanyal *et al.,* 1999; Diefenderfer y Brighton, 2000; Majumdar *et al.,* 2001; Huang *et al.,* 2002).

Del mismo modo, se ha evaluado el efecto de la BMP-2 en la remodelación ósea. Diversos autores han señalado que estimula la formación de osteoclastos y la resorción ósea, ya que también actúa sobre osteoclastos maduros (Kanatani *et al.,* 1995; Komori *et al.,* 1997; Kaneko *et al.,* 2000). En otros estudios se comprobó que al añadir noggin (antagonista de BMP-2 y BMP-4) a un cultivo de células de médula ósea de ratón, se inhibía tanto la formación de osteoblastos como de osteoclastos. Además, estos efectos se revertían al incorporar BMP-2 de forma exógena. Asimismo, la adición de un anticuerpo anti-noggin causaba un aumento de la formación de células precursoras osteoblásticas. En resumen, estos resultados sugieren que la BMP-2 y BMP-4 se expresan en células de la médula ósea durante la vida postnatal y que sirven para mantener un continuo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

suministro de osteoblastos y osteoclastos al sistema óseo, tanto en formación como en reparación (Abe *et al.*, 2000).

Respecto a ensayos *in vivo*, existe gran número de estudios en los que se valora el efecto de la BMP-2 en la aceleración del proceso normal de reparación ósea, utilizando para ello modelos experimentales de defectos óseos pequeños que reparan de forma espontánea (Bax *et al.*, 1999; Schmidmaier *et al.*, 2002; Einhorn *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003). Aunque, aún más numerosos son los trabajos que evalúan su efecto en defectos óseos de tamaño crítico que no reparan de manera espontánea. En todos ellos, los efectos de la BMP-2 son mucho más llamativos, ya que éstos sólo se consiguen unir en los casos en los que se administra el factor (Kirker-Head *et al.*, 1995; Zegzula *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1998).

En los últimos años, se ha trabajado en las posibilidades que tanto el TGF-β1 como la BMP-2 podrían tener para reparar o acelerar la curación ósea. Y precisamente porque en la reparación ósea están implicados multitud de factores en perfecto equilibrio, se está estudiando el efecto sinérgico de estas proteínas en combinación con otros FCs para conseguir una reparación fisiológica.

1.3. HISTOGÉNESIS DEL HUESO

El hueso es un tejido conectivo especializado cuya MEC se encuentra calcificada. La formación del tejido óseo durante el desarrollo embrionario puede producirse de dos maneras: formación intramembranosa, en la que el hueso se forma sobre un tejido conjuntivo primitivo, o formación endocondral, en la que se realiza sobre un tejido cartilaginoso previo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.3.1. Osificación intramembranosa

Esta osificación, propia de los huesos planos, se inicia con la condensación del mesénquima en las zonas donde se localizarán los huesos originando una capa muy vascularizada de tejido conjuntivo mesenquimatoso con células estrelladas y colágeno. Éstas son células osteoprogenitoras que aumentan de tamaño y se transforman en osteoblastos, los cuales fabrican la matriz ósea y la mineralizan al segregar las vesículas de calcificación. El primer signo de osificación es la aparición de una matriz eosinófila, en bandas delgadas, equidistantes de los vasos, que forman una red y constituyen las primeras espículas y trabéculas óseas. Sobre la superficie de las trabéculas se adosan células osteoprogenitoras, que se diferencian en osteoblastos. Estas células adquieren una forma cúbica o prismática, se vuelven basófilas, sus prolongaciones se hacen más cortas y depositan nueva matriz ósea que permite el engrosamiento de las trabéculas. Los osteoblastos también secretan glucoproteínas de la matriz y moléculas de colágeno que polimerizan extracelularmente y forman una red de fibras de colágeno dispuestas al azar. Este primer hueso formado presenta la organización microscópica del llamado hueso reticular no laminar, no ordenado, inmaduro o primario. A medida que se añaden capas a las trabéculas óseas, los osteoblastos van quedando encerrados en la matriz mineralizada de las trabéculas dentro de lagunas (osteoplasmas u osteoplastos), transformándose en osteocitos. La superficie de las trabéculas va siendo ocupada por nuevos osteoblastos diferenciados de las células mesenquimales osteoprogenitoras próximas. Los osteocitos mantienen contacto entre sí mediante delgadas prolongaciones, los canalículos, que quedan rodeados de matriz ósea.

El hueso formado en las remodelaciones subsiguientes es ya hueso laminar, ordenado o maduro, con fibras colágenas ordenadas en laminillas. Si la zona de hueso inmaduro está destinada a dar lugar a hueso esponjoso, termina el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

engrosamiento de las trabéculas y el tejido vascular interpuesto se transforma en tejido hematopoyético. En cambio, si progresa la osificación a hueso compacto, las cavidades del tejido conjuntivo desaparecen al quedar rellenadas por hueso, los vasos sanguíneos se incorporan a la matriz calcificada y las laminillas se disponen a su alrededor, formándose sistemas más parecidos a los de Havers (Raisz y Kream, 1988; Rodan, 1992).

El tejido conjuntivo que rodea la masa ósea en crecimiento se condensa sobre ella formando el periostio. Al cesar el crecimiento, los osteoblastos que hay sobre la superficie ósea se inactivan y se asemejan morfológicamente a células osteoprogenitoras, que permanecen así mientras no se active la osificación.

1.3.2. Osificación endocondral

En este proceso, la primera señal de osificación es la hipertrofia de los condrocitos de la parte central del modelo cartilaginoso (**Figura 1.3.1.**). Los condrocitos son células con gran actividad metabólica, que proliferan y se diferencian en células sintetizadoras de matriz extracelular, como colágeno tipo II. Con la hipertrofia tiene lugar un metabolismo anaerobio, por lo que las células utilizan el glucógeno y el ATP almacenados anteriormente para incorporar calcio y empiezan a sintetizar colágeno tipo X y fosfatasa alcalina. Cuando la energía se consume, no pueden mantener el calcio en su interior, y éste es liberado a la matriz en las vesículas de calcificación. Como resultado, la matriz cartilaginosa se reduce a delgados tabiques donde se deposita el fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxiapatita, y esta calcificación de la matriz es lo que provoca la degeneración y muerte de los condrocitos hipertróficos (Wulthier, 1982; Farnum y Wilsman, 1987).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

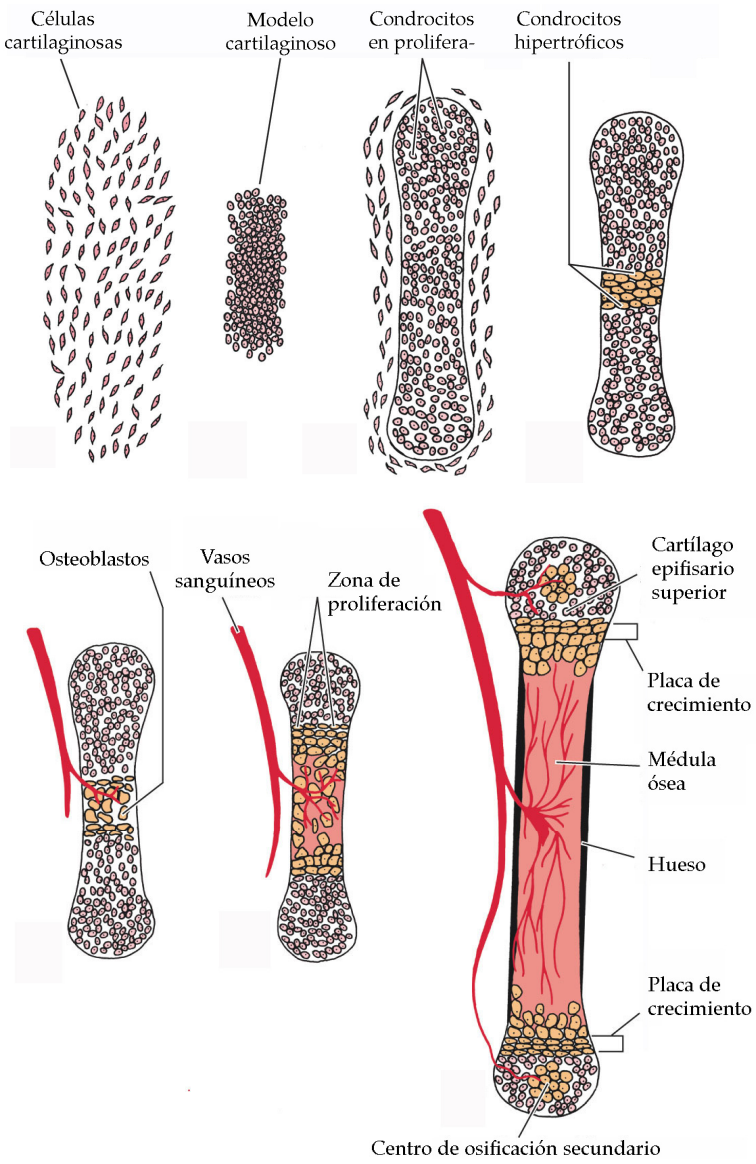


Figura 1.3.1. Esquema de la formación endocondral de hueso. (Adaptado de la octava edición de Developmental Biology)

Simultáneamente, las células del pericondrio se vuelven osteógenas y depositan una delgada capa de tejido óseo formando un anillo alrededor de la zona central, transformándose el pericondrio en periostio. Posteriormente, los vasos sanguíneos de este periostio penetran en la diáfisis e invaden las cavidades dejadas por los condrocitos. Junto con el tejido conjuntivo que acompaña a los vasos migran al interior células osteoprogenitoras, que en este ambiente vascular, y probablemente debido a un aumento del pH, se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

diferencian a osteoblastos, que son los encargados de depositar matriz ósea sobre las trabéculas calcificadas de la matriz cartilaginosa (Beresford, 1989).

Establecido así el centro primario de osificación en la diáfisis, en los límites distal y proximal de este centro aparecen dos zonas especializadas denominadas placas de crecimiento o placas epifisarias. En cada placa, los condrocitos se disponen en columnas, separadas por tabiques de matriz intercelular, de modo que pueden distinguirse diferentes zonas desde el extremo más cercano a su epífisis hasta el centro del hueso (**Figura 1.3.2.**).

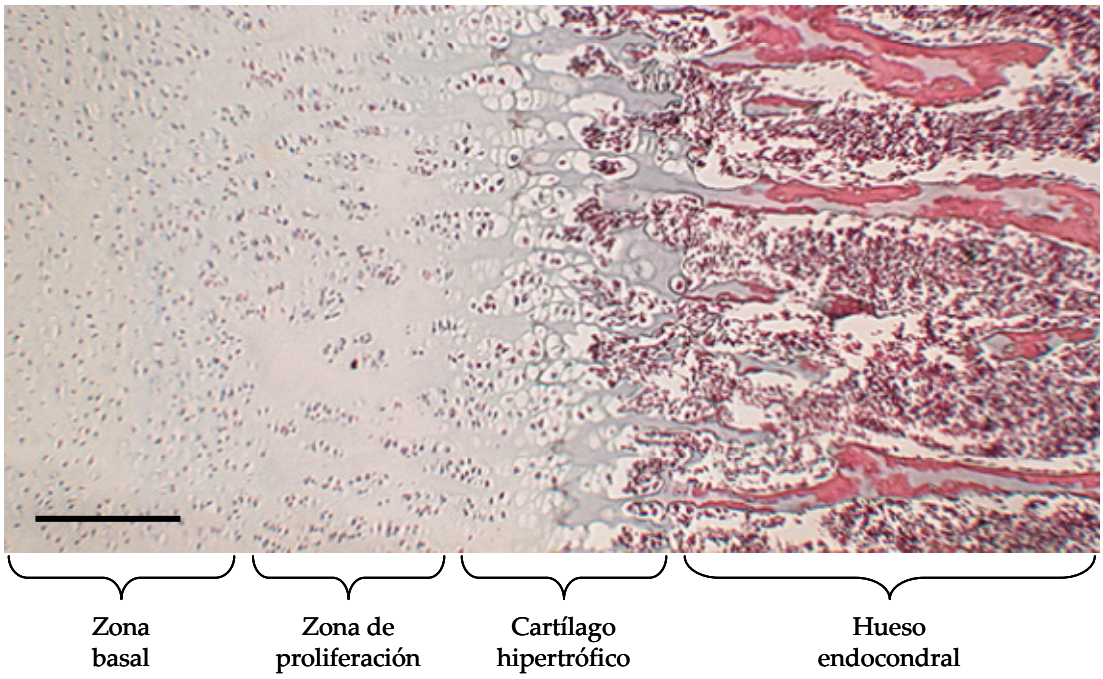


Figura 1.3.2. Sección histológica teñida con hematoxilina-eosina de la placa de crecimiento en la osificación endocondral. Barra: 350 µm.

Estas regiones se pueden resumir como sigue:

Zona basal, de reserva o de cartílago en reposo. Está constituida por condrocitos relativamente pequeños, dispuestos al zar sin formar todavía columnas, y de forma aislada o en grupos.

Zona de proliferación o de cartílago seriado. Es la única zona de la placa de crecimiento donde encontramos condrocitos en división. Los numerosos grupos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

isogénicos que se forman se disponen en columnas, paralelas entre sí y perpendiculares al plano de la metáfisis. Este aumento del número de células que se da en esta zona, es el que determina que la pieza vaya creciendo en longitud.

Zona de maduración o de cartílago hipertrófico. Los condrocitos se convierten en células grandes, redondas y vacuoladas que secretan la matriz y las vesículas de calcificación.

Zona de degeneración del cartílago y osificación. Los condrocitos desaparecen, penetran los vasos sanguíneos con células osteoprogenitoras y tiene lugar la osificación tal como se describió anteriormente.

En el humano, los centros primarios de osificación en las diáfisis de todos los huesos largos aparecen antes del tercer mes de vida fetal; sin embargo, aunque con excepciones, la aparición de los centros secundarios de osificación en cada epífisis no se observa hasta después del nacimiento. En primer lugar, los condrocitos de las epífisis se hipertrofian dando lugar al centro de osificación epifisario. Seguidamente, los vasos sanguíneos y el tejido osteogénico proveniente del pericondrio invaden estas zonas estableciendo los centros secundarios de osificación. Hay que destacar que en estos centros los condrocitos no se disponen en columnas y no se pueden distinguir las mismas zonas que en los centros de osificación primarios. En la pubertad el crecimiento de los huesos se detiene, debido a cambios hormonales que hacen que el cartílago de proliferación deje de dividirse. De esta manera, se sustituye por hueso todo el cartílago epifisario, con excepción del que persiste en forma de cartílago articular en su límite externo y el de la placa epifisaria, que con el tiempo también desaparece. Este proceso se conoce como cierre de las epífisis, y determina el fin del crecimiento de los huesos largos y, por tanto, del crecimiento del individuo.

La proliferación, la diferenciación y la mineralización son fenómenos que progresan de forma sincrónica y a ritmos que varían de unas épocas a otras de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

la vida en relación con el crecimiento en longitud del esqueleto óseo, siendo muy intensas durante el desarrollo fetal y los primeros años de vida. Los condrocitos pierden progresivamente su capacidad de multiplicarse, así como de sintetizar matriz extracelular, que se mineraliza más rápidamente hasta la desaparición del cartílago de crecimiento al finalizar el crecimiento y alcanzar la talla adulta. En este momento, la desaparición de los condrocitos de la zona de reserva puede considerarse total desde un punto de vista funcional, aunque no desde un punto de vista anatómico, ya que persiste una pequeña capa de células en reposo que, en condiciones patológicas, pueden multiplicarse y formar nuevo hueso.

1.3.2.1. Factores reguladores de la osificación endocondral

La diferenciación fenotípica y funcional de los condrocitos de las diferentes zonas del cartílago está regulada por hormonas, factores de crecimiento sistémicos y locales, y factores de transcripción.

Una de las señales que regulan la proliferación, maduración e hipertrofia de los condrocitos es la producida por *indian hedgehog* (Ihh), que pertenece a la familia de las proteínas *hedgehog*, que son morfógenas, es decir, indican cómo va a ir creciendo y hacia dónde se va a ir desarrollando el esqueleto. Ihh se expresa en los condrocitos prehipertróficos e induce la expresión del péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), y como resultado se estimula la proliferación de los condrocitos, retrasando su paso a hipertróficos (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). Pero Ihh no sólo afecta a los condrocitos, también estimula la diferenciación osteoblástica de las células mesenquimales, siendo indispensable para la formación del collar óseo subperióstico que rodea el cartílago hipertrófico previa a la formación del centro de osificación primario (Nakamura *et al.*, 1997; St-Jacques *et al.*, 1999).

Igualmente, otros estudios demuestran que el PTHrP y la hormona del crecimiento (GH) estimulan la proliferación de los condrocitos en la zona de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

reserva de una forma directa. Al mismo tiempo, también por acción de la GH, los condrocitos sintetizarían IGFs e IGFBPs (proteínas de unión para factor de crecimiento tipo insulínico) que regularían la diferenciación celular y estimularían la síntesis de colágeno y otras moléculas de la matriz (Nilsson *et al.*, 2005).

Otras hormonas, entre ellas las tiroideas y los esteroides gonadales, estimulan el proceso de maduración hacia condrocitos hipertróficos y la mineralización, al inducir la expresión de marcadores moleculares de la hipertrofia, entre ellos colágeno tipo X y fosfatasa alcalina, sin inducir proliferación (Shao *et al.*, 2006).

Los condrocitos de la zona de reserva expresan varios factores de crecimiento que, por un mecanismo auto/paracrino, regulan su diferenciación a células más maduras. Algunos, como el FGF-2 estimulan su proliferación e inhiben la diferenciación a condrocitos hipertróficos. Otro grupo de factores, además de las IGFs, que inducen el crecimiento esquelético son las BMPs. Por ejemplo, BMP-7 se expresa en la zona de proliferación y BMP-6 es producida por los condrocitos prehipertróficos e hipertróficos (van der Eerden *et al.*, 2003). Aunque algunos de los resultados obtenidos por diferentes grupos resultan ser contradictorios, lo que está claro es que las BMPs son fundamentales para la maduración hacia condrocitos hipertróficos (Grimsrud *et al.*, 2001; Minina *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2006). Otros, como los TGF-βs, inhiben el proceso de hipertrofia, en parte debido a que inducen la expresión de la PTHrP (Serra *et al.*, 1999).

Los factores de transcripción, entre los cuales se deben destacar Sox9 y Runx2, también juegan un papel fundamental. Se ha demostrado que Sox9 se expresa en la zona de proliferación, no en condrocitos hipertróficos, que induce la expresión de los principales componentes de la matriz cartilaginosa, como son el colágeno tipo II, IX, XI y agrecan *in vitro* (Lefebvre y Smits, 2005), y que su deleción o inactivación *in vivo* conlleva al fracaso de la condrogénesis

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Akiyama *et al.,* 2002). Por otro lado, Runx2 es necesario para la diferenciación de los osteoblastos (Ducy *et al.,* 1997; Komori *et al.,* 1997). Su expresión se inicia en los primeros estadíos de la hipertrofia y se mantiene hasta el final de la diferenciación, con lo cual se utiliza como marcador de condrocitos hipertróficos, junto con el colágeno tipo X (Komori *et al.,* 2000; Takeda *et al.,* 2001). Por otra parte, Runx2 puede inducir la expresión de metaloproteasas, como MMP-13, producidas exclusivamente por los condrocitos hipertróficos y capaces de degradar los dos mayores componentes proteicos de la matriz cartilaginosa, colágeno tipo II y agrecan (Alvarez *et al.,* 2005; Cawston y Wilson, 2006). Además, la expresión de MMP-13 es un requisito previo para la invasión de los vasos sanguíneos, osteoclastos y células osteoprogenitoras (Inada *et al*., 2004; Stickens *et al*., 2004).

La invasión de los vasos está inducida por el VEGF. Durante la osificación endocondral este factor es expresado por los condrocitos hipertróficos (Zelzer *et al.,* 2001 y 2004). Por otra parte, el VEGF no sólo está involucrado en la invasión vascular, sino que también actúa sobre los osteoclastos estimulando su supervivencia y la reabsorción de matriz (Nakagawa *et al*., 2000).

Los osteoclastos, que acompañan a los vasos sanguíneos, son necesarios para el establecimiento del centro de osificación primario, sin ellos la mayoría de la matriz cartilaginosa no sería destruida (Mackie *et al.,* 2008). Esta remodelación, llevada a cabo por los osteoclastos, forma grandes cavidades que son ocupadas por células osteogénicas, las encargadas de la deposición de matriz ósea.

En resumen, el conocimiento de las vías celulares y moleculares que gobiernan el proceso de esqueletogénesis es crucial para la ingeniería de tejidos, ya que la comprensión de la manera en que estos fenómenos pueden ser inducidos y controlados representaría un avance importante en la investigación sobre reparación de fracturas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

1.4.1. Características de la citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica sencilla capaz de proporcionar resultados de forma rápida que pueden ser aplicables al diagnóstico. Gracias a su gran especificidad nos permite distinguir entre varias poblaciones celulares diferentes, y detectar una población celular en una muestra en la que predominan otras poblaciones celulares mayoritarias. Pero su principal característica es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas.

En nuestro caso, la citometría nos ha permitido el análisis de dos parámetros de dispersión (SS y FS), tres de fluorescencia (FL1, FL2 y FL3) con el láser de luz azul, y de una cuarta fluorescencia (FL6 ó FL7) con el láser rojo.

1.4.2. Fundamentos de la citometría de flujo

La citometría de flujo (FACS del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorter*) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células), alineadas y de una en una, por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Estos parámetros son:

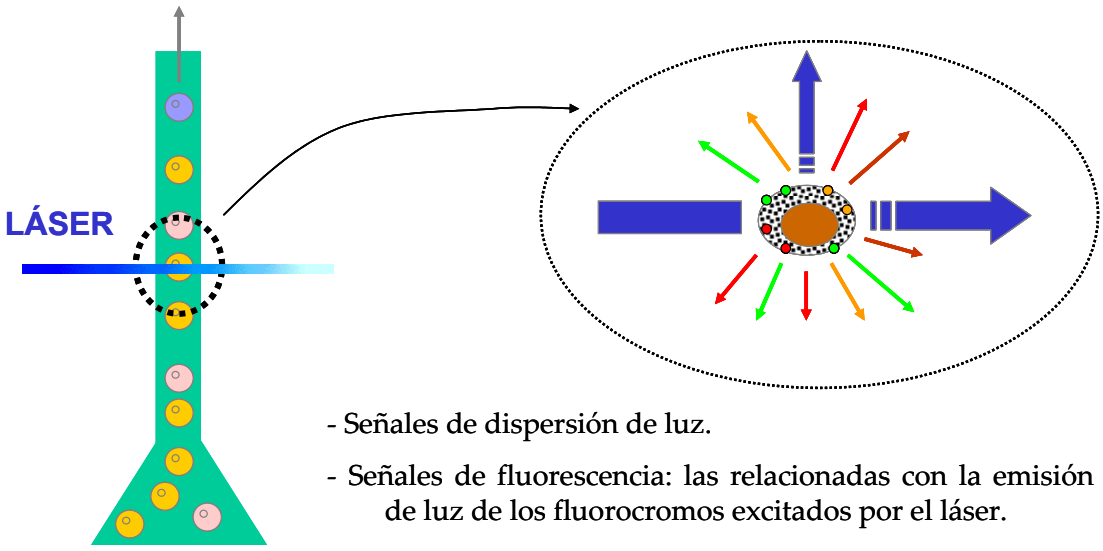
- Parámetros relacionados con características intrínsecas de la célula, como su tamaño y la complejidad de su núcleo y citoplasma.

- Parámetros relacionados con características antigénicas de cada célula (inmunofenotipo).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Por lo tanto, la citometría de flujo es capaz de identificar una célula por medio de sus características morfológicas de tamaño y complejidad y/o por sus características antigénicas.

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos:

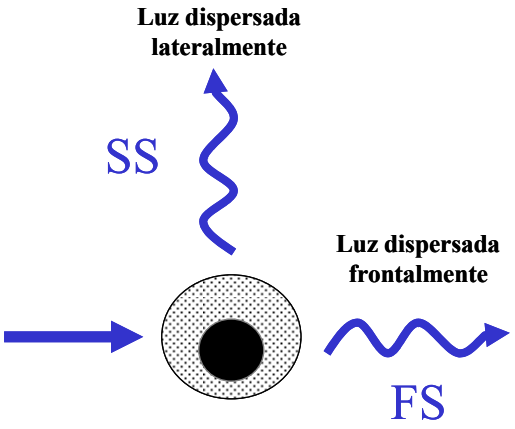


- Señales de dispersión: La dispersión resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad. En los citómetros de flujo se miden dos fracciones de dispersión:

a) La luz dispersada en ángulo cónico pequeño (0-10°) que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FS (*Forward Scatter*). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.

b) La luz dispersada en ángulo recto llamada SS (*Side Scatter*). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



- Señales de fluorescencia: Un fluorocromo es una molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda (energía) y emite a una longitud superior (menor energía). El espectro de absorción o excitación es el rango sobre el que un fluorocromo absorbe luz, y el espectro de emisión es el rango sobre el que un fluorocromo emite luz. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos antígeno/anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula.

1.4.3. Aplicaciones de la citometría de flujo

La citometría de flujo se aplica de manera rutinaria en laboratorios clínicos y de investigación de todo el mundo. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de gran calidad ha facilitado la aplicación de este método analítico en el diagnóstico, clasificación, evaluación pronóstica y valoración de algunas enfermedades. De forma que se ha podido demostrar su utilidad en áreas como el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, el monitoreo de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Matsui *et al.*, 2004), el lupus eritematoso sistémico (Liu *et al.*, 2004) y la artritis reumatoide (Dai *et al.*, 2004). Asimismo se ha demostrado útil en el seguimiento de la recuperación inmune tras el trasplante de médula ósea (Kalwak *et al.*, 2003), en la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

identificación precoz del rechazo en pacientes que han recibido un trasplante alogénico (Cotteret *et al.,* 1998), o en el monitoreo terapéutico de los enfermos con anemia aplásica (Ruiz-Arguelles *et al.,* 1999).

También son innumerables sus aplicaciones a la investigación básica, desde distintos campos como la microbiología, hematología, inmunología, citología, patología, biología celular y molecular, entre otros. Así que, la citometría de flujo ha sido utilizada en el monitoreo del contenido de ADN (Asbury *et al.*, 1996), expresión fenotípica, transporte de drogas, flujo de calcio, proliferación y apoptosis (McCloskey *et al.*, 1994).

Virtualmente es posible marcar cualquier molécula que sea de interés siempre que se disponga de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo que pueda ser detectado por el citómetro de flujo. Esto hace posible que las aplicaciones de esta técnica se adapten prácticamente a cualquier necesidad de investigación. En nuestro estudio, la citometría de flujo ha representado una herramienta fundamental para la identificación de las poblaciones celulares presentes en los distintos cultivos llevados a cabo, así como el perfil de diferenciación de dichas células.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha descrito previamente, el TGF-β es el principal FC implicado en la regulación de la formación ósea y cartilaginosa tras una lesión, así como durante el crecimiento normal y la remodelación de esos tejidos. Asimismo, el colágeno tipo I parece necesario para la expresión del fenotipo osteoblástico por células mesenquimáticas inmaduras (Shi *et al.,* 1996). Además, se ha señalado que la adicción de TGF-β1 en geles de colágeno realza el proceso de diferenciación osteogénica *in vitro* (Mizuno *et al.,* 1995). Con estos antecedentes, nuestro grupo ha desarrollado y patentado un sistema de cultivo 3D basado en la interacción de las células con matrices de colágeno y TGF-β1, denominado Método de Capacitación Osteogénica (MCO) (Andrades *et al.,* 1999, 2001, 2002, 2003; Becerra *et al.,* 2005, 2006). Estos experimentos demostraron que con el gel de colágeno, en combinación con un TGF-β1 con un dominio de alta afinidad por el colágeno (rhTGF-β1-F2), obtenido en el laboratorio del Prof. Marcel E. Nimni (Universidad del Sur de California, EEUU), se seleccionan células que tras el período de inducción expresan marcadores óseos *in vitro* y que son capaces de formar cartílago y hueso *in vivo*.

Con el fin de estudiar más en profundidad este sistema 3D, se establecieron los siguientes objetivos concretos:

1.- Caracterizar mediante citometría de flujo las células seleccionadas por el método de capacitación osteogénica.

2.- Determinar si con el MCO se está seleccionando una población de condro-osteoprogenitores de la médula ósea diferente de la cultivada en el sistema habitual en 2D.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.- Estudiar la capacitación condro-osteogénica de las células seleccionadas por los cultivos 3D y 2D mediante experimentos *in vivo* de histogénesis ectópica.

4.- Comprobar la bioseguridad mediante experimentos de bioluminiscencia no invasiva para probar que las células implantadas en las cámaras de MOD no invaden otros órganos ni forman tumores.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado ratas albinas de la cepa Fischer 344/IcoCrl de 12 semanas de edad, así como ratones inmunodeprimidos SCID de la cepa CB17/ICR-Prkdc$^{scid/Crl}$ de 15 semanas de edad, ambos de la casa comercial *Charles River*.

Los animales se mantuvieron estabulados bajo condiciones controladas en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga. La temperatura media de la habitación fue de 20±2 °C y el fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de mantenimiento, y tuvieron libre acceso a la comida y agua.

Durante todo el estudio los animales se manipularon siguiendo la directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC y el Real Decreto 1201/2005 del 21 de octubre de 2005 sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

2.2. EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA DE RATA

Como fuente de MSCs se utiizó la médula ósea, que fue obtenida de los fémures de ratas macho. En condiciones de esterilidad y frío, tras limpiar los huesos del tejido muscular, se cortaron las epífisis para extraer la médula ósea inyectando a presión DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*), con ayuda de una jeringa y aguja de 19 G. Las células se separaron y dispersaron por medio de repetidos pipeteos y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El centrifugado se resuspendió en DMEM-F12 y se mantuvo a 4 °C hasta el momento de la siembra.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.3. ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA HUMANA

Las muestras humanas de médula ósea se obtuvieron por punción de la cadera en el curso de intervenciones quirúrgicas que precisaron la sustitución protésica de la misma, realizadas por el equipo de traumatología del Hospital Costa del Sol de Marbella. El volumen aspirado, unos 5 cc, se tomó con una jeringa y aguja heparinizadas específicas para aspiración de médula ósea, se vertió en un tubo falcon con 0.5 ml de heparina y fue transportada a 4 °C hasta el laboratorio donde se inició su procesamiento.

La muestra de médula ósea fue diluida en una proporción 1:2 en DMEM-F12 10% FBS (apéndice I.2.), y sometida a repetidos pipeteos para facilitar la separación celular. Posteriormente, tras completar hasta 40 ml con el mismo medio, se pasó a través de una jeringa con aguja de 20 G para disgregar los aglomerados celulares y eliminar posibles restos óseos. Después, la muestra fue sometida a un gradiente de densidad, depositándola sobre una solución de Percoll® (apéndice I.3). Tras la centrifugación a 2200 rpm durante 15 minutos se recogió el sobrenadante y la interfase, que se resuspendió en DMEM-F12 10% FBS. Las células fueron centrifugadas de nuevo a 1500 rpm durante 5 minutos y resuspendidas en 10 ml de medio. Este último paso se repitió 2 veces con objeto de lavar las células de los restos del Percoll®. A continuación, se pasó a través de una jeringa con aguja de 21 G para disgregar posibles aglomerados celulares, y se mantuvo a 4 °C hasta el momento de la siembra o del procesado para el estudio fenotípico mediante citometría de flujo.

2.4. MÉTODO DE CAPACITACIÓN OSTEOGÉNICA (MCO)

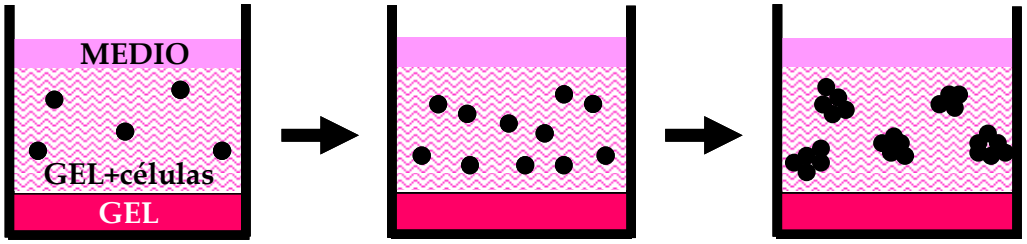
Este procedimiento experimental se usó para seleccionar las células mesenquimales, amplificarlas e inducir la diferenciación condro-osteogénica de las mismas, partiendo de una mezcla heterogénea de células de médula ósea humana o de rata.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las células, en medio de cultivo con muy baja concentración de suero (0.5% FBS), se mezclaron con una solución de colágeno tipo I (0.85 mg/ml), donde previamente se había añadido rhTGF-β1 a una concentración de 1 ng/ml. Los cultivos se realizaron en placas de 48 pocillos que se llevaron al incubador (37 °C) durante 30 minutos para permitir la formación de los geles de colágeno.

Finalmente, sobre los geles se añadió 250 µl de medio de cultivo bajo en suero con rhTGF-β1, que se omitió en la situación control. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera con 95% de aire y 5% CO_2, a 37 °C de temperatura y 100% de humedad relativa. El medio de cultivo se renovó cada 3 días añadiendo rhTGF-β1 fresco.

El diseño experimental del MCO convencional se esquematiza como sigue:



Las células de médula ósea, en las condiciones de cultivo descritas anteriormente, se sometieron a un período de cultivo de 10 días a muy baja concentración de suero (período de selección) con el propósito de eliminar la mayor parte de las células de la línea hematopoyética. La presencia del rhTGF-β1, permite mantener vivas de manera selectiva la población de células madre osteoprogenitoras que se pretende seleccionar.

En el día 10 de cultivo se inició el período de amplificación, que consistió en cambiar a medio de cultivo completo (10% FBS). En los dos últimos días del cultivo (período de diferenciación), se añadió dexametasona (Dex) 10^{-8} M y β-glicerolfosfato (β-GP) 2 mM, que han mostrado su eficacia en la estimulación

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de células en cultivo de distintos orígenes para promover la expresión de marcadores óseos. La Dex estimula la expresión de fosfatasa alcalina, necesaria para la mineralización y el β-GP eleva los niveles de fósforo inorgánico necesario para la formación de fosfato cálcico.

Al final de cada período se realizó un análisis bioquímico consistente en mediciones de fosfatasa alcalina, y una caracterización celular mediante citometría de flujo para estudiar la expresión de los distintos marcadores moleculares de las líneas mesenquimática, hematopoyética y endotelial.

2.5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

La diferenciación osteogénica de las células se comprobó *in vitro* mediante el análisis de la actividad fosfatasa alcalina referido a cantidad de ADN.

Para las muestras procedentes del MCO fue necesario disgregar el gel de colágeno para liberar las células. Esto se realizó incubando con el mismo volumen de colagenasa al 0.05% durante 10 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se paró la reacción con DMEM, añadiendo el doble del volumen usado de colagenasa. La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se sometió a 3 ciclos de congelación/descongelación de 10 minutos. Posteriormente, las células se resuspendieron en un tampón de lisis constituido por NaCl 0.15 M, $NaHCO_3$ 3 mM y 0.1% Triton® X-100, pH 7.4. Tras sonicar dos veces durante cinco segundos, los restos celulares se dejaron decantar durante 30 minutos a 4 °C. En este punto, las muestras se pueden congelar a -20 °C hasta el momento del análisis.

2.5.1. Cuantificación de ADN

Para analizar la cantidad de ADN en las muestras procedentes del MCO se utilizó el método de tinción con Hoechst. Se mezclaron 100 µl del lisado celular

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

con 100 µl de una dilución 1:1000 de la solución stock de Hoechst (1 mg/ml), y se leyó en el fluorímetro a una excitación de 360 nm y emisión de 460 nm.

2.5.2. Análisis de la expresión de fosfatasa alcalina

Para analizar la expresión de fosfatasa alcalina, a 10 µl del lisado celular se le añadieron 100 µl de solución de p-nitrofenol fosfato (pNPP) como sustrato y se incubó a 37 °C durante 8 minutos. La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA a 405 nm, tras parar la reacción con NaOH 1 N. Los valores de expresión de la enzima se representaron como concentración de p-nitrofenol en nmol/ml/minuto por ng/ml de ADN.

2.6. CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES

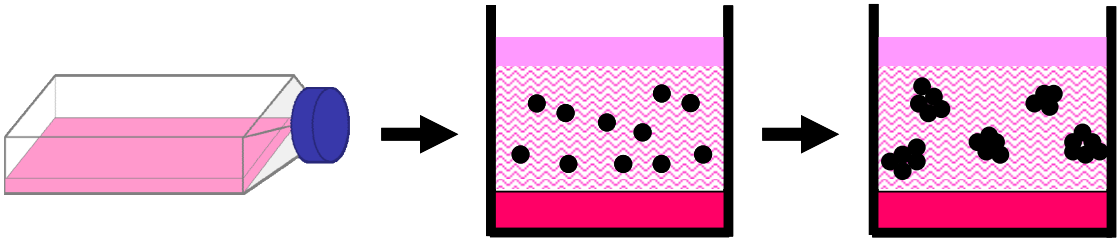
La mezcla heterogénea de células de médula ósea y de células procedentes del MCO se sembraron en monocapa a una densidad de 2×10^4 células/cm^2 con DMEM-F12 10% FBS. Dichos cultivos, denominados ADH y MCO-ADH respectivamente, se mantuvieron a 37 °C de temperatura, en atmósfera de 5% CO_2 y 100% de humedad relativa, renovándoles el medio cada 3 días. Los subcultivos se llevaron a cabo cuando las monocapas de células alcanzaban la confluencia, despegándolas con 1 ml de solución tripsina-EDTA y sembrándolas a una dilución 1:2.

La capacitación osteogénica del cultivo de células ADH, que posteriormente iban a ser implantadas, se realizó cultivando durante 4 días con rhTGF-β1 a una concentración de 1 ng/ml, seguido de 2 días más en medio osteoinductor, compuesto por Dex 10^{-8} M, β-GP 10 mM y ascorbato-2-fosfato (ASC-2P) 50 µM.

2.7. CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES CON EL MCO (ADH-MCO)

La población de células adherentes, tras ser seleccionada por su adherencia al plástico, fue amplificada y diferenciada con el MCO descrito en el punto 4. El diseño experimental seguido se esquematiza de la siguiente forma:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



CULTIVO 2ario DE CÉLULAS ADH
DMEM-F12 10% FBS

AMPLIFICACIÓN
10% FBS + rhTGF-β1
4 días

DIFERENCIACIÓN
10% FBS + Dex + β-GP
2 días

Al final del período de diferenciación con Dex y β-GP se realizó una caracterización celular mediante citometría de flujo para estudiar la expresión de los distintos marcadores moleculares de MSCs y MAPCs.

Posteriormente, esta población celular, denominada como ADH-MCO, fue inducida *in vitro* hacia varios tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo o ectodermo) para comprobar su potencialidad. Como control de estos experimentos se usaron células adherentes con el mismo número de pases y el mismo tratamiento, y/o células ADH-MCO cultivadas en medio control.

2.7.1. Diferenciación osteogénica

La capacitación osteogénica se realizó cultivando 3 x 10^4 células en placas de 35 mm durante 21 días con medio osteoinductor, compuesto por Dex 10^{-7} M, β-GP 2 mM y ASC-2P 50 μM (apéndice I.2.). Después del período de inducción se analizó la expresión de fosfatasa alcalina, tanto bioquímica (referida a cantidad de ADN) como histoquímica, y la formación de precipitados minerales, con la técnica de von Kossa, en los días 12 y 21 del cultivo *in vitro*.

2.7.1.1. Cuantificar ADN en placas de 35 mm

Para analizar la cantidad de ADN en células cultivadas en placas de 35 mm se utilizó el método de tinción con Hoechst.

En primer lugar, se retiró el medio de los cultivos y se realizaron dos lavados con solución de Tyrode. Tras eliminar el exceso de tampón y dejar secar

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

al aire, las placas se congelaron a -70 °C. Una vez que se recopilaron todas las placas, se continuó con el ensayo de cuantificación de ADN. Después de descongelar los cultivos, se incubaron con NaOH 0.1 N durante 1 hora a temperatura ambiente y se volvieron a guardar a -70 °C durante al menos 24 horas. Al día siguiente, para realizar la curva patrón se prepararon las siguientes diluciones de la solución stock de ADH de timo de ternera (1 mg/ml en agua destilada), en una mezcla 1:1 de NaOH 0.1 N y tampón de neutralización, compuesto por NaCl 4 M, Na_2HPO_4 0.1 M y HCl 0.1 N:

	Volumen de la solución stock de ADH (µl)	Volumen de la mezcla 1:1 (µl)	Volumen de la solución de Hoechst (µl)	Concentración final de ADN (ng/ml)
Blanco	0	1000	1000	0
Tubo 1	1	999	1000	500
Tubo 2	2	998	1000	1000
Tubo 3	3	997	1000	1500
Tubo 4	4	996	1000	2000
Tubo 5	5	995	1000	2500
Tubo 6	6	994	1000	3000

Seguidamente, se descongelaron las placas, y se llevó 1 ml del lisado celular a un tubo de polipropileno de 12 x 75 mm. A continuación, se lavó cada placa con 1 ml del tampón de neutralización, para recoger los posibles restos celulares que quedaran y transferirlos a su tubo correspondiente.

Posteriormente, se mezclaron 100 µl del lisado celular con 100 µl de una dilución 1:1000 de la solución stock de Hoechst (1 mg/ml), y se leyó en el fluorímetro a una excitación de 360 nm y emisión de 460 nm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.7.1.2. Expresión de fosfatasa alcalina en placas de 35 mm

La diferenciación osteogénica de las células se testó al analizar la expresión de fosfatasa alcalina bioquímica e histoquímicamente.

Las placas de 35 mm se lavaron dos veces con solución de Tyrode, y se incubaron con 1 ml de una solución de p-nitrofenol fosfato (1 mg/ml) en tampón substrato (SBS) pH 10.5, compuesto por glicina 50 mM y $MgCl_2$ 1 mM, durante 8 minutos. Pasado este tiempo, se paró la reacción con 1 ml de NaOH 1 N. Hay que ser muy riguroso con el tiempo, pues el resultado se expresa en concentración de p-nitrofenol en nmol/ml/minuto por ng/ml de ADN. Los 2 ml se transfirieron a tubos de polipropileno de 12 x 75 mm, y se añadió 1 ml de solución de Tyrode a las placas para evitar que se secaran.

A continuación se prepararon las distintas concentraciones de p-nitrofenol de la curva patrón, formadas por diluciones de una solución de p-nitrofenol (50 µl de la solución estándar de p-nitrofenol y 9.950 ml de NaOH 0.02 N) en NaOH 0.02 N.

	Volumen de la solución de p-nitrofenol (µl)	Volumen de NaOH 0.02 N (µl)	Concentración final de p-nitrofenol (nmol /ml)
Blanco	0	1100	0
Tubo 1	100	1000	4.5
Tubo 2	200	900	9
Tubo 3	400	700	18
Tubo 4	600	500	27
Tubo 5	800	300	36
Tubo 6	1000	100	45

Por último, se añadieron 200 µl en cada pocillo de una placa de 96, y se leyó la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 405 nm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Antes de analizar la fosfatasa alcalina histoquímicamente, se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución de trabajo de citrato, formada por 2 ml de la solución de citrato concentrado y 48 ml de agua bidestilada.
- Solución fijadora, compuesta por 60% de la solución de trabajo de citrato y 40% de acetona.
- Solución de sal de diazonio, resultado de disolver el contenido de una cápsula de sales de Fast Violet B (12 mg) en 48 ml de agua destilada.
- Tinte alcalino, formado por la mezcla de 0.25 ml de solución de naftol AS-MX fosfato alcalina y 6 ml de la solución de sal de diazonio diluida.

A continuación, las placas se fijaron con la solución de acetona tamponada con citrato durante 30 segundos, y tras lavar dos veces con agua destilada, se incubaron con 1 ml de la mezcla de tinte alcalino durante 45 minutos en oscuridad. Por último, las placas se lavaron con agua destilada, antes de ser observadas al microscopio óptico invertido.

2.7.1.3. Determinación de fosfato cálcico en placas de 35 mm

Mediante la técnica histoquímica de tinción de von Kossa se pone de manifiesto los precipitados de fosfato cálcico, que se tiñen de marrón oscuro.

Las células se fijaron con formalina neutra tamponada 10% durante 5 minutos. Tras realizar 3 lavados con agua destilada, las placas se incubaron con 1 ml de una solución de nitrato de plata al 2% en agua destilada durante 10 minutos en oscuridad. Seguidamente, se lavaron 3 veces con agua, y se incubaron con el último lavado bajo una lámpara de 100 W durante 15 minutos. Para finalizar, se trataron con etanol de 100°, se dejaron secar al aire y se estudiaron en el microscopio óptico invertido.

2.7.2. Diferenciación condrogénica

La capacitación condrogénica se comprobó mediante la técnica de formación de micromasas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Se resuspendieron 2.5 x 10^5 células en 0.5 ml de medio condrogénico (apéndice I.2) en un tubo falcon de 15 ml, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Las micromasas se mantuvieron durante 21 días a 37 °C en atmósfera de 5% CO_2 y 100% de humedad relativa, renovándoles el medio cada 2 días.

Al finalizar el período de cultivo *in vitro*, las micromasas fueron fijadas con formalina neutra tamponada 10% (apéndice I.7.1.) durante 30 minutos e incluidas en parafina para someterlas a un estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico para microscopía óptica, que nos permitió estudiar la presencia de cartílago.

2.7.3. Diferenciación adipogénica

La capacitación adipogénica se llevó a cabo cultivando 2 x 10^5 células por placa de 35 mm en DMEM 1% FBS suplementado con Dex 10^{-7} M e insulina 10^{-9} M (apéndice I.2.), durante 21 días.

Para evaluar la diferenciación adipogénica, las células se tiñeron con el colorante para lípidos Oil Red O (1 mg/ml en isopropanol al 60%) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se lavaron con agua destilada y se observaron al microscopio óptico invertido.

2.7.4. Diferenciación hacia el linaje endotelial

La diferenciación endotelial se realizó cultivando 2 x 10^4 células/cm^2 en placas tratadas con 10 ng/ml de fibronectina en medio libre de suero (apéndice I.2.) con 10 ng/ml de VEGF-B durante 14 días.

Posteriormente, se comprobó el estado de la diferenciación celular mediante citometría de flujo frente a los antígenos CD31, CD34, CD49a, CD133, CD146 y Flk-1, e inmunofluorescencia frente a CD31, factor de von Willebrand (vWF) y Flk-1, característicos del linaje endotelial (apéndice I.6.).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.7.5. Diferenciación hacia linajes neuroectodérmicos

Para la diferenciación neural se sembraron 1 x 10^4 células/cm^2 en placas tratadas con 10 ng/ml de fibronectina en medio libre de suero con 100 ng/ml de bFGF durante 14 días.

La diferenciación hacia los linajes neuroectodérmicos se testó mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-GFAP, anti-βIII tubulina y anti-neurofilamento-200 (NF-200) a los 7 y 14 días (apéndice I.6).

2.7.6. Diferenciación hacia linajes endodérmicos

La diferenciación endodermal se llevó a cabo cultivando 21.5 x 10^3 células/cm^2 en placas tratadas con matrigel al 2% en medio libre de suero con 10 ng/ml de FGF-4 y 20 ng/ml del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) durante 14 días.

Para comprobar la diferenciación hacia hepatocitos se realizaron las inmunofluorescencias frente a los antígenos citoqueratina 18 (CK-18), factor nuclear de hepatocitos (HNF)-1 y albúmina (apéndice I.6).

2.8. CITOMETRÍA DE FLUJO

2.8.1. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio fenotípico

En los últimos años se han descrito distintos marcadores de superficie que han permitido identificar y aislar MSCs, como CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-I y STRO-1. Y de igual forma, existen antígenos de superficie característicos de las HSCs, como CD14, CD34 ó CD45.

Las características de los anticuerpos monoclonales empleados en el estudio fenotípico se muestran en la siguiente tabla. En cada tubo, las células fueron incubadas con tres anticuerpos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

	Casa Comercial	Clon	Isotipo	Flurocromo
CD13	BD Pharmingen	WM15	IgG1, κ	APC
CD29	R&D	P5D2	IgG1	PE
CD31	BD Pharmingen	WM59	IgG1, κ	FITC
CD34	Miltenyi Biotec	AC136	IgG2a	FITC
CD44	BD Pharmingen	G44-26	IgG2b, κ	APC
CD45	Miltenyi Biotec	5B1	IgG2a	APC
CD49a	BD Pharmingen	SR84	IgG1, κ	PE
CD49b	BD Pharmingen	12F1	IgG2a, κ	PE
CD73	BD Pharmingen	AD2	IgG1, κ	PE
CD90	R&D	Thy-1A1	IgG2a	APC
CD105	R&D	166707	IgG1	FITC
CD106	BD Pharmingen	51-10C9	IgG1, κ	FITC
CD133	Miltenyi Biotec	AC133	IgG1	-
CD146	BD Pharmingen	P1H12	IgG1, κ	PE
CD166	AbD serotec	3A6	IgG1	FITC
CD271	Miltenyi Biotec	105902	IgG1	PE
Flk-1	Santa Cruz Biotechnology	A-3	IgG1	-
Fosfatasa alcalina (FA)	R&D	B4-78	IgG1	APC
HLA-I	BD Pharmingen	G46-2.6	IgG1, κ	FITC
HLA-II	BD Pharmingen	G46-6	IgG2a,	PE
STRO-1	R&D	STRO-1	IgM, λ	-
Anti-IgM de ratón	AbD serotec	-	Policlonal	PE
Anti-IgG de ratón	Invitrogen	-	Policlonal	Alexa Fluor® 488 y 750

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.8.2. Preparación de las muestras para el estudio fenotípico

- Suspender 1 x 10^6 células en tampón FACS (apéndice I.2.) en un tubo de polipropileno de 12 x 75 mm.
- Lavar una vez en tampón FACS y centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos.
- Incubar con el anticuerpo primario o con los anticuerpos conjugados a un fluorocromo, durante 30 minutos a 4 °C.
- Lavar en tampón FACS y centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos.
- Incubar con el anticuerpo secundario, si el anticuerpo no estaba conjugado a un fluorocromo, durante 30 minutos a 4 °C.
- Lavar en tampón FACS y centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos.
- Incubar con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) durante 20 minutos a 4 °C, marcador de viabilidad usado para excluir las células muertas en los ensayos de citometría de flujo.

2.8.3. Preparación de las muestras para el análisis de ADN

- Suspender 1 x 10^6 células en 1 ml de tampón PBS (apéndice I.1.) en un tubo de polipropileno de 12 x 75 mm.
- Añadir 2 ml de metanol a 1 ml de la suspensión celular, e incubar durante 30 minutos a 4 °C.
- Centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos.
- Incubar con 500 µl de la solución de ioduro de propidio, compuesta por 10 mg de ioduro de propidio (IP), 0.1 ml de Triton® X-100, 3.7 mg de EDTA y tampón PBS hasta 100 ml, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2.8.4. Procedimiento de análisis en el citómetro

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo *MoFlo*® SP1338 (DakoCitomation, Dinamarca) dotado de:

- Dos láseres: *Coherent Enterprise II* con dos picos de emisión, uno en 488 nm y otro entre 351 y 364 nm, y diodo rojo con pico de emisión en 635 nm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- Un fotoreceptor para la luz transmitida (FS).
- Ocho fotomultiplicadores, uno de ellos para captar la luz dispersada (SS), y los otros siete para captar las distintas fluorescencias: tres para la luz azul, dos para la ultravioleta y dos para la roja.
- Boquillas para diferentes tamaños de partículas o células, 50, 70, 100, 200 y 400 micras.
- Dispensador de muestra totalmente automatizado, *Smart Sampler*, con posibilidad de usar tubos de 0.5 ml, 1.5 ml, 5 ml base redonda, 14 ml base redonda, 15 ml base cónica o 50 ml base cónica.
- Separación celular hasta en 4 vías simultáneamente.
- Aplicación para calibración de la separación, *Cyclone*.
- Aplicación para control automático de la separación, *Sort Master*.
- Posibilidad de hacer la separación tanto en tubo como en portas o placas multipocillos.
- Programa para visualización de los datos *Summit v. 4.0*.

Se analizaron un mínimo de 50.000 eventos viables. Los datos fueron adquiridos en forma de histogramas mono y biparamétricos. El posterior análisis de los datos, utilizando el programa *Summit v. 4.0*, se aprovechó para recombinar los parámetros obtenidos y redefinir diferentes regiones de selección.

El porcentaje de células positivas fue determinado tomando como referencia la tinción no específica con anticuerpos del mismo isotipo.

2.9. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

Para estudiar los cultivos ADH, así como el efecto de la osteoinducción sobre dichas células, se realizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión con la ayuda del equipo del Dr. José Manuel García Verdugo, del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En primer lugar, se retiró el medio del cultivo y se realizaron tres lavados de dos minutos con PB 0.1 M. Después se fijaron la células con 1 ml de glutaraldehído al 3.5% durante 40 minutos a 37 °C. Tras la fijación, los cultivos se lavaron tres veces con PB 0.1 M, se cubrieron con agar al 2%, que una vez solidificado fue humedecido con PB 0.1 M con azida sódica al 0.05% y mantenido a 4 °C. De esta forma, los cultivos fueron enviados a Valencia donde se continuó con el procesamiento.

El siguiente paso fue la postfijación con osmio al 0.2%, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, seguida de la deshidratación en pasos sucesivos de etanol de gradación creciente (30°, 50° y 70° durante tres minutos cada uno). Posteriormente, se sumergió en acetato de uranilo al 2% en etanol 70° durante una hora a 4 °C y en oscuridad, y pasado este tiempo se continuó con la deshidratación (70°, 2 x 96° y 3 x 100° durante 3 minutos cada uno). A continuación, se incubó en araldita al 50% en etanol absoluto durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave, después con una mezcla 1:3 de etanol 100° y araldita durante 30 minutos, y por último en araldita pura durante toda la noche. Al día siguiente, se renovó la araldita y se incubó a 65-70° durante 3 horas. Finalmente, se retiró el exceso, y se dejó polimerizar por completo en la estufa a 65-70° durante 3 días.

Mediante la utilización del ultramicrotomo se obtuvieron cortes semifinos (0.5-2 μm de grosor), que se montaron sobre portaobjetos para su examen al microscopio óptico, y cortes ultrafinos (30-70 nm de grosor), que se recogieron sobre rejillas metálicas para ser examinados con el microscopio electrónico de transmisión.

2.10. IMPLANTES ECTÓPICOS

Transcurrida la capacitación *in vitro* de las células procedentes de médula ósea de rata, se desarrollaron los experimentos *in vivo* de osteogénesis ectópica. Las células fueron implantadas en cámaras de MOD, que presentan mejores

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

propiedades osteoinductoras por la presencia de BMPs en sus paredes, que las cámaras de difusión. Son fragmentos de hueso cortical a las que se les ha eliminado su matriz inorgánica por la exposición prolongada al HCl. Las cámaras de MOD se prepararon a partir de las diáfisis de fémures de rata de la siguiente manera:

- Lavar con dH_2O con ayuda de una jeringuilla.
- Etanol 95° (x2, 15 min.) a 4 °C.
- Etanol 100° (x2, 15 min.) a 4 °C.
- Éter (x2, 15 min.), para eliminar el agua y desengrasar.
- Dejar evaporar el éter. En este punto se pueden almacenar a -20 °C.
- Ácido clorhídrico 0.6 N (100 ml/g) a 4 °C y en agitación, hasta que las diáfisis estén traslúcidas y flexibles (18 horas aproximadamente).
- Lavar con dH_2O durante 2 días a 4 °C y en agitación, con 3 cambios diarios, para eliminar los restos de ácido clorhídrico.
- Cortar según el tamaño deseado.
- Etanol 100° (x2, 10 min.) para esterilizar.
- Lavar con medio estéril (α-MEM o solución salina) para eliminar el etanol.
- Dejar secar bajo la campana o en un liofilizador.
- Armar con filtros 0.45 μm de poro.
- Guardar a 4 °C.

Para el estudio *in vivo* se implantaron las siguientes condiciones experimentales:

- 1.1. Células sometidas al MCO cultivadas en ausencia de factores de crecimiento.
- 1.2. Células sometidas al MCO tratadas con rhTGF-β1 durante 14 días más 2 días de osteoinducción con Dex y β-GP.
- 2.1. Células adherentes cultivadas en ausencia de factores de crecimiento.
- 2.2. Células adherentes tratadas con rhTGF-β1 durante 4 días más 2 días de osteoinducción con Dex, β-GP y ASC-2P.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- 3.1. Mezcla 1:1 de células de las condiciones 1.1. y 2.1.
- 3.2. Mezcla 1:1 de células de las condiciones 1.2. y 2.2.

El número de células a implantar fue de 1.5 x 10^6 por cámara de MOD, y los implantes se realizaron subcutáneamente en ratas hembras de 12 semanas de edad. Tras 2, 4 u 8 semanas de implante, el animal se sacrificó, recuperándose las cámaras para su análisis, que consistió en un estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico para microscopía óptica, que nos permitió identificar las características morfológicas y estructurales del tejido que se formó en el interior de las cámaras.

2.11. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Las micromasas y los implantes extraídos de los animales se fijaron por inmersión en Bouin, paraformaldehído 4% (PF 4%) y/o formalina neutra tamponada 10% (BNF 10%) (apéndice I.7.1.). Tras la fijación, las cámaras de MOD se descalcificaron con *Decalcifier*-II® en agitación, realizando cambios cada 24 horas. A continuación, las piezas fueron lavadas con abundante agua y se deshidrataron en pasos sucesivos de etanol de gradación creciente, aclaradas en tolueno y embebidas e incluidas en parafina (apéndice I.7.2). Posteriormente, se realizaron secciones transversales de 10 μm de grosor, que se montaron en portaobjetos polilisinados o silanizados, dependiendo del caso, y se dejaron secar a 37 °C (apéndice I.7.2.).

2.11.1. Histoquímica

Como tinción general, con objeto de observar las células y el tejido formado, se realizó el picrosirio-hematoxilina de Mayer. Mediante esta tinción se observa el cartílago de color rosado-violeta, el osteoide de color rosa-rojo y el hueso mineralizado de color rojo intenso.

Además, como tinciones específicas de la estructura ósea y cartilaginosa que queremos diferenciar, hemos utilizado:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- Azul alciano: este colorante se une a los restos ácido y sulfatados de los proteoglucanos que forman parte de la matriz cartilaginosa, de forma que el tejido cartilaginoso se tiñe de azul y el resto de los tejidos permanecen incoloros.
- Azul de toluidina: este colorante se une a los radicales sulfatos, muy abundantes en el tejido cartilaginoso, provocando metacromasia en la matriz cartilaginosa que se tiñe de morado, mientras que el hueso maduro y resto de tejidos aparecen de azul.
- Safranina-fast green: mediante el uso de estos dos colorantes, esta tinción permite diferenciar el cartílago del hueso, ya que la matriz cartilaginosa se tiñe de color anaranjado, mientras que el tejido óseo se observa de color verde.
- Tricrómico de Goldner: mediante el uso de hematoxilina férrica, fucsina de Ponceau, naranja G molibdato y azul metilo, esta tinción pone de manifiesto el componente celular, el osteoide y el hueso mineralizado, de tal forma que el osteoide se observa de color rojo mientras que el hueso mineralizado se tiñe de color azul.
- von Kossa: tinción para calcio que pone de manifiesto las áreas mineralizadas no descalcificadas, que se tiñen de marrón oscuro. Los núcleos de las células se tiñen de rojo mediante una tinción de contraste con rojo nuclear.

Los protocolos de cada una de las tinciones se detallan en el apéndice I.7.4.

2.11.2. Inmunohistoquímica

Para comprobar la formación de tejido óseo y cartilaginoso, se realizó inmunotinción con los anticuerpos policlonales anti-colágeno tipo I y tipo II, principales componentes orgánicos del hueso y el cartílago, respectivamente.

Tras desparafinar el tejido con xileno e hidratar las muestras (en soluciones de etanol de gradación decreciente, hasta llegar a agua destilada), se procedió a la digestión con papaína al 0.5% en tampón PB 0.02 M pH 4.7 a 37 °C durante 30 minutos, para eliminar los proteoglucanos de la matriz cartilaginosa que

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

bloquean los sitios de unión del colágeno. Posteriormente, se realizó la inactivación de la peroxidada endógena incubando durante 30 minutos en una solución de perhidrol al 3% y metanol al 10% en tampón TRIS-PBS pH 7.8 (apéndice I.7.5.).

Tras lavar en tampón TRIS-PBS pH 7.8, las muestras se sometieron a la siguiente serie de pasos sucesivos de incubación en anticuerpos:

- Incubación en el primer anticuerpo, policlonal de conejo, anti-colágeno tipo I o tipo II, dilución 1:50 y 1:100 en solución bloqueadora de las uniones inespecíficas (apéndice I.7.5), respectivamente, durante 18 horas.

- Incubación en el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo dilución 1:50 en solución bloqueadora de las uniones inespecíficas, durante 1 hora.

- Incubación en el reactivo PAP de conejo dilución 1:200 en tampón TRIS-PBS pH 7.8, durante 45 minutos.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Entre cada paso de incubación se efectuaron tres lavados de 5 minutos cada uno en tampón TRIS-PBS pH 7.8.

Después, se reveló la actividad peroxidada con una solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0.05% y perhidrol al 0.2% en tampón TRIS-PBS pH 7.8 durante 10 minutos en oscuridad.

Tras lavar con abundante agua corriente, se pasaron a agua destilada, se deshidrataron con etanol de gradación creciente y se aclararon en xileno. Por último, las muestras fueron montadas en portas con cubreobjetos y Entellan.

En el caso de que la técnica fuera inmunofluorescencia, tras la incubación de 1 hora con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo conjugado con Cy3 dilución 1:200, se procedió al montaje y observación en el microscopio de epifluorescencia.

Como control negativo se realizó incubación de las muestras en solución diluyente sin primer anticuerpo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.12. ENSAYO DE BIOSEGURIDAD

Para probar que las células implantadas en las cámaras de MOD no colonizaban órganos como hígado, bazo o pulmones ni formaban tumores en los mismos, se decidió hacer un ensayo de bioseguridad utilizando la bioluminiscencia no invasina (BLI) con la colaboración del grupo liderado por el Dr. Jerónimo Blanco, del Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC) de Barcelona.

2.12.1. Metodología

Las células, a una densidad de 3.3 x 10^4 células/ml y al 70% de semiconfluencia, son marcadas utilizando 15 μg de un vector lentiviral, Plox-Pluc, que contiene un promotor para el gen de la luciferasa de *Photinus Pyralis* (PLuc). A las 48 horas del marcaje, el cultivo se somete a una selección por citometría de flujo para identificar y rescatar las células marcadas, las cuales serán implantadas en las cámaras de MOD subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (ratones SCID cepa CB17/ICR-Prkdc$^{scid/Crl}$). El crecimiento celular se monitoriza a través de una reacción catalizada por la PLuc en la que se liberan fotones. Para que la reacción tenga lugar hay que administrar previamente el sustrato de la reacción, la luciferina, a los animales. Para realizar la BLI, se siguió el siguiente protocolo:

- Anestesiar los animales, mediante una inyección intraperitoneal, con 100 mg/kg de ketamina (Merial) y 3.3 mg/kg de xilacina (Henri Schein).
- Inocular 50 μl de luciferina (Promega) a 16.7 mg/ml en PBS pH 7.3 mediante inyección intraperitoneal o local en el interior de la cámara de MOD.
- Realizar una imagen de campo claro con una fuente de iluminación interna de la cámara de detección al 3% durante 125 milisegundos con un *binning* de 1 x 1, inmediatamente después de la inoculación de luciferina.
- Con el animal en la misma posición, tomar una imagen durante 5 minutos en oscuridad total con un *binning* de 8 x 8.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- Se realizaron imágenes los días 15, 30, 45 y 65 post-implantación de las cámaras.

Para tomar las imágenes, los animales se situaron a una distancia de 247 mm del objetivo de la cámara (HFP-Scheneider Xenon 0.95/25 mm) de detección del sistema de imagen de alta eficiencia ORCA-2BT (Hammatsu Photonics, Hamamatsu City, Japón). El diafragma del objetivo de la cámara se colocó en la posición de máxima apertura. Dicho sistema de imagen está dotado con una cámara C4742-98-LWG-MOD que lleva conectado un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) que guarda 230000 electrones/píxel y se encuentra a una temperatura de -80 °C cuando la cámara está en funcionamiento para reducir el ruido de fondo. El CCD responde a la luz de longitudes de onda entre los 300 y los 900 nm con un rendimiento del 90% para longitudes de onda entre los 500 y los 700 nm.

Para aumentar la sensibilidad de la detección, el ruido de la señal detectada se redujo registrando los eventos lumínicos en *arrays* de 8 x 8 píxeles adyacentes (*binning* 8 x 8).

2.12.1.1. Imágenes adquiridas

Se dan importantes diferencias entre los datos guardados en la memoria de imagen (para cada píxel) del CCD y la manera en la cual estos datos son representados por el ordenador en pantalla (en forma de imágenes). Mientras la memoria de imagen puede guardar 65535 niveles de eventos lumínicos correspondientes al número de eventos lumínicos captados por el CCD, las imágenes del ordenador sólo pueden mostrar 256 niveles (de gris a color) por cada píxel. Es por ello que las imágenes correspondientes a imágenes que en memoria contienen más eventos lumínicos que los niveles disponibles por el ordenador, no pueden ser representadas con exactitud. Así hay que hacer una elección entre mostrar los niveles de baja intensidad (y mostrar los de alta intensidad saturados) o mostrar diferentes niveles de alta intensidad (y no

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

mostrar los de baja intensidad). Para las imágenes de esta tesis se decidió representar con exactitud los niveles de baja intensidad para poder detectar si había o no señal, de esta manera a partir de un cierto número de células, es decir a partir de un cierto número de eventos lumínicos, las imágenes aparecen saturadas.

2.13. TRATAMIENTO DE DATOS

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos se analizaron según el caso mediante test estadísticos utilizando el programa informático Sigmastat® 2.03 (SPSS, Inc.), que incluye:

- Test t de Student.
- Análisis de la varianza para una o dos variables (ANOVA de una o dos vías) seguido del test *post hoc* de Bonferroni o Dunn según correspondiera.

Los grados de significación se establecieron en $p<0.05$, $p<0.01$ y $p<0.001$.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

APÉNDICE I: PROTOCOLOS Y RECETAS

1. Soluciones tampón de uso general

Tampón fosfato (PB) 0.2 M, pH 7.3

Componente mayoritario	
$Na_2HPO_4.2H_2O$	26.7 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Componente minoritario	
$NaH_2PO_4.H_2O$	6.9 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Mezclar los componentes hasta obtener el pH 7.3 y almacenar a 4 °C.

Tampón PB 0.02 M, pH 4.7

Componente mayoritario	
$NaH_2PO_4.H_2O$	0.69 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Componente minoritario	
$Na_2HPO_4.2H_2O$	2.67 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Mezclar los componentes hasta obtener el pH 4.7 y almacenar a 4°C.

Tampón fosfato salino (PBS) 0.01 M, pH 7.3

Na_2HPO_4 ($2H_2O$)	1.9 g
KH_2PO_4	0.43 g
NaCl	7.22 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Ajustar el pH a 7.3 y almacenar a 4 °C.

Tampón PBT 0.01 M, pH 7.3

BSA (albúmina sérica bovina)	1%
Triton® X-100	0.2%

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

PBS 0.01 M, pH 7.3	Hasta 1 L

Tampón TRIS-PBS 0.01 M, pH 7.8

Na_2HPO_4 ($2H_2O$) (177.99 M.W)	1.48 g
KH_2PO_4 (136 M.W)	0.48 g
NaCl	7 g
TRIS (*Hydroxymethyl-aminomethan*)	5 g
NaN_3	0.2 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Ajustar el pH a 7.3 y almacenar a 4 °C.

2. Medios de cultivos

Medio de cultivo DMEM-F12 10% FBS

DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*) pH 7.3 suplementado con:

FBS (*Fetal bovine serum*)	10%
L-Glutamina	1.25%
Penicilina/estreptomicina	1%
Anfotericina B	0.5%

Medio de cultivo para el período de selección

DMEM-F12 suplementado con:

FBS	0.5%
L-Glutamina	1.25%
Penicilina/estreptomicina	1%
Anfotericina B	0.5%
rhTGF-β1	0.5 ng/ml

Medio de cultivo para el período de amplificación

DMEM-F12 10% FBS suplementado con:

rhTGF-β1	0.5 ng/ml

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Medio de cultivo para el período de inducción

DMEM-F12 10% FBS suplementado con:

Dexametasona	10^{-8} M
β-Glicerolfosfato	2 mM

Medio de cultivo osteogénico

DMEM-F12 10% FBS suplementado con:

Dexametasona	10^{-8} M
β-Glicerolfosfato	2 mM
Ascorbato-2-fosfato	50 μM

Medio de cultivo condrogénico

DMEM-HG (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose*) suplementado con:

Penicilina/estreptomicina	1%
Anfotericina B	0.5%
Sodio piruvato	1 mM
Dexametasona	10^{-7} M
ITS+ Universal Culture Supplement Premix	1%
Ascorbato-2-fosfato (3.43 mg/ml en sales de Tyrode)	1%
MEM NEAA	1%
rhTGF-β1	10 ng/ml

Medio de cultivo adipogénico

DMEM suplementado con:

FBS	1%
L-Glutamina	1.25%
Penicilina/estreptomicina	1%
Anfotericina B	0.5%
Dexametasona	10^{-7} M
Insulina	10^{-9} M

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Medio para la diferenciación endotelial, neuroectodérmica y endodérmica

DMEM-F12 suplementado con:

L-Glutamina	1.25%
Penicilina/estreptomicina	1%
Anfotericina B	0.5%
ITS+ Universal Culture Supplement Premix	1%
Ascorbato-2-fosfato	10^{-4} M
BSA	0.05%

Tampón FACS

Leibovitz's L-15, suplementado con:

BSA	0.2%
Penicilina/estreptomicina	1%
HEPES	1%
Agua bidestilada	10%

3. Preparación del gradiente de densidad

La separación de la fracción mononuclear presente en el aspirado de médula ósea se realizó mediante un gradiente de percoll.

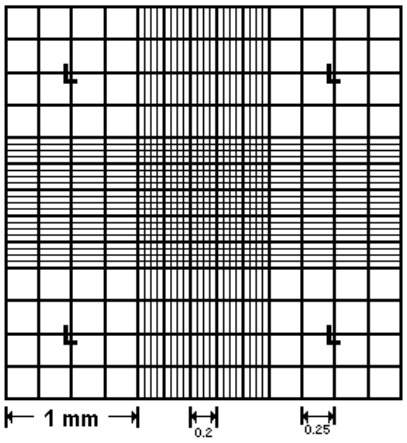
Para preparar el gradiente de densidad, tubos Beckman de 26.3 ml, conteniendo 21 ml de una mezcla formada por 13.23 ml de percoll, 1.47 ml de NaCl 1.5 M y 6.3 ml de solución Tyrode, fueron centrifugados a 20000 g (13900 rpm) durante 15 minutos a 18 °C. Los tubos se almacenaron a 4 °C hasta ser utilizados.

4. Recuento y viabilidad celular

El recuento y cálculo de la viabilidad celular se realizó para poder sembrar el número de células deseado en cada experimento. Para ello se tomaba una alícuota de suspensión celular, se mezclaba con azul trípano en una relación 1:1,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1:2 ó 1:4, según la densidad celular, y se llenaban las dos cámaras de recuento de un hemocitómetro, cuya retícula tiene el siguiente aspecto:



Se contaba el número de células, por cada cuadrícula de 1 mm^2 marcadas con L, en ambas cámaras, se realizaba la media del número de células por cuadrícula. Teniendo en cuenta que el volumen de suspensión celular que cabe en cada cuadrícula es de 0.1 mm^3 (10^{-4} cm^3), para obtener la densidad celular en células/ml se aplicaba la siguiente fórmula:

media x factor de dilución x 10^4

El número total de células se calculaba multiplicando el dato anterior por el volumen total de la suspensión celular.

5. Soluciones para microscopía electrónica

Solución fijadora de glutaraldehído al 3.5%

Glutaraldehído	1.4 ml
Tampón PB 0.2 M	5 ml
Agua destilada	3.6 ml

Solución de araldita

Componente AM	10 ml
Componente B	10 ml
Mezclar con fuerte agitación	
Componente C	0.4 ml

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Mezclar con fuerte agitación

Componente D 0.4 ml

Mezclar con fuerte agitación y dejar reposar durante 1 hora a temperatura ambiente.

6. Técnica de inmunofluorescencia en cultivos celulares

Los cultivos celulares se fijaron con paraformaldehído 4% (apéndice I.7.1.1.) durante 4 minutos a temperatura ambiente, seguido de metanol durante 2 minutos a -20 °C. Para los ligandos nucleares, las células se permeabilizaron con Triton® X-100 incorporado en el tampón PBT pH 7.3 (apéndice I.1.) durante 10 minutos. Posteriormente, se incubaron en el correspondiente anticuerpo primario característico de endotelio (CD31, Flk-1 y vWF), neuroectodermo (βIII-tubulina, NF-200 y GFAP) o endodermo (albúmina, CK-18 y HNF-1), diluido en PBS o PBT pH 7.3, durante 4 horas.

	Casa Comercial	Clon	Isotipo	Flurocromo	Dilución
CD31	BD Pharmingen	WM59	IgG1, κ, monoclonal de ratón	FITC	1:10
Flk-1	Santa Cruz Biotechnology	A-3	IgG1, monoclonal de ratón	FITC	1:10
vWF	Santa Cruz Biotechnology	F8/86	IgG1, monoclonal de ratón	-	1:50
βIII-tubulina	BD Pharmingen	5G8	IgG1, monoclonal de ratón	-	1:5000
NF-200	Sigma	N52	IgG1, monoclonal de ratón	-	1:400
GFAP	Sigma	G-A-5	IgG1, monoclonal de ratón	-	1:1000
Albúmina	Sigma	HSA-11	IgG2a, monoclonal de ratón	-	1:100
CK-18	Sigma	CY-90	IgG1, monoclonal de ratón	-	1:300
HNF-1	Santa Cruz Biotechnology	H-205	IgG, policlonal de conejo	-	1:50

A continuación, se incubó en el segundo anticuerpo, anti-IgG de ratón o conejo conjugado con FITC o Cy3, dilución 1:200 en PBS pH 7.3, durante 1 hora.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Todas las incubaciones se realizaron a 4 °C, y entre cada paso se efectuaron tres lavados de 5 minutos cada uno en tampón PBS o PBT pH 7.3. Finalmente, los cultivos fueron examinados en el microscopio de epifluorescencia invertido.

7. Procesamiento histológico

7.1. Fijación

7.1.1. Soluciones fijadoras

Solución fijadora de Bouin

Ácido pícrico en solución acuosa	750 ml
Formaldehído 37-40%	250 ml
Ácido acético glacial 100%	50 ml

La solución de ácido pícrico se realiza con 13 g de ácido pícrico por litro de agua destilada, agitando intensamente durante varias horas. Finalmente se filtra la solución.

Solución fijadora de paraformaldehído al 4% (PF 4%)

Paraformaldehído	4 g
Tampón PB 0.2 M, pH 7.3	50 ml
Agua destilada	Hasta 100 ml

Solución fijadora de formalina neutra tamponada al 10% (BNF 10%)

Formaldehído 37-40%	100 ml
$NaH_2PO_4.H_2O$	4 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	6.5 g
Agua destilada	Hasta 1 L

7.1.2. Procedimiento de fijación

Las cámaras de MOD se fijaron por inmersión durante 24h a temperatura ambiente cuando el fijador era Bouin o BNF 10%, ó 2h a temperatura ambiente seguido de 24h a 4 °C si el fijador era PF 4%. En ambos casos la fijación fue en agitación.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

7.2. Inclusión, corte y montaje

En la inclusión de parafina, la duración de los pasos seguidos se refleja a continuación:

- Etanol 70°, 80°, 96° (x2) y 100° (x3)	1 h en cada paso
- Tolueno (x2)	20 min
- Parafina I	4-6 h
- Parafina II	4-6 h
- Parafina III	18-24 h

Después se procede a la realización del bloque y se deja polimerizar la parafina a temperatura ambiente.

Las cámaras de MOD se orientaron de forma que las paredes quedaran en la periferia del corte.

Tras la inclusión en parafina el tejido fue cortado en un microtomo en secciones de 10 μm. Posteriormente, las secciones destinadas a técnicas histoquímicas se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina, mientras que las destinadas a técnicas inmunohistoquímicas se montaron en portaobjetos silanizados.

Polilisinado de portaobjetos

Los portaobjetos limpios y desengrasados se colocaron en cestillas y cubetas de plástico que contenían una solución de poli-L-lisina 0.01% durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se dejaron secar a 60 °C durante 1 hora o a 37 °C durante 18-24 horas.

Silanizado de portaobjetos

Los portaobjetos limpios y desengrasados se colocaron en cestillas de metal y cubetas de cristal que contenían una solución al 2% de silano (3-aminopropiltrietoxisilano) en acetona durante 2 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, éstos se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a 60 °C durante 1 hora o a 37 °C durante 18-24 horas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

7.3. Procesamiento de las secciones

Los procesos de desparafinado/hidratación y deshidratación/aclarado de las secciones, que se detallan a continuación, son comunes para todas las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas llevadas a cabo en este trabajo.

	Xileno	2 x 10 min	
	Alcohol 100°	10 min	
	Alcohol 100°	10 min	
Desparafinado/Hidratación ↓	Alcohol 96°	5 min	↑ Deshidratación/Aclarado
	Alcohol 70°	5 min	
	Agua destilada	5 min	

7.4. Técnicas histoquímicas

Tinción con azul alciano-hematoxilina de Mayer (AB-H)

- Se desparafina e hidrata
- Ácido acético 3% 3 min
- Azul alciano 1 hora
- Lavar en agua corriente 10 min
- Lavar en agua destilada 5 min
- Hematoxilina de Mayer 1.5 min
- Lavar en agua destilada, deshidratar y montar en Entellan

Preparación del colorante azul alciano: disolver 1 g de azul alciano 8GX en 100 ml de solución de ácido acético glacial al 3%. Ajustar el pH a 2.5 usando un tampón de fosfato sódico ($Na_2HPO_4.12H_2O$, 7.16 g/100 ml).

Tinción con azul de toluidina (AT)

- Se desparafina e hidrata
- Azul de toluidina 10 min
- Lavar en agua destilada, deshidratar y montar en Entellan

Preparación del colorante azul de toluidina: disolver 1 g de colorante azul de toluidina, junto con 1 g de tetraborato sódico, en 100 ml de agua destilada.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tinción con picrosirio-hematoxilina de Mayer (PSH)

- Se desparafina e hidrata
- Picrosirio 1 hora
- Lavar en agua corriente 10 min
- Lavar en agua destilada 5 min
- Hematoxilina de Mayer 1.5 min
- Lavar en agua destilada, deshidratar y montar en Entellan

Preparación del colorante picrosirio: solución de Direct Red 80 al 0.2% en ácido pícrico saturado.

Tinción con safranina-fast green (SFG)

- Se desparafina e hidrata
- Safranina 10 min
- Lavar en agua destilada 5 min
- Fast green 1 min
- Lavar en etanol 95° 5 min
- Deshidratar y montar en Entellan

Preparación de los colorantes:

Safranina

Safranina O	1 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

Fast green

Solución stock

Fast green	10 g
Ácido acético	2 ml
Agua destilada	Hasta 100 ml

Solución de trabajo

Solución stock	10 ml
Agua destilada	90 ml

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tinción con tricrómico de Goldner (TG)

- Se desparafina e hidrata	
- Hematoxilina férrica	20 min
- Lavar en agua corriente	5 min
- Diferenciar en alcohol acético (etanol 96° + 3 gotas de ác. acético)	1 min
- Lavar en agua destilada	5 min
- Fucsina de Ponceau	45 min
- Lavar en agua corriente	5 min
- Inmersión en ácido acético 1%	
- Naranja G molibdato	13 min
- Lavar en agua corriente	5 min
- Inmersión en ácido acético 1%	
- Azul metilo	5 min
- Lavar en agua corriente	5 min
- Inmersión en ácido acético 1%	
- Lavar en agua destilada, deshidratar y montar en Entellan	

Preparación de los colorantes:

Hematoxilina férrica

Solución A

Hematoxilina	1 g
Etanol 95°	100 ml

Solución B

$AlCl_3 6H_2O$	10 g
Sulfato ferroso hidratado	10 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

Combinar las soluciones A y B, agitando bien.

Añadir 2 ml de ácido clorhídrico.

Añadir 2 ml de yodato sódico al 9%, y dejar reposar durante 48 horas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Fucsina de Ponceau

Fucsina ácida	0.1 g
Ponceau S	0.4 g
Agua destilada	Hasta 200 ml

Disolver a temperatura ambiente y añadir 0.4 ml de ácido acético glacial.

Naranja G molibdato

Naranja G	2 g
Ácido molibdatofosfórico hidratado	4 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

Azul metilo

Azul metilo	2 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

Disolver a temperatura ambiente y añadir 2 ml de ácido acético glacial.

Tinción con von Kossa (VK))

- Se desparafina e hidrata	
- Nitrato de plata 5% expuesto a la luz de una bombilla de 100 W	1 h
- Lavar en agua destilada	5 min
- Solución de tiosulfato sódico 5%	2 min
- Lavar en agua destilada	5 min
- Contrastar los núcleos con rojo nuclear 0.1%	5 min
- Lavar en agua destilada, deshidratar y montar en Entellan	

Preparación del colorante rojo nuclear: disolver 1 g de colorante rojo nuclear en 100 ml de sulfato de aluminio al 5%.

7.5. Soluciones específicas de las técnicas inmunohistoquímicas

Solución desactivadora de la peroxidasa endógena

Metanol	10%
Peróxido de hidrógeno al 30%	3%
TRIS-PBS, pH 7.8	87%

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Solución bloqueadora de las uniones inespecíficas

BSA	1%
Triton® X-100	0.5%
Azida de Sodio (NaN_3)	0.1%
Suero normal de oveja	5%
TRIS-PBS, pH 7.8	93.4%

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

APÉNDICE II: PRODUCTOS Y EQUIPOS EMPLEADOS

1. Productos generales

Acetona (CH_3COCH_3) (141007; Panreac)

Ácido acético glacial (CH_3COOH) (141008; Panreac)

Ácido clorhídrico (HCl) (131019; Panreac)

Albúmina de suero bovino (BSA) (A-7906; Sigma)

Azida sódica (NaN_3) (162712; Panreac)

Bicarbonato sódico ($NaHCO_3$) (6329; Merck)

Cloruro potásico (KCl) (131494; Panreac)

Cloruro sódico (NaCl) (131659; Panreac)

Diborato sódico (Bórax) ($Na_2B_4O_7$) (143052; Panreac)

Dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4) (4873; Merck)

Dihidrogenofosfato de sodio monohidrato ($NaH_2PO_4.H_2O$) (6586; Merck)

Etanol absoluto (C_2H_5OH) (212801; Panreac)

Etanol 96° (212800; Panreac)

Éter dietílico anestésico ($C_2H_5OC_2H_5$) (192770; Panreac)

Hidrogenofosfato de dipotasio (K_2HPO_4) (121512; Panreac)

Hidrogenofosfato de disodio dihidrato ($Na_2HPO_4.2H_20$) (6580; Merck)

Hidróxido sódico (NaOH) (141687; Panreac)

Metanol (CH_3OH) (141091; Panreac)

Tolueno (C_7H_8) (141745; Panreac)

Tris (hidroximetil)-aminometano (TRIS) ($C_4H_{11}NO_3$) (8382; Merck)

Xileno (C_8H_{10}) (141769; Panreac)

2. Productos para cultivos celulares

Agua destilada estéril (W-3500; Sigma)

Alcohol isopropílico (C_3H_8O) (I-0398; Sigma)

Anfotericina B (A-2942; Sigma)

Ascorbato-2-fosfato (A-8960; Sigma)

Azul trípano (T-8154; Sigma)

Bicarbonato sódico ($NaHCO_3$) (S-5761; Sigma)

Colagenasa tipo I (17100-017; Gibco)

Colágeno tipo I de tendón de cola de rata (354236; BD Biosciences)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Dexametasona (D-8893; Sigma)

Dimetil sulfóxido (DMSO) (C_2H_6OS) (D-2650; Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (D-6546; Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM-HG) (D-5648; Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12) (D-6421 y D-8900; Sigma)

Filtros 0.22 μm, Millex-GP50 (SLGPB5010; Millipore)

Filtros de jeringa celulosa-acetato, 0.2 μm (190-2520; Nalgene)

Frascos de cultivo 75 cm^3, tapón con filtro de 0.2 μm (Nunc™)

β-Glicerolfosfato (G-9891; Sigma)

Hanks Balanced Salt Solution (H-9394; Sigma)

Hemocitómetro (717815; Brand)

Insulina (I-0516; Sigma)

ITS+ Universal Culture Supplement Premix (354352; BD Biosciences)

Jeringas estériles de 10 ml (Icogamma)

Jeringas de insulina de 2 y 5 ml (Icogamma)

L-Glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) (G-1517; Sigma)

MEM Non Essential Amino Acids (MEM NEAA) (11140; Gibco)

PBS (D-1408; Sigma)

Penicilina/estreptomicina (P-0781; Sigma)

Percoll (P-4937; Sigma)

Pipetas Pasteur (Normax)

Pipetas serológicas estériles de 5, 10, 25 ml y 50 ml (VWR International)

Placas de cultivo de 6, 24, 48 y 96 pocillos (Nunc™)

Placas de Petri estériles de 35 y 90 mm de diámetro (Nunc™)

Puntas de micropipeta estériles con filtro 0.5-10 μl, 5-30 μl, 5-200 μl y 100-1000 μl, Sorenson (BioScience, Inc.)

Recombinante humano BMP-2 (355-BM-010; R&D Systems)

Recombinante humano TGF-β1 (240-B-002; R&D Systems)

Sales de Tyrode (T-2145; Sigma)

Sodio piruvato (11360; Gibco)

Suero fetal bovino (F-7524; Sigma)

Tripsina-EDTA (T-3924; Sigma)

Tubos criogénicos 1 ml (377224; Nunc™)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tubos eppendorf 0.5 ml y 1 ml

Tubos falcon de 5 ml de polipropileno de 12 x 75 mm (352058; BD Biosciences)

Tubos falcon de 15 y 50 ml (Sterilin)

3. Productos para analizar la expresión de fosfatasa alcalina y el contenido de ADN

Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (M-8266; Sigma)

ADN de timo de ternera (D-3664; Sigma)

Glicina ($C_2H_5NO_2$) (131340; Panreac)

Hoechst 33258 (bisbenzimida) (B-2883; Sigma)

Naftol AS-MX fosfato (855; Sigma)

p-nitrofenil fosfato en tabletas de 5 mg (S-0942; Sigma)

Sales de Fast violet B(851; Sigma)

Solución de citrato concentrado (85-4C; Sigma)

Solución estándar de p-nitrofenol (N-7660; Sigma)

4. Productos para inmunofluorescencia

Anti-albúmina (A-6684; Sigma)

Anti- neurofilamento (NF)-200, clone N52 (N-0142; Sigma)

Anti-CD31 (555445; BD Pharmingen™)

Anti-Citoqueratina (CK)-18 (C-8541; Sigma)

Anti-factor de von Willebrand (sc-53466; Santa Cruz Biotechnology)

Anti-Flk-1 (sc-6251; Santa Cruz Biotechnology)

Anti-GFAP (sc-65343; Santa Cruz Biotechnology)

Anti-HNF-1 (sc-8986; Santa Cruz Biotechnology)

Anti-IgG de conejo conjugado con Cy3 (111-165-003; Jackson ImmunoResearch)

Anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 (315-165-003; Jackson ImmunoResearch)

Anti-IgG de ratón conjugado con FITC (315-095-003; Jackson ImmunoResearch)

Anti-βIII-tubulina (G7121; Promega)

bFGF (233-FB; R&D)

FGF-4 (235-F4; R&D)

Fibronectina humana (354008; BD™)

HGF (294-HG; R&D)

Matrigel (E-1270; Sigma)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

VEGF-B (751-VE; R&D)

5. Productos para citometría de flujo

7-amino-actinomicina D (7-AAD) (559925; BD Pharmingen™)

Anti-CD105 (FAB10971F; R&D)

Anti-CD106 (551146; BD Pharmingen™)

Anti-CD13 (557454; BD Pharmingen™)

Anti-CD133 (130-090-422; Miltenyi Biotec)

Anti-CD146 (550315; BD Pharmingen™)

Anti-CD166 (MCA1926F; AbD serotec)

Anti-CD271 (130-091-885; Miltenyi Biotec)

Anti-CD29 (FAB17781P; R&D)

Anti-CD31 (555445; BD Pharmingen™)

Anti-CD34 (130-081-001; Miltenyi Biotec)

Anti-CD44 (559942; BD Pharmingen™)

Anti-CD45 (130-091-230; Miltenyi Biotec)

Anti-CD49a (559596; BD Pharmingen™)

Anti-CD49b (555669; BD Pharmingen™)

Anti-CD73 (550257; BD Pharmingen™)

Anti-CD90 (FAB2067A; R&D)

Anti-Flk-1 (sc-6251; Santa Cruz Biotechnology)

Anti-fosfatasa alcalina humana/ de ratón/ de rata (FAB1448A; R&D)

Anti-HLA-ABC humano (555552; BD Pharmingen™)

Anti-HLA-DR humano (555812; BD Pharmingen™)

Anti-IgG de ratón (A21037; Invitrogen)

Anti-IgM de ratón (STAR86PE; AbD serotec)

Anti-STRO-1 humano (MAB1038; R&D)

EDTA (E-5134; Sigma)

HEPES 1M (15630049; Gibco)

Ioduro de propidio (537059; Calbiochem)

Leibovitz's L-15 (21083-027; Gibco)

Triton X-100 (T-6878; Sigma)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

6. Productos para microscopia electrónica

Acetato de uranilo (73943; Fluka)

Agar (A1296; Sigma)

Araldita Durcupan™ ACM (44610; Fluka)

- Componente AM (44611; Fluka)
- Componente B (44612; Fluka)
- Componente C (44613; Fluka)
- Componente D (44614; Fluka)

Glutaraldehído (16210; Electrón Microscopy Sciences)

7. Productos para histología e inmunocitoquímica

Ácido molibdatofosfórico hidrato (00532; Merck)

Ácido pícrico ($(O_2N)_3C_6H_2OH$) (131048; Panreac)

Albúmina de suero bovino (BSA) (A-7906; Sigma)

Anti-colágeno tipo I de conejo (234167; Calbiochem)

Anti-colágeno tipo II de conejo (234187; Calbiochem)

Anti-IgG de conejo (R-2004; Sigma)

Anti-IgG de conejo conjugado con Cy3 (111-165-003; Jackson ImmunoResearch)

Azida sódica (NaN_3) (162712; Panreac)

Azul alciano 8 GX (A-5268; Sigma)

Azul de metileno (121170; Panreac)

Azul de toluidina O (89640; Fluka)

Bouin (254102; Panreac)

Butanol (141082; Panreac)

Carbonato de lítio (141391; Panreac)

Cloruro de aluminio hexa-hidrato ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) (141097; Panreac)

Cubreobjetos (Menzel-Glaser)

Decalcifier II® (00460; Surgipath)

3,3'Diaminobenzidina (DAB) (D-5637; Sigma)

Diborato sódico (Bórax) ($Na_2B_4O_7$) (143052; Panreac)

Direct Red 80 ($C_{45}H_{26}N_{10}Na_6O_{21}S_6$) (43665; Fluka)

Entellan (7961; Merck)

Fast green FCF (F-7252; Sigma)

Formaldehído 37-40% p/v (HCHO) (211328; Panreac)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Fucsina ácida ($C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$) (251331; Panreac)

Hematoxilina ($C_{16}H_{14}O_6$) (4305; Merck)

Hematoxilina de Mayer (9249; Merck)

Histosec® (11609; Merck)

Metanol (CH_3OH) (141091; Panreac)

Nitrato de plata ($AgNO_3$) (131459; Panreac)

Nuclear Fast Red ($C_{14}H_9NO_7S$) (N-8002; Sigma)

Orange G ($C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$) (O-7252; Sigma)

PAP pen (Z377821; Sigma)

Papaína (7147; Merck)

Paraformaldehído (4005 Merck)

Perhidrol 30% (H_20_2) (7210; Merck)

Peroxidasa-anti-peroxidasa de conejo (PAP de conejo) (Z0113; Dako)

Poli-L-lisina (P-8920; Sigma)

Ponceau S ($C_{22}H_{12}N_4Na_4O_{13}S_4$) (253983; Panreac)

Portaobjetos (Menzel-Glaser)

Safranina O (S-8884; Sigma)

Sulfato de magnesio hepta-hidrato ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (05886; Merck)

Sulfato ferroso hepta-hidrato ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (141362; Panreac)

Tiosulfato sódico ($Na_2S_2O_3$) (06512; Merck)

Tritón X-100 (t-octylphenoxypoly-ethoxyethanol) (X-100; Sigma)

Urea ($CO(NH_2)_2$) (8487; Merck)

Xileno (C_8H_{10}) (141769; Panreac)

Yodato sódico ($NaIO_3$) (142338; Panreac)

8. Equipos empleados

Agitador horizontal, ProMax 1020, Heidolph

Agitador magnético múltiple, A-013, SBS

Agitador magnético múltiple, A-04, SBS

Agitador orbital, Heidolph

Agitador vórtex, Reax 2000, Heidolph

Autoclave, Presoclave 75, Selecta

Balanza de precisión, ER 120 A, AND

Balanza de precisión, Mettler AM 100, German Weber S.A.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Baño termostático, Memmert

Bomba de succión, D-25 V, DINKO

Cabina de flujo laminar, AV-30/70, Telstar

Centrífuga, MC-15, Cobos precision, S.L.

Centrífuga, Universal 320 R, Hettich

Centrífuga de rotor basculante, Rotofix 32, Hettich

Citómetro de flujo *MoFlo*® SP1338, DakoCitomation

Espectrofotómetro, UV-1603, Shimadzu

Estufa, Digitronic, Selecta

Estufa para desecación y esterilización por convección natural, Conterm 2000 210, Selecta

Fluorímetro para placas BIO-TEK, FL600

Fotomicroscopio, Microphot FXA, Nikon

Horno microondas, LG

Incubador de gasificación para cultivo de células y tejidos, BB6220, Heraeus Serie 6000

Lámpara de luz ultravioleta, 312 nm, UVIlite, LF 206 LM, UVItec

Lector de placas de ELISA, mod. ELx8OO, Bio-Tek instruments, Vennont, USA

Microcentrífuga, 110, Sigma

Micropipetas Eppendorf, Biohit Proline y Boeco

Micropipetas multicanal, Biohit Proline

Microscópio óptico convencional, Labophot2, Nikon

Microscopio óptico invertido, Leica DMIL, Leica microsystems

Microscopio óptico invertido, TMS-F, Nikon

Microtomo, Micron HM 340, Heidelberg

pHmetro, micropH 2000, Crison

Procesador automático de tejidos, Leica TP 1020, Leica microsystems

Propipeta electrónica, Pipetboy acu, Integra Biosciences

Sonicador ultrasónico, Vibra-Cell™, Sonic and Materials Inc.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.1. CULTIVOS ADHERENTES DE MÉDULA ÓSEA

Los cultivos primarios de MSCs procedentes de médula ósea humana o de rata se muestran, atendiendo a su morfología, generalmente homogéneos, con forma estrellada, irregulares, cuando se observan en el microscopio de contraste de fase. Tras 10 días de cultivo, las células adquirieron un gran citoplasma aplanado muy extendido, con un núcleo oval con prominentes nucleolos. Como se muestra en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión, estas células poseen núcleos profundamente invaginados, el retículo endoplasmático bien organizado y gran cantidad de estructuras filamentosas (**Figura 3.1.1.).**

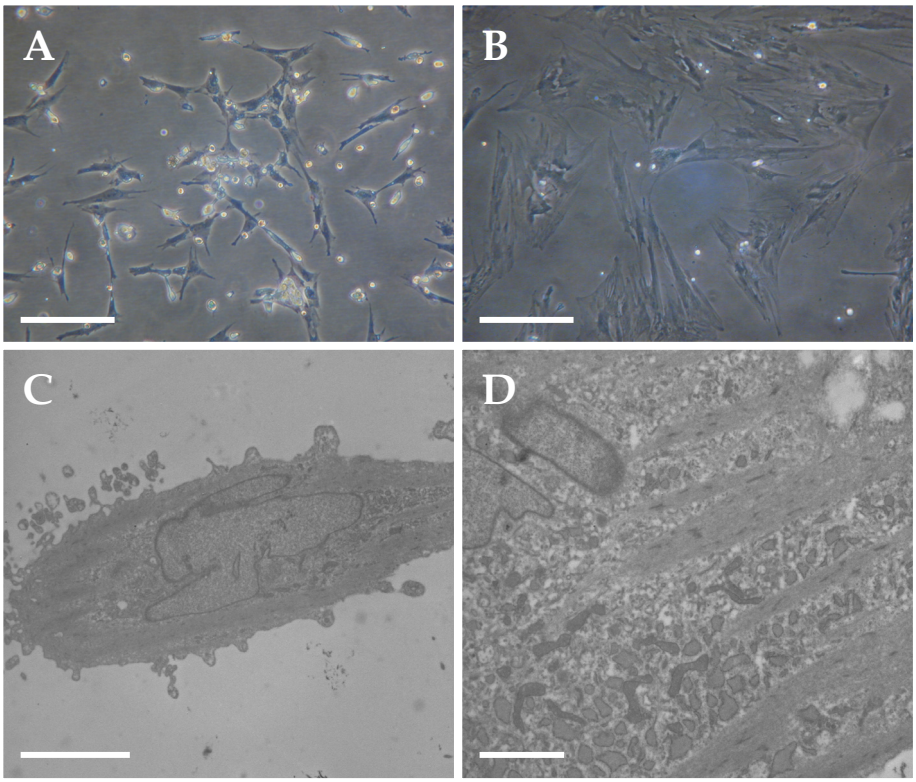


Figura 3.1.1. Cultivo primario de MSCs. (A-B) Micrografías obtenidas por microscopía de contraste de fase tras 2 y 10 días de cultivo, respectivamente. (B-C) Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión a los 10 días de cultivo. Barra: 200 µm en (A-B), 6 µm en (C) y 2 µm en (D).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El análisis citométrico del estado del ciclo celular de estos cultivos primarios, muestra una distribución propia de células en activa proliferación, 21.7 ± 4.9% en G_0/G1, 73.2 ± 5.5% en S y 5.2 ± 0.6% en G2/M (**Figura 3.1.2.**).

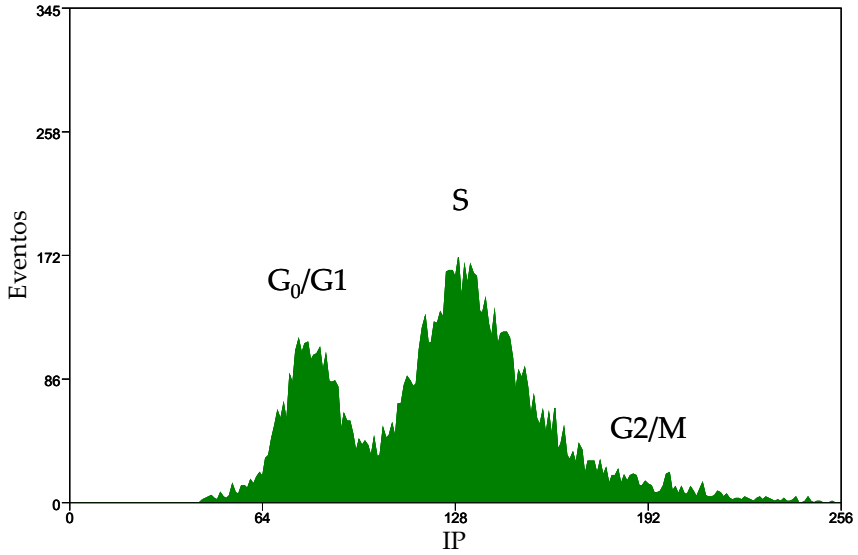


Figura 3.1.2. Análisis por FACS del ciclo celular mediante tinción con ioduro de propidio (IP).

Tras ser subcultivadas, estas células presentan un gran potencial de expansión, ya que la primera fase de crecimiento rápido se ralentiza cuando alcanzan el cuarto pase, en el caso de las células humanas, y noveno en las de rata. No obstante, existe gran variabilidad que puede deberse a varios determinantes, entre otros el procedimiento usado para la obtención de la médula, la baja y variable frecuencia de MSCs en los aspirados (2-5 MSCs por $1x10^6$ de células mononucleares) y la edad o condición del donante del que se toma la muestra.

Las células de los cultivos secundarios tienen núcleos con profundas invaginaciones, el retículo endoplasmático, y en especial los dictiosomas, muy bien organizados, pero a diferencia de los cultivos primarios, no muestran haces de filamentos. Cuando estas células son tratadas con rhTGF-β1 y medio osteoinductor durante un total de 6 días, presentan abundantes orgánulos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

citoplásmicos, especialmente de los haces de filamentos. Son células muy grandes que no presentan vesículas de secreción. No se observa colágeno fibrilar en el espacio extracelular (**Figura 3.1.3.**).

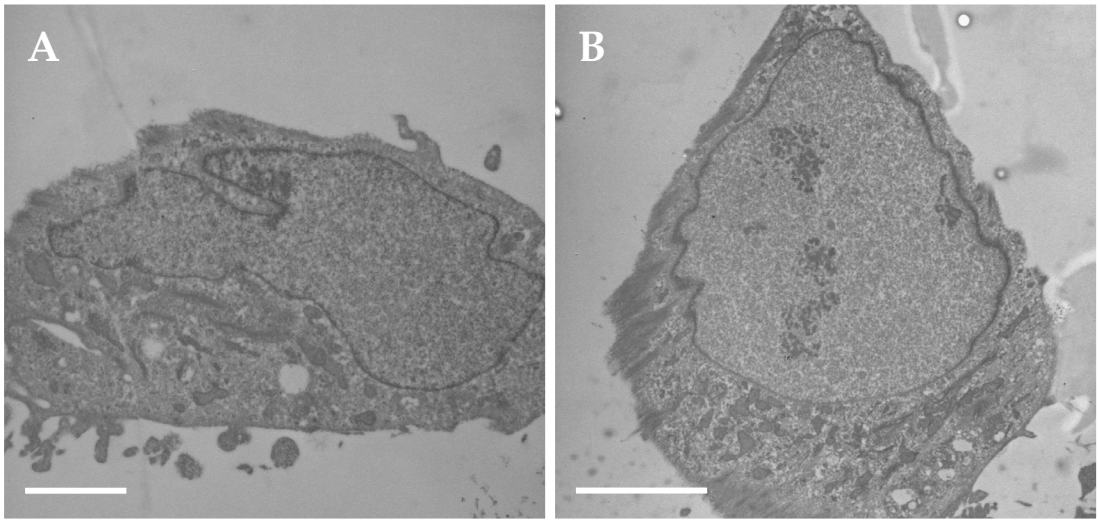


Figura 3.1.3. Cultivo secundario de MSCs. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de células control (A) y osteoinducidas durante 6 días (C). Barra: 2 μm en (A) y 6 μm en (B).

El grado de diferenciación osteogénica se puso de manifiesto mediante expresión de fosfatasa alcalina. El análisis bioquímico reveló que, después del tratamiento con rhTGF-β1 y medio osteoinductor, se produce un importante incremento en la actividad de este enzima de pre-mineralización respecto a las células control a día 0 y día 6 (+157% $p<0.001$ y +88.5% $p<0.01$, respectivamente). También existen diferencias significativas dentro del grupo control pues tras 6 días de cultivo *in vitro* se observa un aumento en la expresión de esta enzima (+68.5% $p<0.01$) (**Figura 3.1.4.** y **Tabla 3.1.1.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

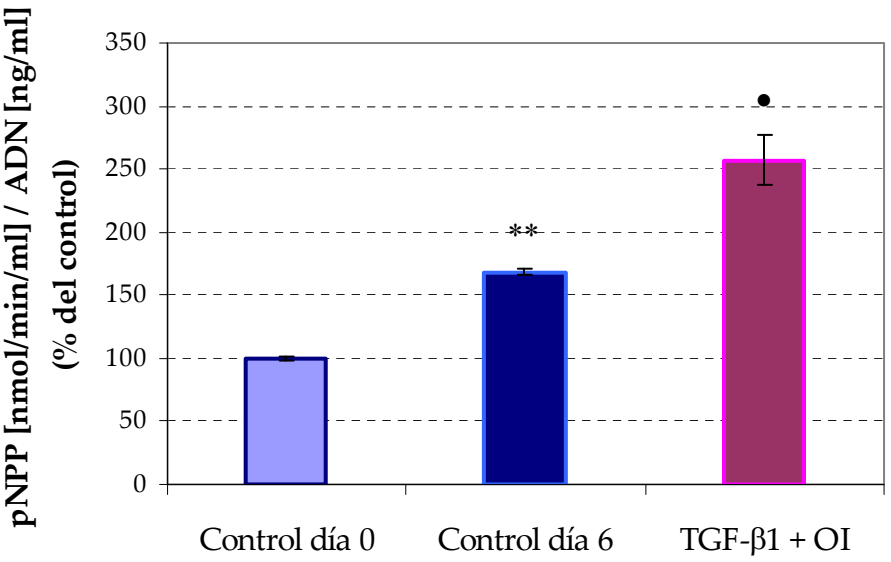


*Figura 3.1.4. Actividad fosfatasa alcalina a día 0 y 6 después del tratamiento con rhTGF-β1 y medio osteoinductor. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control a día 0 y se expresan como media ± EEM. ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni; ** p<0.01 vs. control día 0; • p<0.01 vs. control día 6 (n=6).*

Tabla 3.1.1. Actividad fosfatasa alcalina a día 0 y 6 después del tratamiento con rhTGF-β1 y medio osteoinductor, referido a cantidad de ADN.

Tiempo (días)	Tratamiento	Actividad fosfatasa alcalina
0	Control	100 ± 1.8
6	Control	168.5 ± 2.1 **
	TGF-β1 + OI	257.0 ± 19.7 •

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control a día 0 y se expresan como media ± EEM. ANOVA seguido del test *post hoc* de Bonferroni; ** p<0.01 vs. control día 0; • p<0.01 vs. control día 0, control día 6 (n=6).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2. SELECCIÓN DE PROGENITORES DE MÉDULA ÓSEA TRAS CULTIVOS EN GEL DE COLÁGENO: MÉTODO DE CAPACITACIÓN OSTEOGÉNICA (MCO)

Para la selección, amplificación y diferenciación de los progenitores presentes en la médula ósea, en este trabajo se ha desarrollado un Método de Capacitación Osteogénica (MCO) con rhTGF-βl comercial, descrito en la sección de Material y Métodos.

El examen microscópico de los cultivos tratados con rhTGF-β1 mostró cierta proliferación e incluso la formación de algunas colonias después de los períodos de amplificación e inducción. En el caso de la situación control (ausencia de factor exógeno), las células se mantuvieron dispersas y no se observó aumento significativo en el número de células (**Figura 3.2.1.**).

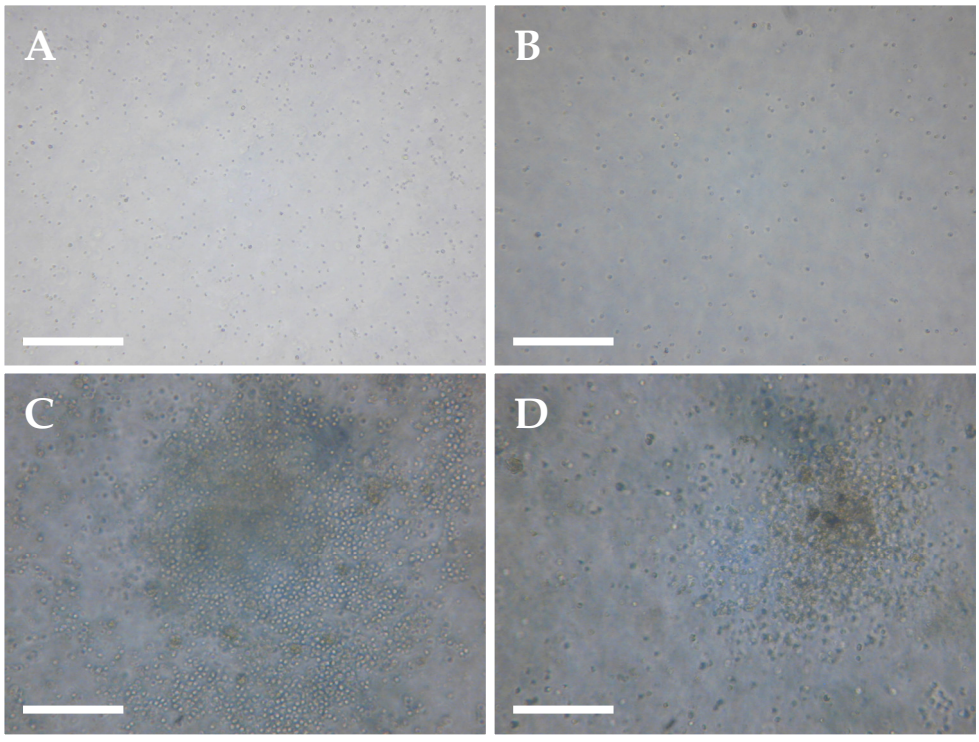


Figura 3.2.1. Cultivos en gel de colágeno. Micrografías obtenidas por microscopía de contraste de fase tras el período de amplificación (A, C) y el período de inducción (B, D) de células control (A-B) y cultivadas en presencia de rhTGF-β1 (C-D). Barra: 200 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Estos resultados se reflejaron también al analizar cuantitativamente la cantidad de ADN (**Figura 3.2.2.**). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías indicó que los valores obtenidos estaban asociados significativamente al tratamiento con rhTGF-β1 ($F=21.4$, $p<0.001$) y al período de cultivo ($F=6.9$, $p<0.001$), pero no a la interacción de ambos factores ($F=1.20$).

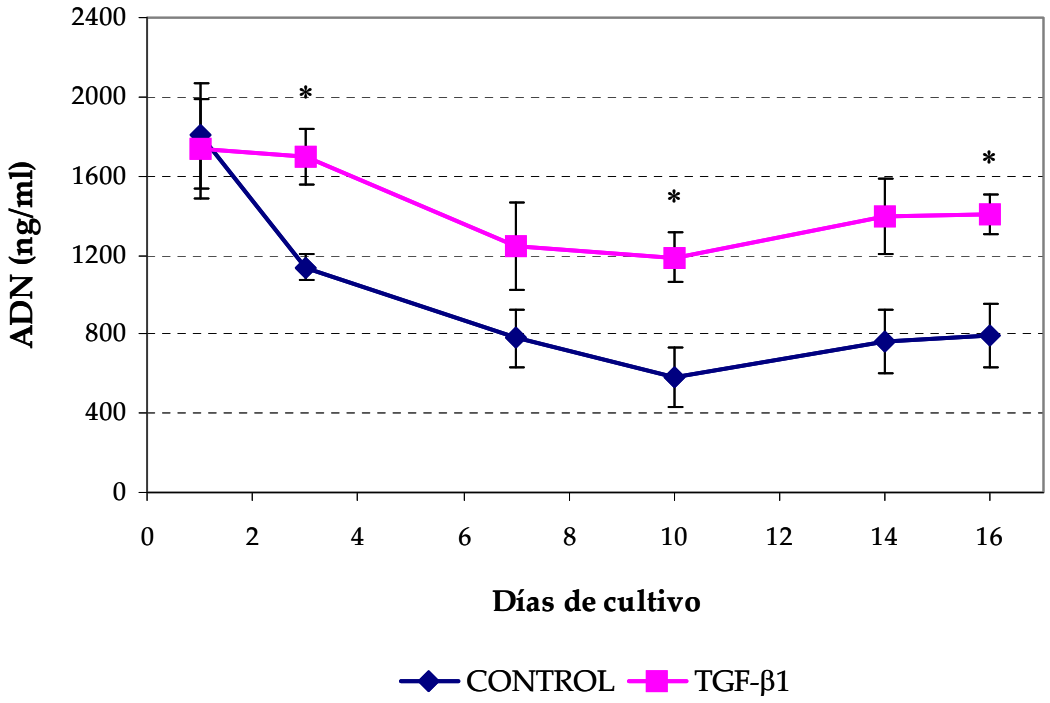


*Figura 3.2.2. Cuantificación de ADN en los cultivos control y tratados con rhTGF-β1. Los valores representan ng/ml de ADN respecto al grupo control y se expresan como media ± EEM. ANOVA de dos vías seguido del test post hoc de Bonferroni; * p<0.05 vs. control (n=3).*

Al comparar con el grupo control se observó cómo el tratamiento con rhTGF-β1 mantuvo más estable el número de células durante los primeros días de ayuno (+562.3 ng/ml a día 3, $p<0.05$), encontrando también diferencias significativas al final de dicho período (+601.2 ng/ml a día 10, $p<0.05$). En ambas condiciones, cuando se cambió a medio de cultivo completo, se observó un ligero aumento en el contenido de ADN, sin embargo los valores siguieron siendo mayores en los cultivos tratados con el factor de crecimiento (+608.4 ng/ml a día 16, $p<0.05$).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El estudio citométrico del ciclo celular realizado a los 14 días de cultivo, es decir, al final del período de amplificación que es cuando se esperaba mayor porcentaje de células en división, mostró que la mayoría de las células (79 ± 4.6%) se encontraban en G_0/G1 (**Figura 3.2.3.**).

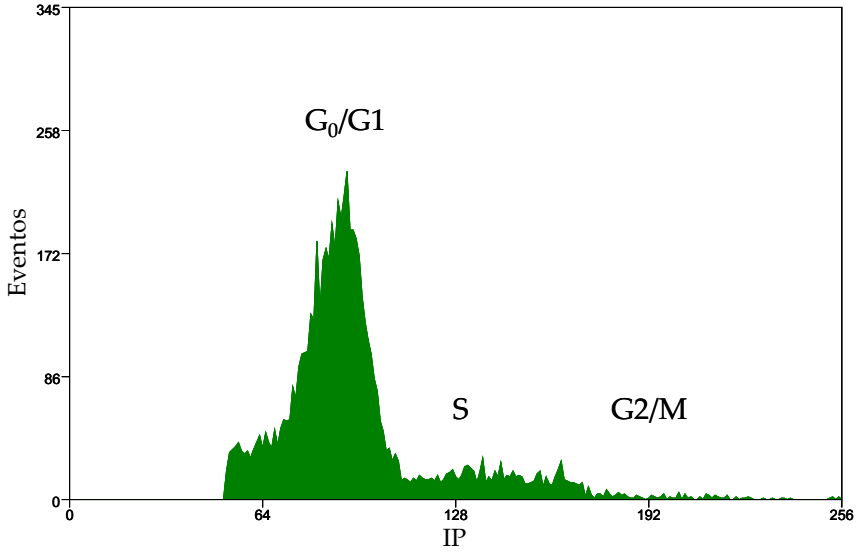


Figura 3.2.3. Análisis por FACS del ciclo celular mediante tinción con IP.

Durante el tiempo que duró el cultivo *in vitro*, también se tomaron muestras al final de cada período para analizar la actividad fosfatasa alcalina, referida a contenido de ADN. El análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías indicó que las diferencias observadas estaban asociadas al tratamiento con rhTGF-β1 ($F=79.1$, $p<0.001$), al período de cultivo ($F=12.2$, $p<0.01$), así como a la interacción de ambos factores ($F=4.4$, $p<0.05$) (**Figura 3.2.4.** y **Tabla 3.2.1.**).

Respecto al tratamiento, tras el período de selección (día 10), en el que las células se mantuvieron en una situación de ayuno, los valores de expresión de esta enzima fueron significativamente más altos en las células cultivadas en presencia de rhTGF-β1 (+30.3% $p<0.05$). Cuando se reestablecieron las concentraciones normales de suero (día 14), se observó un importante incremento respecto al grupo control (+64.6% $p<0.001$). Al finalizar el período de inducción con dexametasona y β-glicerolfosfato, se obtuvieron resultados similares: la actividad fosfatasa alcalina en los cultivos tratados con el factor fue superior (+37.6% $p<0.05$).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En cuanto al período de cultivo, el test *post hoc* de Bonferroni confirmó que la adicción de los osteoinductores incrementó de forma significativa la expresión de fosfatasa alcalina respecto al día 10 ($p<0.01$) y día 14 ($p<0.05$).

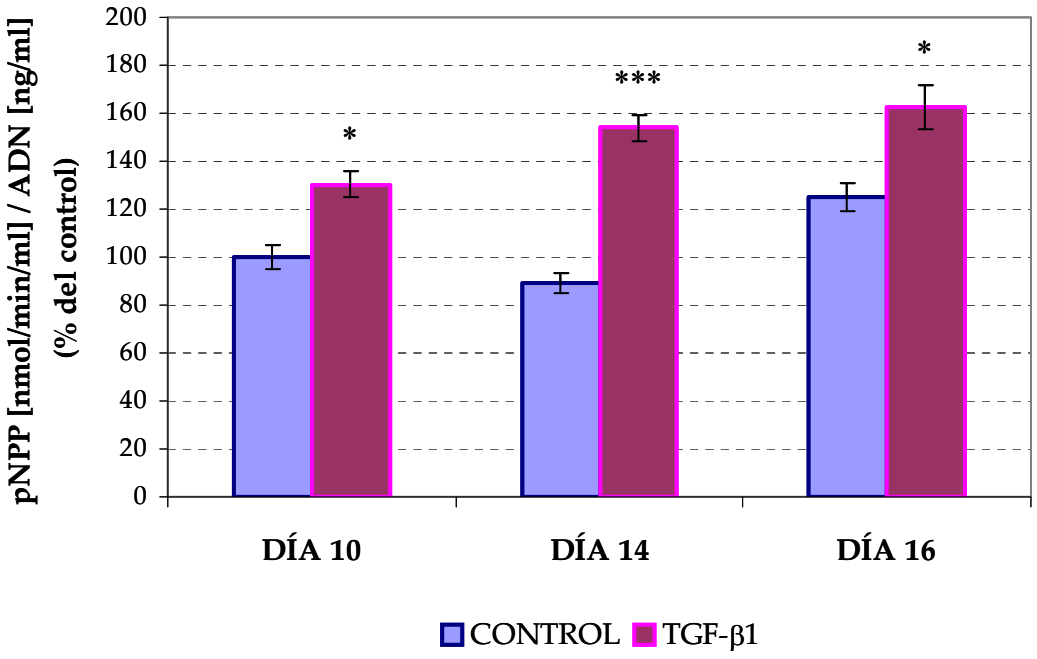


*Figura 3.2.4. Actividad fosfatasa alcalina a día 10, 14 y 16 en los cultivos control y tratados con rhTGF-β1, referido a cantidad de ADN. Los valores representan porcentajes respecto al grupo control a día 10 y se expresan como media ± EEM. ANOVA seguido del test post hoc de Bonferroni; *** p<0.001, * p<0.05 vs. control (n=3).*

Tabla 3.2.1. Actividad fosfatasa alcalina a día 10, 14 y 16 en los cultivos control y tratados con rhTGF-β1, referido a cantidad de ADN.

Tiempo (días)	Tratamiento	Actividad fosfatasa alcalina
10	Control	100 ± 4.7
	TGF-β1	130.3 ± 5.4
14	Control	89.3 ± 4.3
	TGF-β1	153.9 ± 5.6 ***
16	Control	125 ± 5.8
	TGF-β1	162.6 ± 9.2 *

Los valores representan porcentajes respecto al grupo control a día 10 y se expresan como media ± EEM. ANOVA seguido del test *post hoc* de Bonferroni; *** p<0.001, * p<0.05 vs. control (n=3).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PROGENITORES DE LA MÉDULA ÓSEA HUMANA TRAS LOS CULTIVOS ADHERENTES Y MCO

La citometría de flujo se ha utilizado para estudiar el fenotipo de las poblaciones celulares procedentes de los distintos sistemas de cultivo *in vitro* realizados en este trabajo. Para llevar a cabo el análisis se estudiaron parámetros como el tamaño celular relativo (FS) y el contenido relativo de gránulos (SS), así como la expresión de marcadores de superficie celular de los linajes mesengénico, hematopoyético y endotelial, en los cultivos realizados a partir del aspirado medular de trece pacientes.

3.3.1. Tamaño y granularidad celular

El análisis por FACS de la dispersión de la luz dirigida y colateral se ha utilizado para conocer la eficacia de la separación de la población de mononucleares mediante gradiente de Percoll®, así como para mostrar las diferencias de tamaño y complejidad existentes entre las células de los cultivos adherentes (ADH) y tridimensionales en gel de colágeno (**Tabla 3.3.1.**). Este análisis mostró que el tamaño relativo de las células del MCO era significativamente menor que el de las células ADH ($p<0.05$).

Tabla 3.3.1. Análisis por FACS de tamaño y granularidad de las células ADH y MCO.

	ADH	MCO
FS	136.69 ± 18.0	90.55 ± 21.7 *
SS	65.00 ± 13.3	72.36 ± 24.1

Los valores representan el tamaño y granularidad celular y se expresan como media ± EEM. t-Student; * $p<0.05$ vs. ADH (n=8).

Cuando las células del MCO fueron sembradas en monocapa, sólo una minoría de éstas fue capaz de adherirse al plástico. Las células que se mantuvieron en suspensión, denominadas como "no adherentes" (NO-ADH),

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

conservaron las características morfológicas de las cultivadas en la matriz tridimensional, mientras que las adheridas (MCO-ADH) se comportaron como las que fueron cultivadas directamente en monocapa (ADH) (**Figura 3.3.1.**).

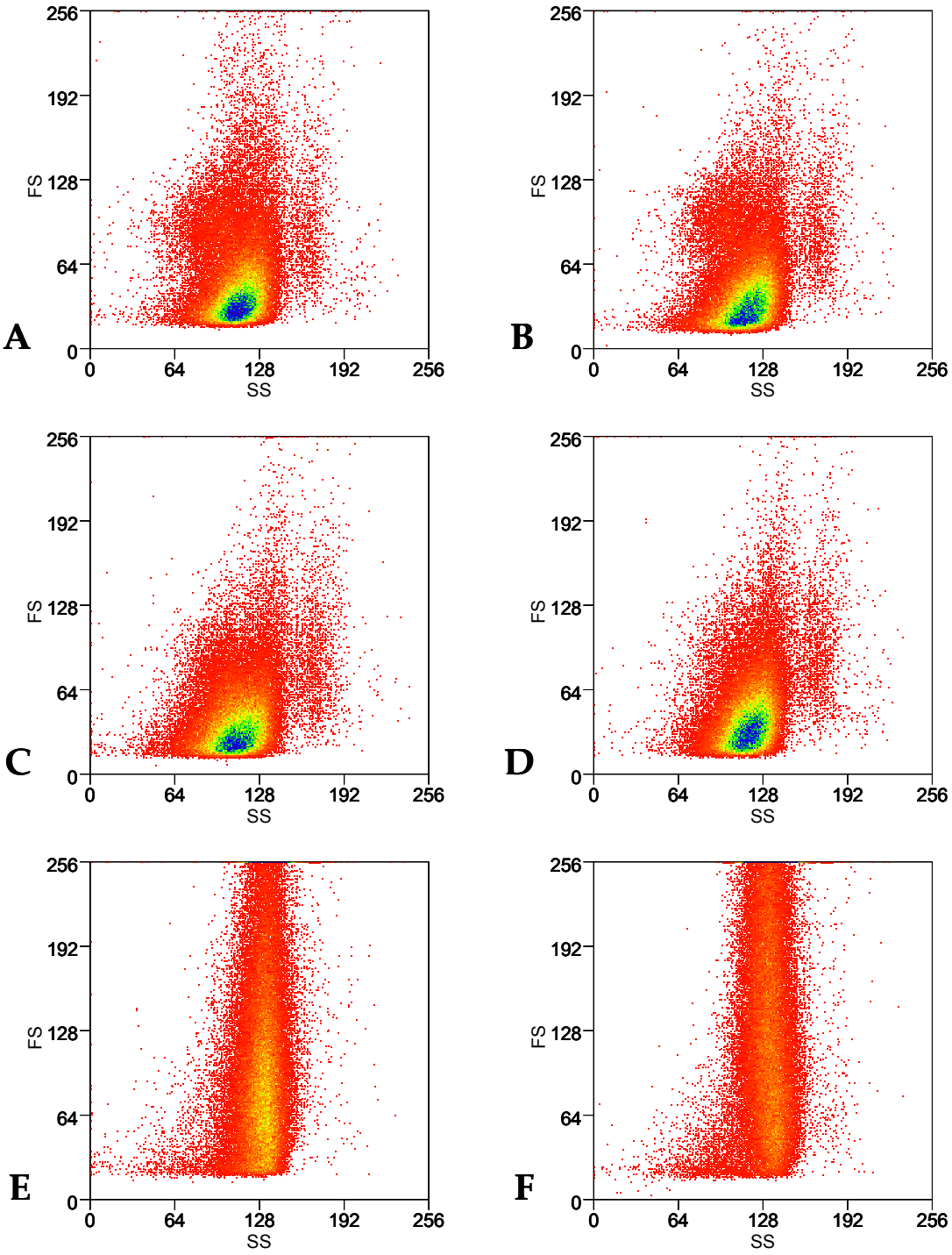


Figura 3.3.1. Tamaño y granularidad celular. (A-C) Cultivo MCO a día 10, 14 y 16, respectivamente. (D) Cultivo NO-ADH de células del MCO a día 10. (E-F) Cultivo ADH y MCO-ADH, respectivamente. Representados 50000 eventos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.3.2. Marcadores de superficie celular

Los resultados obtenidos en el cultivo de células ADH se corresponden con los descritos en la bibliografía para las MSCs. Se trata de un cultivo más o menos homogéneo, donde la mayoría de las células expresan CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271, STRO-1 y HLA-I, y son negativas para CD34, CD45 y HLA-II (**Figura 3.3.2.**). Este mismo fenotipo se observó en las células MCO-ADH (**Figura 3.3.3.**), exceptuando la expresión significativamente mayor de éstas para CD13 y CD49b (+25.7% y +69.5, $p<0.001$), y menor para CD106 (-24.3%, $p<0.001$) (**Figura 3.3.7.**).

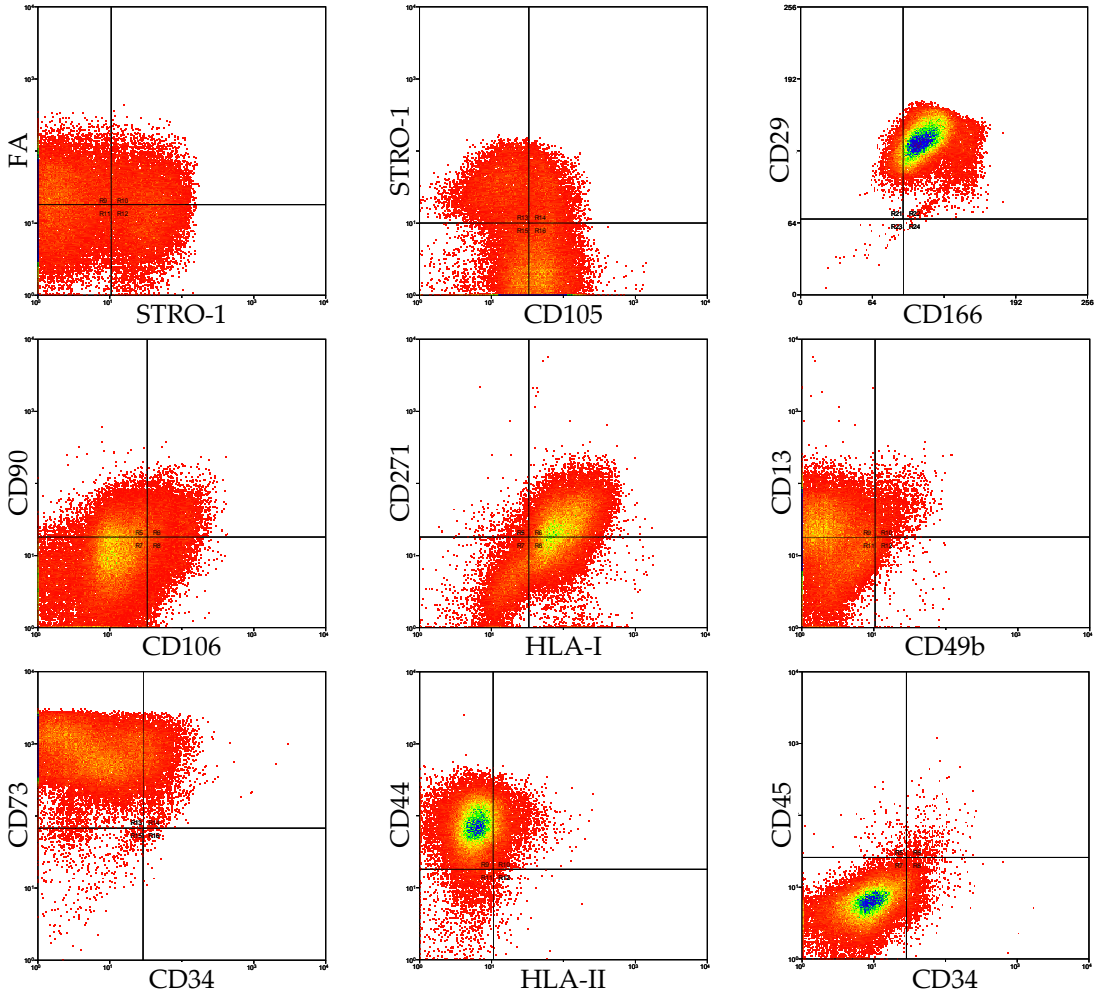


Figura 3.3.2. Inmunofenotipo del cultivo de células ADH. Representados 50000 eventos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

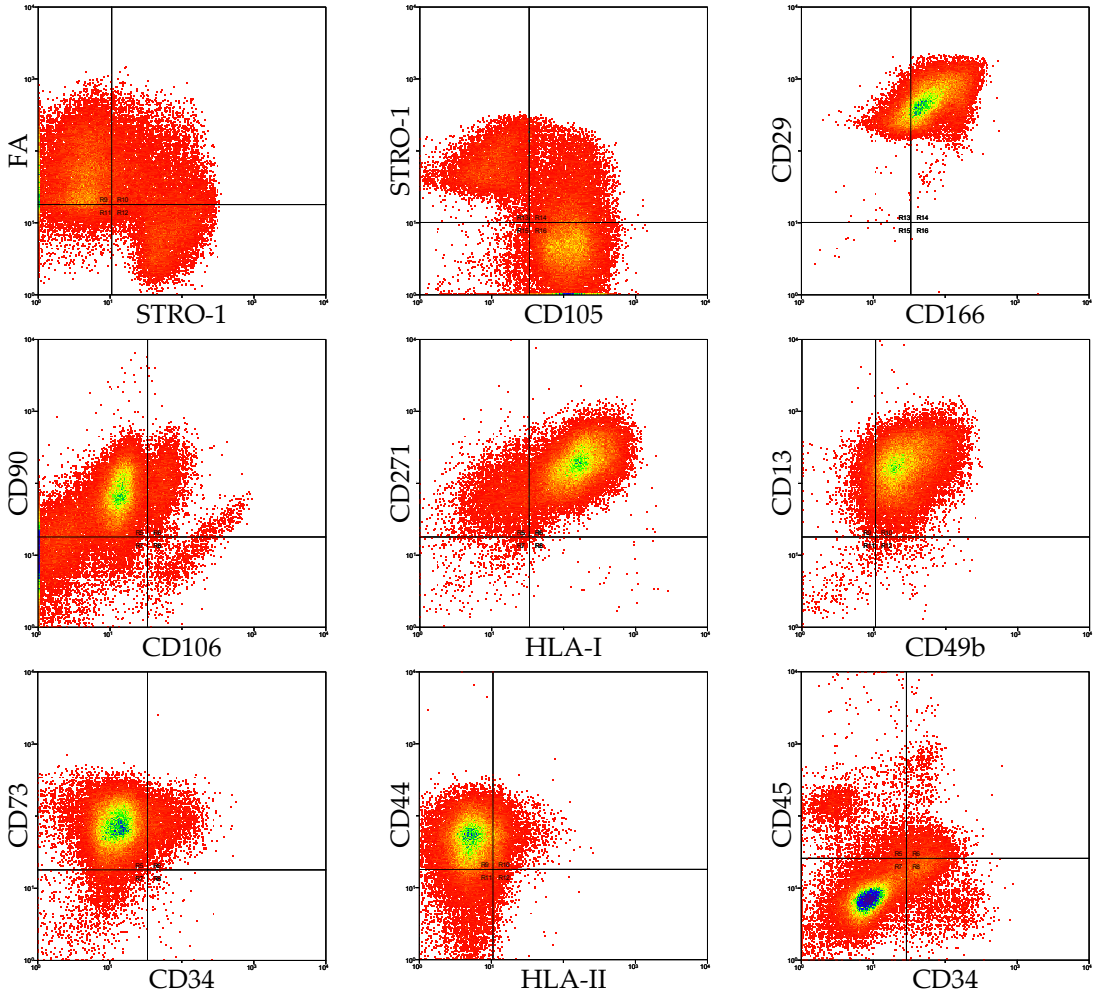


Figura 3.3.3. Inmunofenotipo del cultivo de células MCO-ADH. Representados 50000 eventos.

Al mismo tiempo, como se comentó antes, la mayoría de las células del MCO se mantuvieron en suspensión al intentar su adhesión a la superficie de los frascos de cultivo. Al analizar estas células NO-ADH se comprobó que se trataban de distintas poblaciones celulares del linaje hematopoyético y mesenquimal. Más tarde se demostró que eran las mismas células que se encontraban en el MCO a los 10 días, a excepción de la población CD166+ (-38.9%, $p<0.001$) (**Figura 3.3.4.**). Esto indica que las células que expresan CD166/ALCAM son las que tienen la capacidad de adherirse al plástico y que aparecen con aspecto fibroblástico cuando se las cultiva en condiciones estándar (2D).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

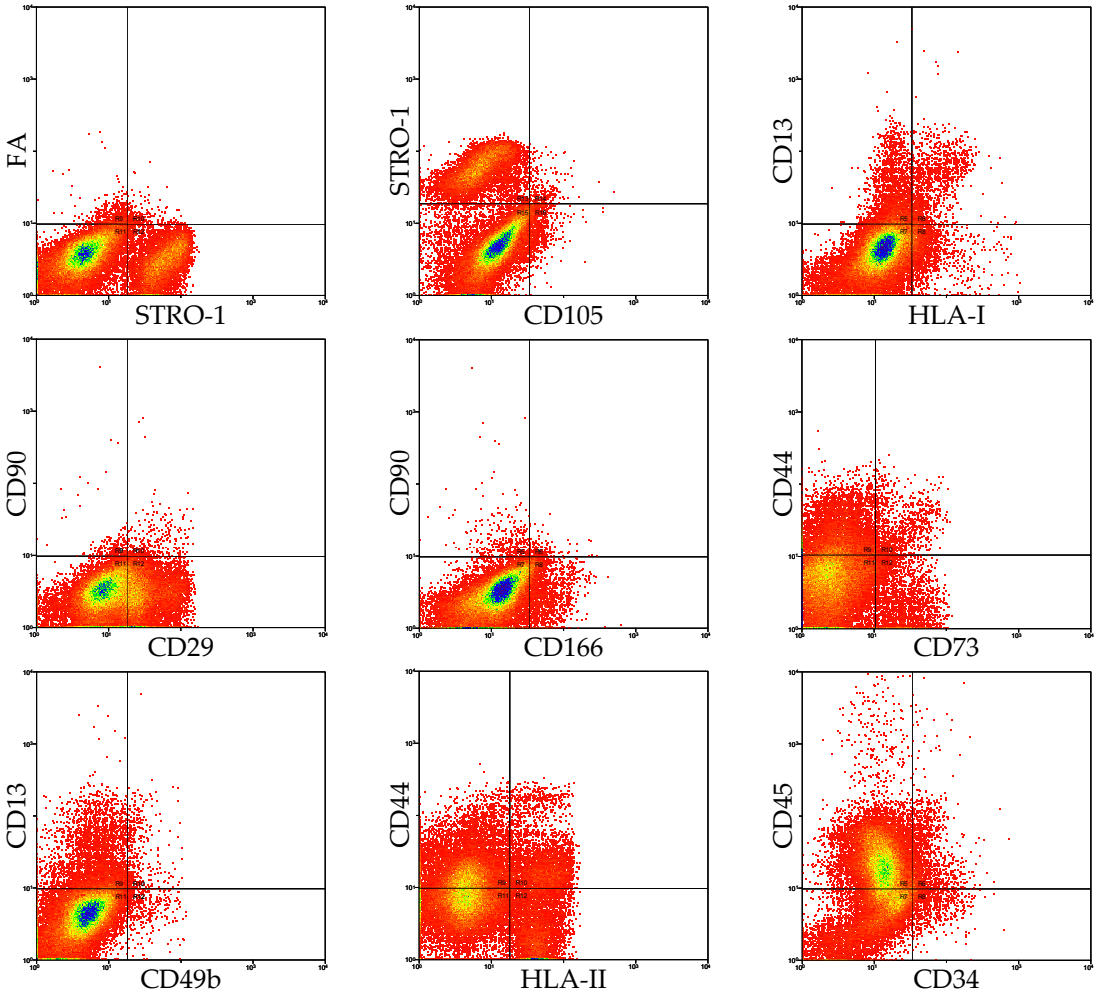


Figura 3.3.4. Inmunofenotipo del cultivo de células NO-ADH. Representados 50000 eventos.

En las condiciones MCO a día 10, al igual que en las NO-ADH, se observaron distintas poblaciones celulares, unas con características del linaje hematopoyético (CD34+ CD45+ HLA-II+), otras del mesenquimal (CD29+ CD44+ CD73+ CD105+ CD166+ HLA-I+ STRO-1+) y otras del endotelial (CD34+ CD49a+ CD133+ pero CD45-). Estas células CD133+ son de gran interés ya que pueden diferenciarse en células endoteliales maduras, contribuyendo a la neovascularización, fundamental para el proceso de reparación ósea (**Figura 3.3.5.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

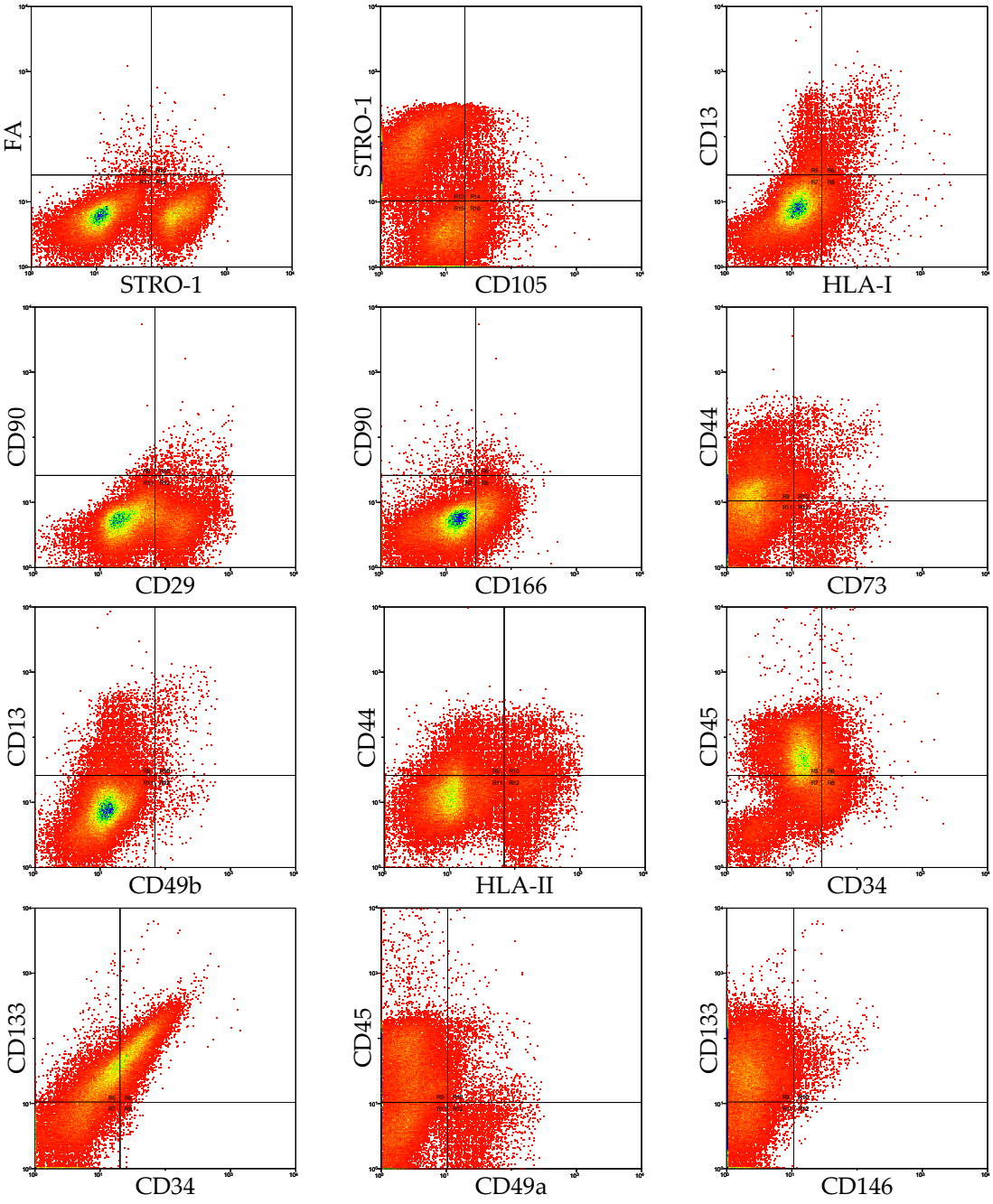


Figura 3.3.5. Inmunofenotipo del cultivo de células MCO a día 10. Representados 50000 eventos.

Al comparar los cultivos del MCO a día 10 y 16, se hallaron ciertas diferencias (**Figura 3.3.6.**). La población CD45+ disminuyó con el tiempo (-19.2%, $p<0.05$). Lo mismo se observó con la CD166+ (-37.5%, $p<0.001$), lo que indica que al estar incluidas dentro de una matriz tridimensional no necesitan una molécula de adhesión como es el ALCAM. Por el contrario, se obtuvo un

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

incremento en la expresión de algunos marcadores de células mesenquimales como CD29, CD73 y HLA-I (+4.0%, +2.1%, +9.3%, respectivamente). En cuanto a CD29, aunque la estadística no nos muestra diferencia significativa entre ambos cultivos, en el diagrama de puntos se puede observar cómo una de las poblaciones CD29+ aumenta significativamente (+11.1%, $p<0.05$).

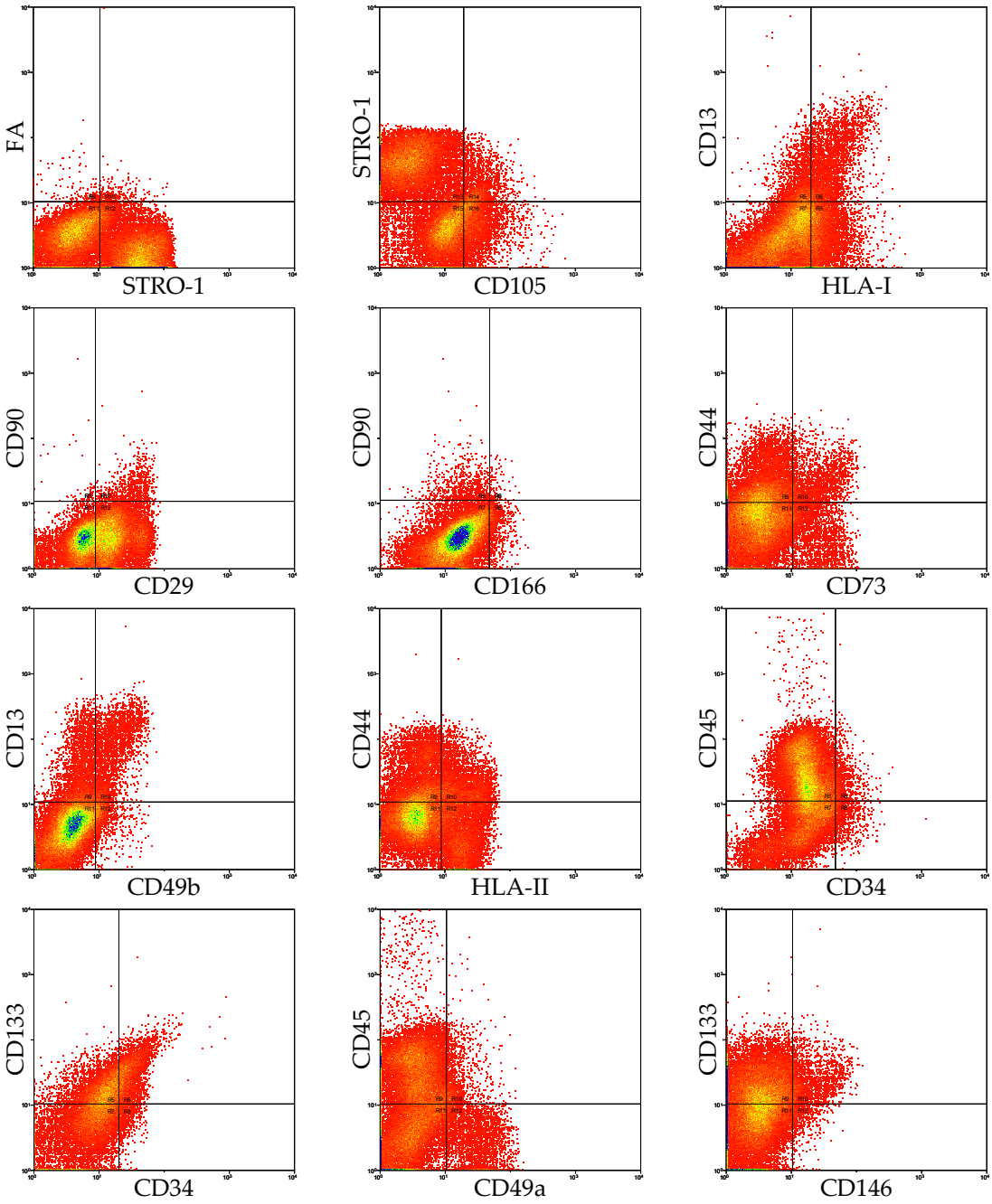


Figura 3.3.6. Inmunofenotipo del cultivo de células MCO a día 16. Representados 50000 eventos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

También sufrió un incremento la población doble positiva para CD13 y CD49b (+5.4%, p<0.001), marcadores específicos de las MAPC. Además se vio cómo la población de precursores endoteliales disminuyó (CD34+ CD133+, -23.5%, p<0.01) en beneficio de la de endoteliales maduras (CD146+, +1.3%, p<0.01) (**Figura 3.3.6.**).

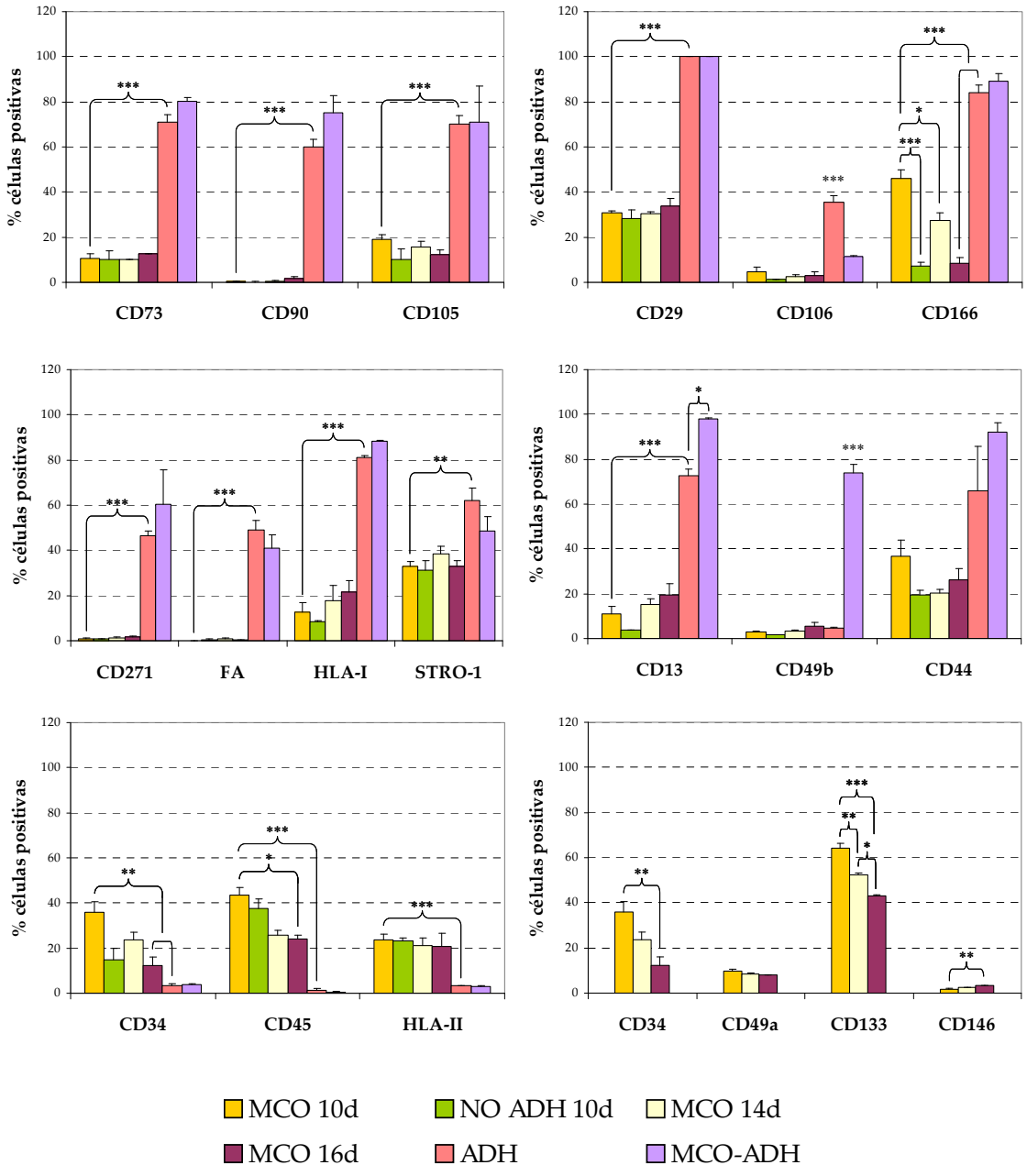


*Figura 3.3.7. Análisis estadísticos de los resultados de la citometría de flujo. Los valores representan porcentajes de células positivas y se expresan como media ± EEM. ANOVA seguido del test post hoc de Dunn; *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05 (n=8).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA, que está representado en la **figura 3.3.7.**, también se reflejan las diferencias significativas entre los cultivos MCO de 10 días y ADH, ya que uno de los objetivos era estudiar si las poblaciones seleccionadas por nuestro sistema tridimensional eran las mismas que en un cultivo en monocapa. Estas diferencias parecen indicar que los precursores mesenquimales del MCO se mantienen en un estado más inmaduro que el cultivo ADH, ya que son de menor tamaño, tienen baja tasa de proliferación y no expresan fosfatasa alcalina ni otros marcadores de células comprometidas en linajes de diferenciación.

3.4. SELECCIÓN DE PROGENITORES PLURIPOTENTES HUMANOS Y SU DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*

Debido a que el gel de colágeno tipo I parece mantener las células en estadíos más indiferenciados, se decidió estudiar qué ocurriría al cultivar células ADH en el sistema tridimensional durante 6 días. A este cultivo lo denominamos ADH-MCO, por haber sido seleccionado y expandido en monocapa y pasado posteriormente al gel de colágeno (3D).

Pasados los 6 días de cultivo en el MCO se analizó por FACS el tamaño y granularidad, el estado del ciclo celular, así como el patrón de expresión de los principales marcadores de MSCs y MAPCs.

El análisis del tamaño y complejidad mostró nuevamente que las células cultivadas en el gel de colágeno, aunque provengan del cultivo 2D, son significativamente menores que las ADH ($p<0.01$) (**Tabla 3.4.1.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 3.4.1. Análisis por FACS de tamaño y granularidad de las células adherentes y ADH-MCO.

	ADH	ADH-MCO
FS	123.4 ± 15.9	76.0 ± 3.7 **
SS	83.9 ± 16.1	74.5 ± 12.9

Los valores representan el tamaño y granularidad celular y se expresan como media ± EEM. t-Student; ** p<0.01 vs. ADH (n=4).

Igualmente, se pudo observar como su comportamiento proliferativo cambió drásticamente respecto al cultivo ADH, encontrando el 92-96% de las células en G_0/G1 (p<0.001) (**Figura 3.4.1.**).

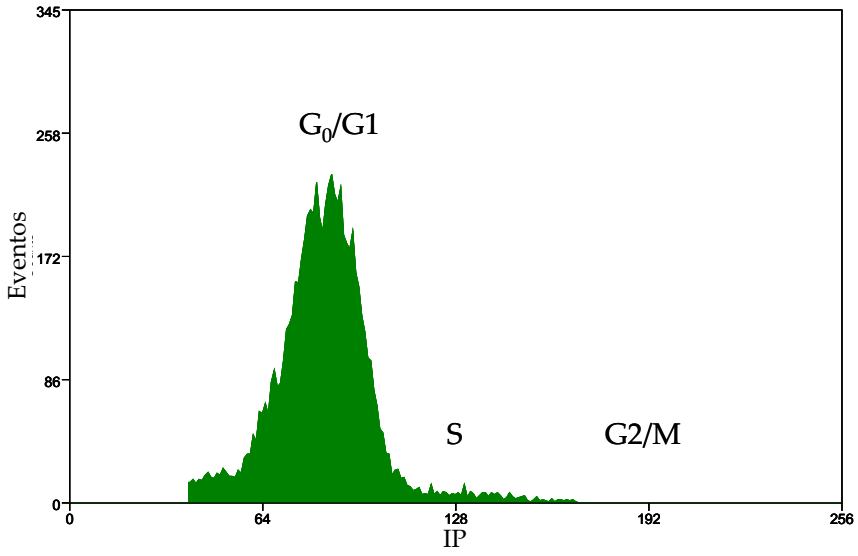


Figura 3.4.1. Análisis por FACS del ciclo celular mediante tinción con IP.

Al analizar la expresión de los distintos marcadores de superficie, se reveló que estás células pierden su inmunofenotipo de MSCs (CD49b- CD44+ CD106+ HLA-I+) para adquirir el patrón de expresión descrito para las células conocidas como MAPCs (CD13+ CD49b+ CD44 $^{low/-}$ CD106- HLA-I-) (**Figura 3.4.2.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

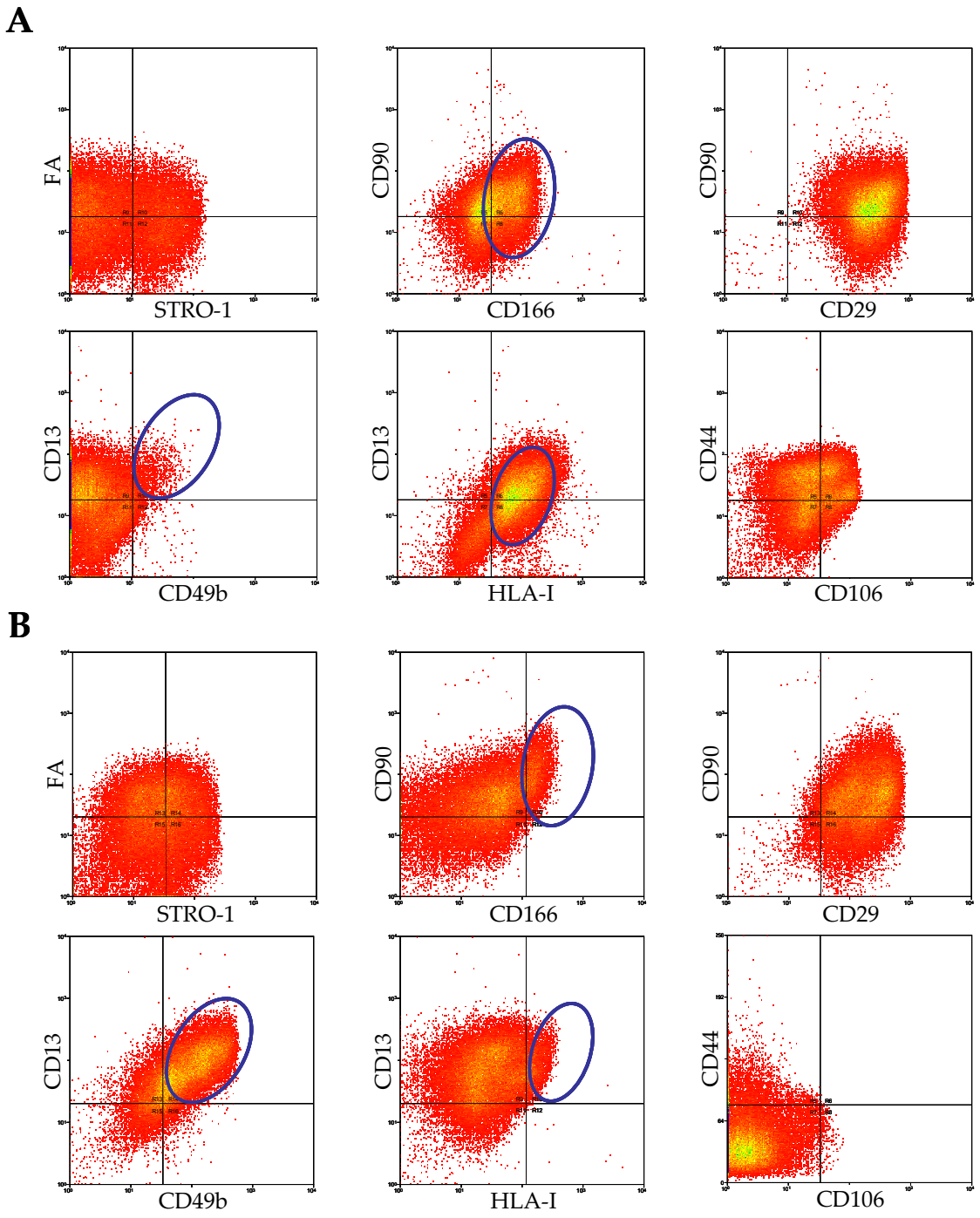


Figura 3.4.2. Inmunofenotipo de los cultivos de células ADH (A) y ADH-MCO (B). Representados 50000 eventos. Los óvalos azules señalan los cambios más llamativos que se observan en A vs. B.

El análisis estadístico de los datos demostró el incremento significativo del porcentaje de células doble positivas para CD13 y CD49b (+81.4%, $p<0.001$), y el descenso para CD44 (-59.9%, $p<0.05$), CD106 (-25.0%, $p<0.001$) y HLA-I (-72.7%, $p<0.001$) (**Figura 3.4.3.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

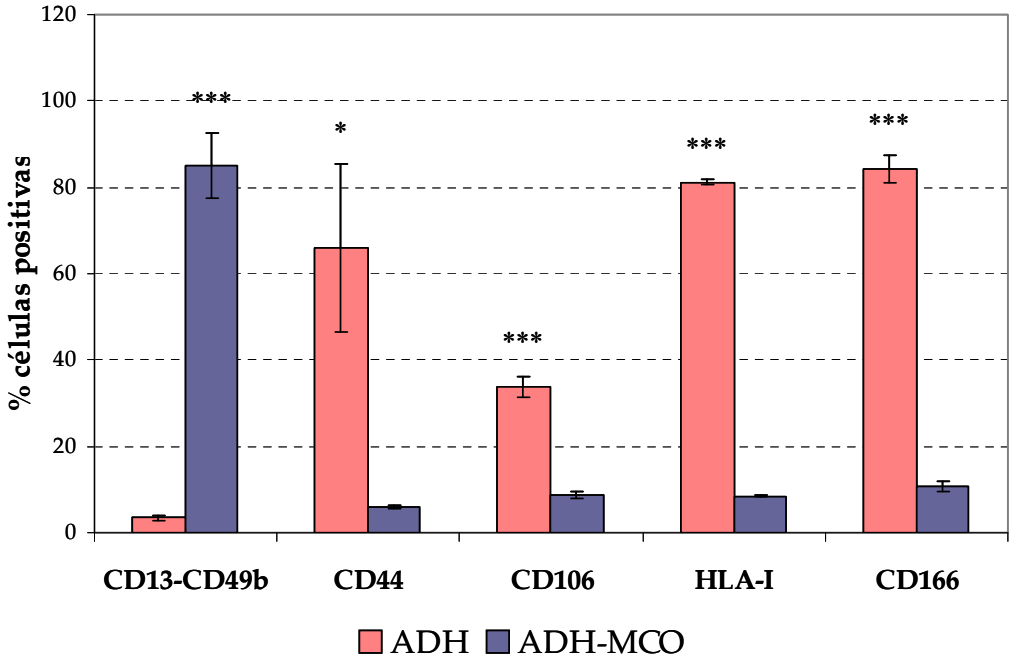


*Figura 3.4.3. Análisis estadístico de los resultados de la citometría de flujo. Los valores representan porcentajes de células positivas y se expresan como media ± EEM. ANOVA seguido del test post hoc de Bonferroni; *** p<0.001, * p<0.05 (n=8).*

Con el fin de estudiar si estás células ADH-MCO compartían con las MAPCs su pluripotencialidad, además de su inmunofenotipo, se realizaron experimentos de inducción hacia linajes de las tres hojas blastodérmicas. Como control de estos estudios se utilizaron células ADH con el mismo número de pases de cultivo (p+3) y el mismo tratamiento, y/o células ADH-MCO cultivadas en medio control.

3.4.1. Diferenciación hacia linajes mesodérmicos

3.4.1.1. Diferenciación osteogénica

La capacitación osteogénica de las ADH-MCO se realizó cultivando nuevamente en monocapa durante 21 días con medio osteoinductor. Tras el cultivo en la matriz tridimensional no se observó pérdida de la capacidad de adhesión, pero sí un cambio en su morfología (**Figura 3.4.4. C**). El aspecto que presentaron las células fue más parecido al de un cultivo primario, es decir, de menor tamaño y forma estrellada.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

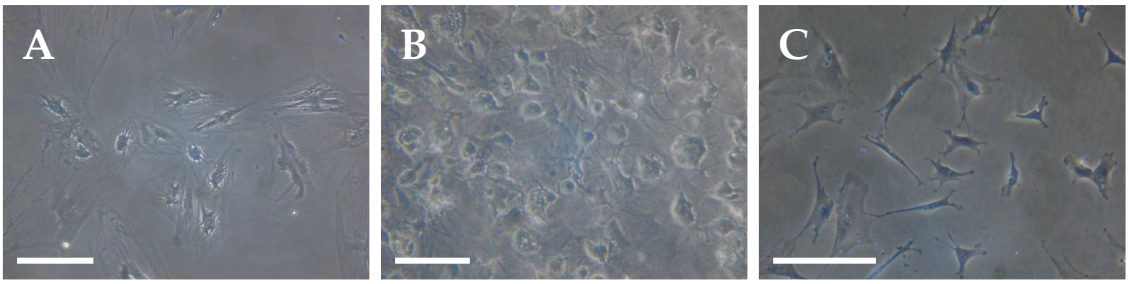


Figura 3.4.4. Micrografías obtenidas por microscopía de contraste de fase. (A) Cultivo de células ADH. (B) Cultivo de células ADH dentro del gel de colágeno tipo I. (C) Cultivo adherente de células ADH-MCO. Barra: 200 µm.

Después del período de inducción, el grado de diferenciación osteogénica se puso de manifiesto mediante el análisis de la expresión de fosfatasa alcalina, tanto bioquímica como histoquímica, y la formación de precipitados minerales, con la técnica histoquímica de von Kossa, en los días 12 y 21 del cultivo *in vitro.*

El análisis bioquímico sólo reveló diferencias significativas entre ambas condiciones a los 21 días de cultivo ($p<0.05$) (**Figura 3.4.5.**).

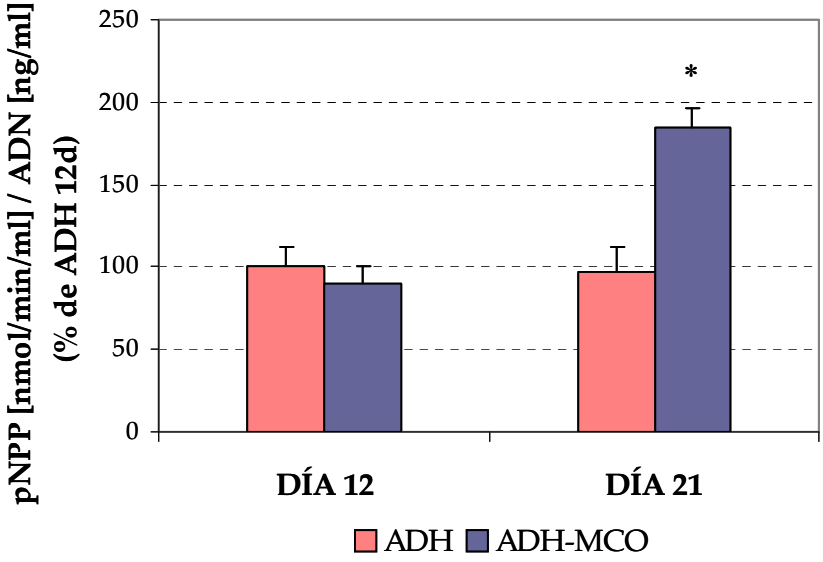


*Figura 3.4.5. Análisis bioquímico de la actividad fosfatasa alcalina a día 12 y 21 en los cultivos ADH y ADH-MCO, referido a cantidad de ADN. Los valores representan porcentajes respecto al grupo ADH a día 12 y se expresan como media ± EEM. ANOVA seguido del test post hoc de Bonferroni; * p<0.05 vs. ADH, ADH-MCO a día 12 (n=4).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Además del estudio cuantitativo indicado antes, al analizar los resultados de la histoquímica se pudo observar que la distribución de las células que expresaban fosfatasa alcalina era diferente en ambos cultivos (**Figura 3.4.6.**).

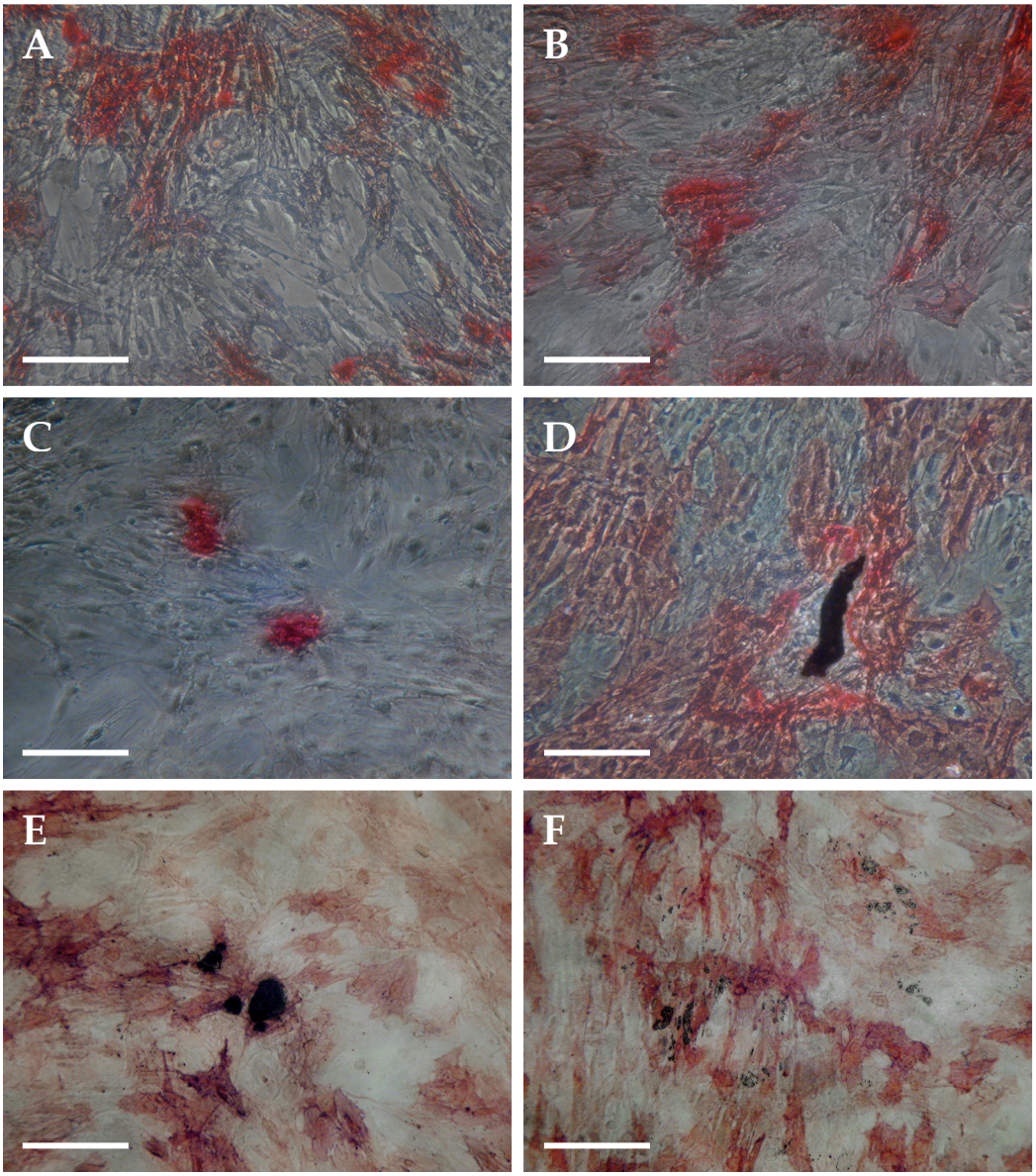


Figura 3.4.6. Análisis histoquímico de la actividad fosfatasa alcalina y tinción de von Kossa en los cultivos ADH y ADH-MCO tratados con medio osteoinductor. (A-B) Actividad fosfatasa alcalina en el cultivo ADH a día 12 y 21, respectivamente. (C-D) Actividad fosfatasa alcalina en el cultivo ADH-MCO a día 12 y 21, respectivamente. (E-F) Tinción de von Kossa en el cultivo ADH-MCO a día 21. Barra: 200 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En el caso de las ADH-MCO a los 12 días, la actividad fosfatasa alcalina se localizó únicamente en las colonias, ausentes en el cultivo ADH, y sin embargo, tras 21 días de tratamiento se vio cómo ya la mayoría de las células expresaban este enzima. Con la tinción de von Kossa, donde los iones de calcio en forma de fosfatos o carbonatos son sustituidos por iones de plata que, al ser expuestos a la luz, se reducen a plata metálica formando un depósito de tonalidad marrón-negra, se puso de manifiesto la mineralización de esas colonias que se observaban a los 12 días.

3.4.1.2. Diferenciación condrogénica

La capacitación condrogénica se comprobó mediante la técnica de formación de micromasas (n=5). Para ello se resuspendieron 2.5 x 10^5 células en 0.5 ml de medio condrogénico en un tubo falcon de 15 ml, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Tras 21 días de cultivo *in vitro,* se procedió a su estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico para microscopía óptica, a fin de determinar la presencia de cartílago.

En primer lugar, se realizó una medición del diámetro de las micromasas en el microscopio óptico a bajos aumentos. Los resultados mostraron que las micromasas obtenidas por inducción condrogénica a partir del cultivo de ADH eran significativamente menores (620.2 ± 7.1 μm) que las del cultivo ADH-MCO (1044.3 ± 22.4 μm, $p<0.001$) (**Figura 3.4.7. A, D**).

La tinción con azul de toluidina, colorante que se une a los radicales sulfatos de la matriz extracelular, produciendo metacromasia en la matriz del cartílago, mostró que sólo el tejido formado por las células ADH-MCO era de naturaleza cartilaginosa, ya que las obtenidas a partir del cultivo ADH presentaron una matriz heterogénea, con poca o nada de metacromasia (**Figura 3.4.7. A-D, H**). La tinción con safranina O-*fast green*, que tiñe de color anaranjado la matriz formada por glucosaminoglucanos sulfatados del cartílago y el tejido óseo de verde, así como con azul alciano, que se une a los restos ácidos y sulfatados de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

los proteoglucanos de la matriz cartilaginosa, corroboraron estos resultados (**Figura 3.4.7. E-F, I-J**). Por último, se demostró la presencia de colágeno tipo II en toda la micromasa mediante inmunotinción (**Figura 3.4.7. G, K**).

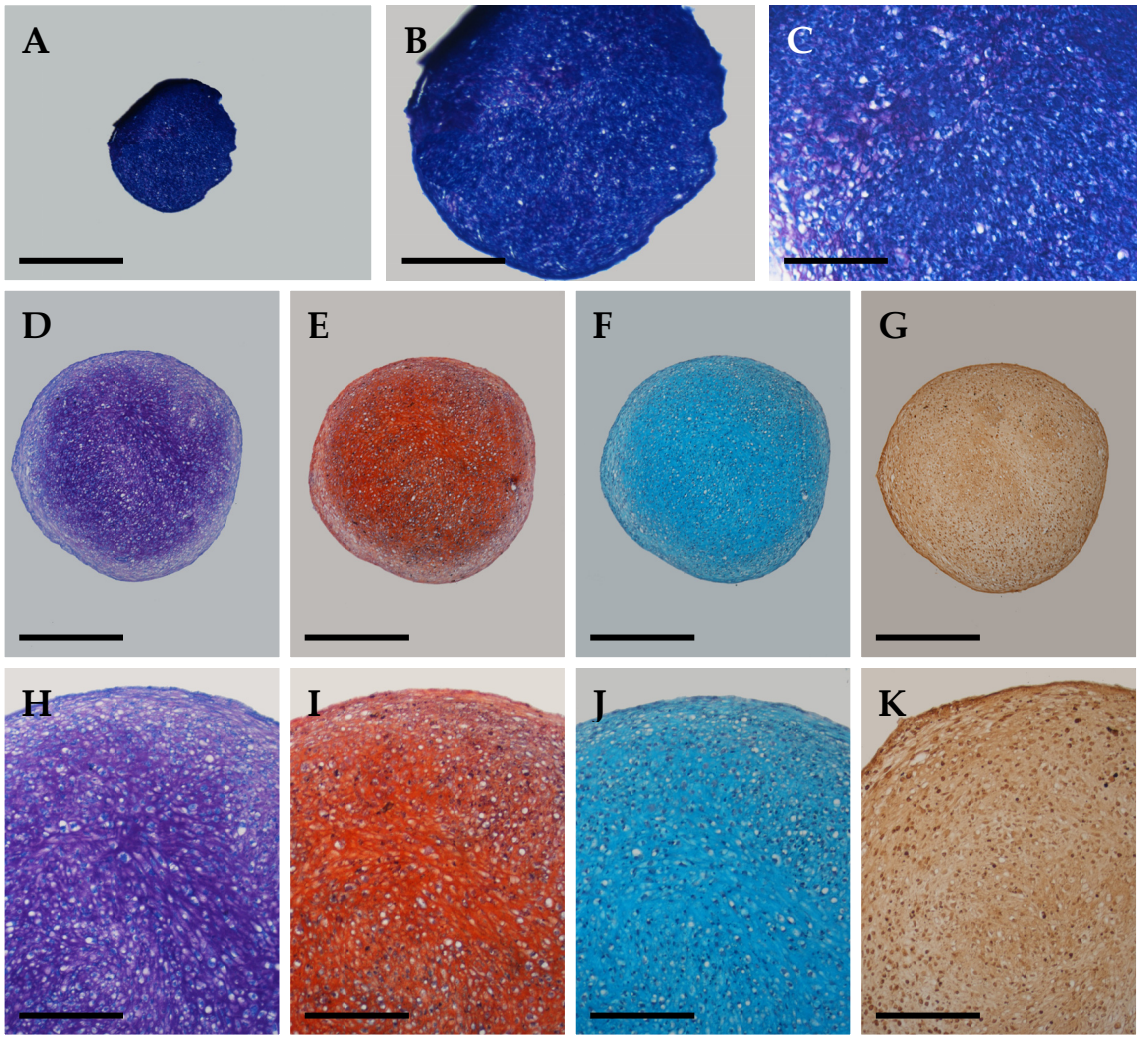


Figura 3.4.7. Diferenciación condrogénica mediante la técnica de formación de micromasas en los cultivos ADH (A-C) y ADH-MCO (D-K) tratados con medio condroinductor. (A-D, H) Tinción con azul de toluidina. (E, I) Tinción con safranina O-fast green. (F, J) Tinción con azul alciano. (G, K) Inmunohistoquímica frente a colágeno tipo II. Barra: 500 µm en (A, D-G), 200 µm en (B, H-K) y 100 µm en (C).

3.4.1.3. Diferenciación adipogénica

La diferenciación adipogénica provocó la aparición de gran cantidad de vacuolas lipídicas, teñidas específicamente con *Oil Red O* y visualizadas bajo el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

microscopio de contraste de fase en los cultivos procedentes de células ADH-MCO (**Figura 3.4.8.**). Los acúmulos de compuestos lipídicos terminaron por llenar completamente el citoplasma de las células diferenciadas tras 21 días en presencia de medio adipogénico. También se encontraron adipocitos en el cultivo ADH, aunque en menor cantidad.

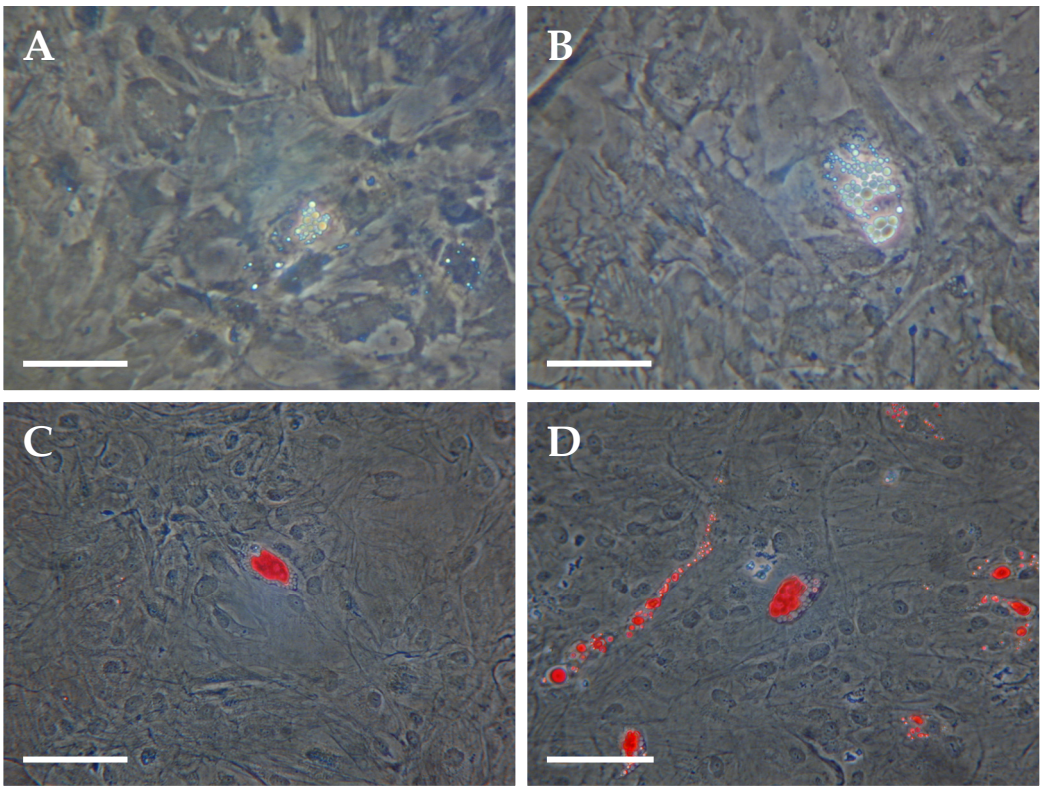


Figura 3.4.8. Diferenciación adipogénica. (A-B) Cultivos ADH y ADH-MCO a los 12 días, respectivamente. (C-D) Cultivos ADH y ADH-MCO teñidos con Oil Red O a los 21 días, respectivamente. Barra: 50 µm en (A-B) y 200 µm en (C-D).

3.4.1.4. Diferenciación hacia el linaje endotelial

La diferenciación endotelial *in vitro* se comprobó mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia.

En los últimos años, se han descrito varios nuevos marcadores para el linaje endotelial. Tienen particular importancia dos receptores de membrana del mitógeno endotelial VEGF conocidos como Flt-1 (VEGFR-1) y Flk-1 (VEGFR-2),

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

además de ciertas proteínas de adhesión celular de expresión temprana tales como PECAM/CD31 o VE-Cadherina.

Tras 14 días en presencia de VEGF-B, la citometría de flujo mostró que el 33.2 ± 3.1% de las células ADH-MCO tenían el inmunofenotipo que está descrito para los precursores endoteliales (CD34+ CD133+), que el 53.9 ± 11.1% eran CD31+ Flk-1+, y el 71.9 ± 4.1% expresaban MCAM/CD146+, glucoproteína de membrana que está presente en células endoteliales más maduras. Al mismo tiempo, el 100% eran CD49a+, integrina que actúa como receptor de moléculas de colágeno I y laminina, y que se expresa de forma constitutiva en células endoteliales (**Figura 3.4.9.**).

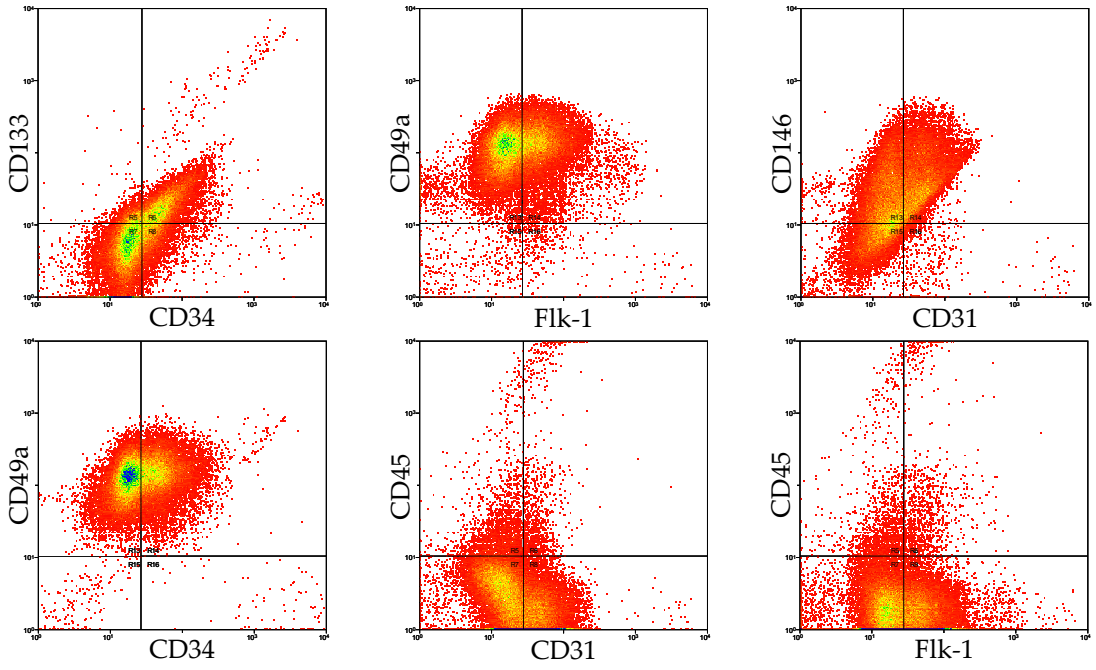


Figura 3.4.9. Diferenciación hacia el linaje endotelial con VEGF-B. Citometría de flujo frente a CD31, CD34, CD49a, CD45, CD133, CD146 y Flk-1.

Igualmente la inmunofluorescencia demostró que en el cultivo había células positivas frente a los antígenos clásicos de las células endoteliales, CD31, Flk-1 y el factor de von Willebrand (vWF) (**Figura 3.4.10.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

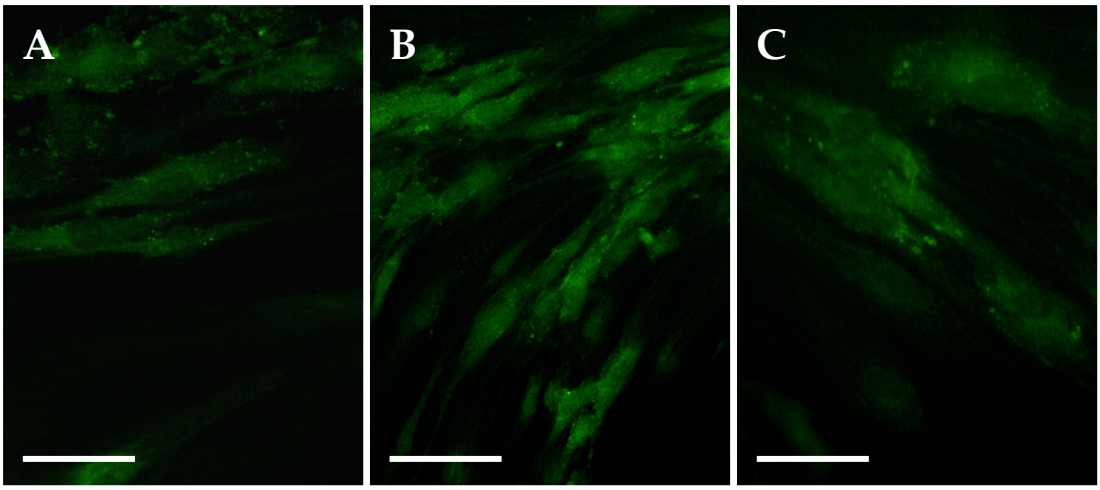


Figura 3.4.10. Diferenciación hacia el linaje endotelial con VEGF-B. Inmunofluorescencia frente a CD31 (A), Flk-1 (B) y al factor de von Willebrand (C) en el cultivo ADH-MCO. Barra: 50 μm en (A, C) y 100 μm en (B).

En cambio, en las células ADH-MCO cultivadas en medio control, no se observó expresión de los marcadores de células endoteliales CD31, CD146 y vWF, pero sí niveles muy bajos de CD49a y Flk-1.

3.4.2. Diferenciación hacia linajes neuroectodérmicos

La diferenciación hacia linajes neuroectodérmicos se determinó a los 7 y 14 días mediante inmunofluorescencia frente a los antígenos βIII-tubulina, neurofilamento-200 (NF-200) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

En el cultivo control no se observaron células positivas para βIII-tubulina, NF-200 ó GFAP. En cambio, las ADH-MCO, cultivadas 14 días con bFGF, adquirieron la morfología y el fenotipo característicos de astrocitos (GFAP) y de neuronas (βIII-tubulina y NF-200). Los resultados de inmunofluorescencia mostraron que a día 7 las células comenzaron a expresar βIII-tubulina, marcador de neuronas inmaduras, y se podían distinguir algunas células NF-200+ y GFAP+ (**Figura 3.4.11.**). Aunque la frecuencia de los marcadores neuronales aumentó con el tiempo de cultivo, encontrándose a día 14 que la mayoría de las células eran positivas para βIII-tubulina y NF-200, la presencia de células GFAP+, menos del 10%, no aumentó del día 7 al 14 (**Figura 3.4.12.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

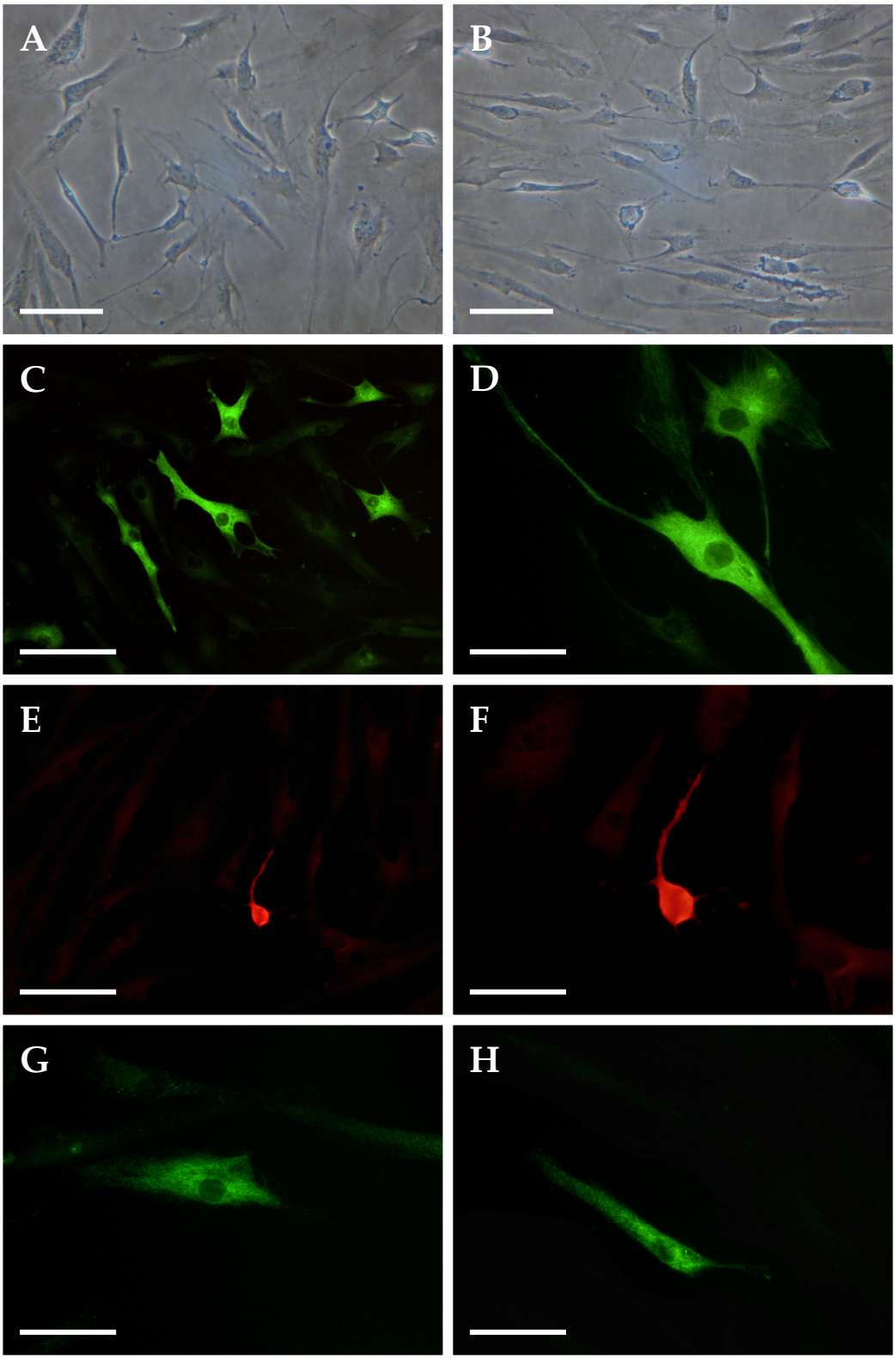


Figura 3.4.11. Diferenciación hacia el linaje neuroectodérmico tras 7 días de cultivo con bFGF de las células ADH-MCO. (A-B) Fotomicrografías obtenidas por microscopía de contraste de fase. Inmunofluorescencia frente a βIII-tubulina (C-D), GFAP (E-F) y NF-200 (G-H). Barra: 50 µm en (D, F-H) y 100 µm en (A-B, C, E).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

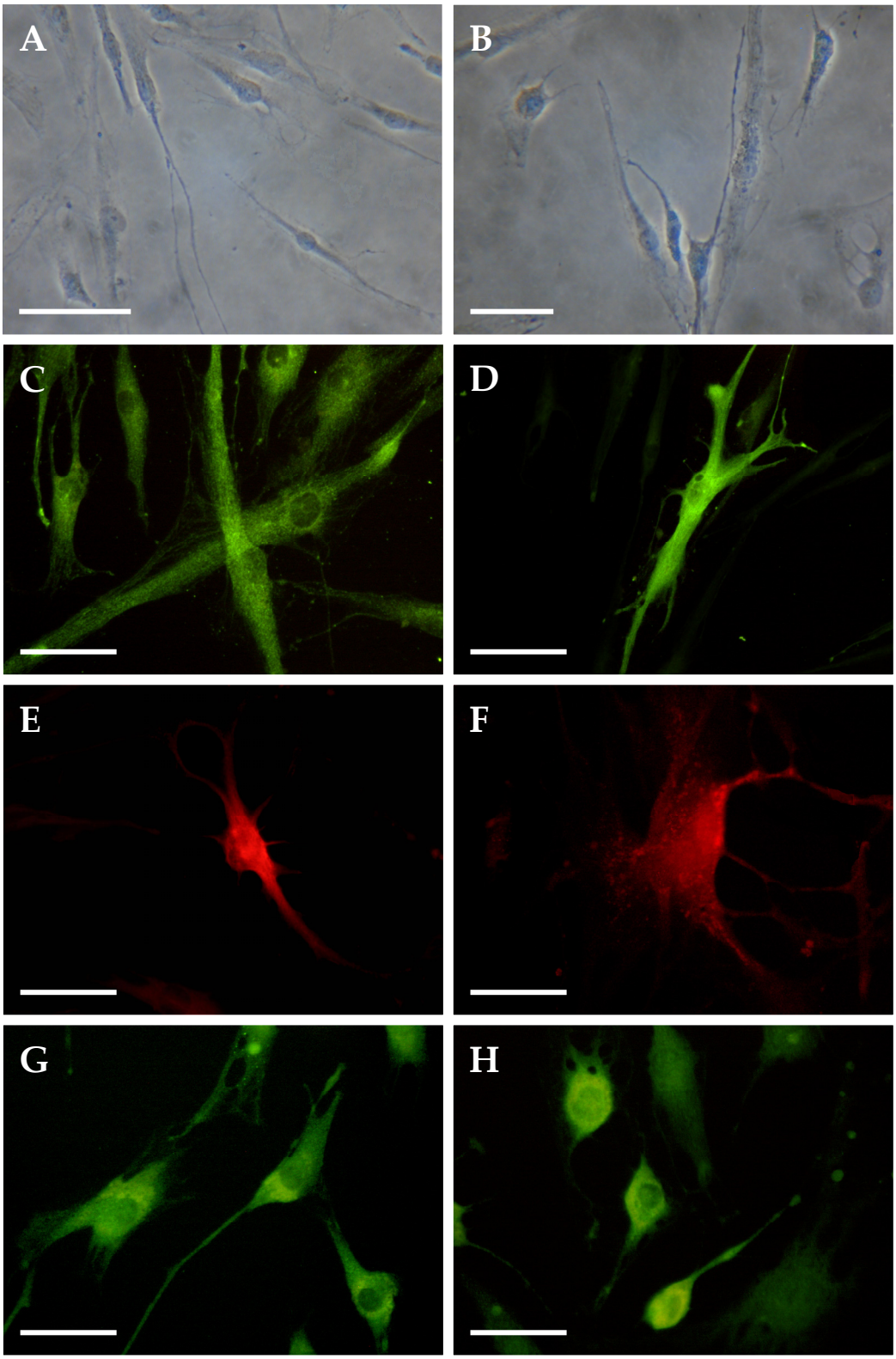


Figura 3.4.12. Diferenciación hacia el linaje neuroectodérmico tras 14 días de cultivo con bFGF de las células ADH-MCO. (A-B) Fotomicrografías obtenidas por microscopía de contraste de fase. Inmunofluorescencia frente a βIII-tubulina (C-D), GFAP (E-F) y NF-200 (G-H). Barra: 50 µm en (C-H) y 100 µm en (A-B).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.3. Diferenciación hacia linajes endodérmicos

Para demostrar que las células ADH-MCO podían diferenciarse hacia hepatocitos, se realizó inmunofluorescencia frente a marcadores de expresión tardía como son la albúmina, el factor nuclear de hepatocitos (HNF) y la citoqueratina-18 (CK-18), tras el tratamiento con HGF y FGF-4.

Como ocurrió con la diferenciación hacia endotelio y neuroectodermo, las células cultivadas en medio control no expresaron ninguno de estos marcadores. Mientras que las ADH-MCO, tras 14 días de tratamiento con HGF y FGF-4, adquirieron la morfología y fenotipo característicos de los hepatocitos. Las células se volvieron más redondeadas y poliédricas, y la inmunofluorescencia mostró que aproximadamente el 15% eran CK-18+, y el 60-70% se marcaron doble positivas para la albúmina y el HNF-1 (**Figura 3.4.13.**).

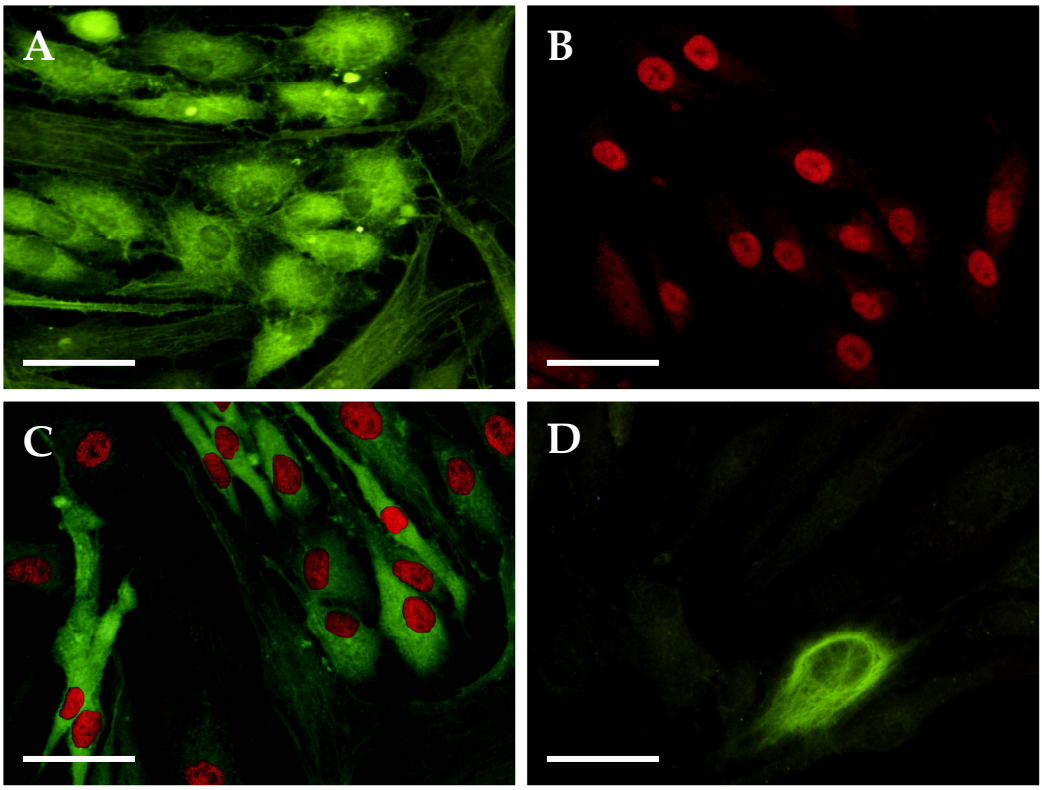


Figura 3.4.13. Diferenciación hacia hepatocitos tras 14 días de cultivo con FGF-4 y HGF de las células ADH-MCO. Inmunofluorescencia frente a albúmina (en verde) (A, C), HNF-1 (en rojo) (B-C) y CK-18 (D). Barra: 50 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.5. ESTUDIOS *IN VIVO*. HISTOGÉNESIS EN IMPLANTES ECTÓPICOS

La capacitación condro-osteogénica *in vitro* de los cultivos se comprobó mediante experimentos *in vivo* de osteogénesis ectópica. Se desarrollaron dos tipos de experimentos, en los que se implantaron 1.5 x 10^6 células en cámaras de matriz ósea desmineralizada (MOD), durante 2, 4 u 8 semanas en animales jóvenes. Tras estos períodos, se extrajeron los implantes y se procesaron para su estudio histológico, lo que nos permitió identificar la naturaleza del tejido formado y diferenciar si se trataba de cartílago, hueso o ambos, e incluso en qué estado de madurez se encontraba.

3.5.1. Implantes con células no adherentes (NO-ADH)

Para investigar si las poblaciones de células NO-ADH, que sólo se seleccionan en los cultivos en gel de colágeno porque no se adhieren al plástico, tienen la capacidad de desarrollar actividad condro-osteogénica *in vivo*, se implantaron 1.5 x 10^6 células en cámaras de MOD subcutáneamente en ratas jóvenes durante 4 semanas, tras haber descartado la población ADH por repetidos subcultivos, y ser amplificadas y diferenciadas en el sistema tridimensional.

En el caso de los controles negativos, implantes con células cultivadas en ausencia de rhTGF-β1, la tinción con picrosirio-hematoxilina en el interior de la cámara muestra únicamente formación de tejido conectivo fibroso. Aunque, como se observa en la **figura 3.5.1.**, es frecuente que en los huecos de las paredes (asteriscos) se forme un tejido cuyas características morfo/histológicas y tintoriales coinciden con las del cartílago. Como es sabido, esto se debe a la presencia de BMPs en la MOD, lo que le confiere a ésta su conocida propiedad condro-osteoinductora, y que está siendo ejercida de manera local en las paredes de los implantes.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

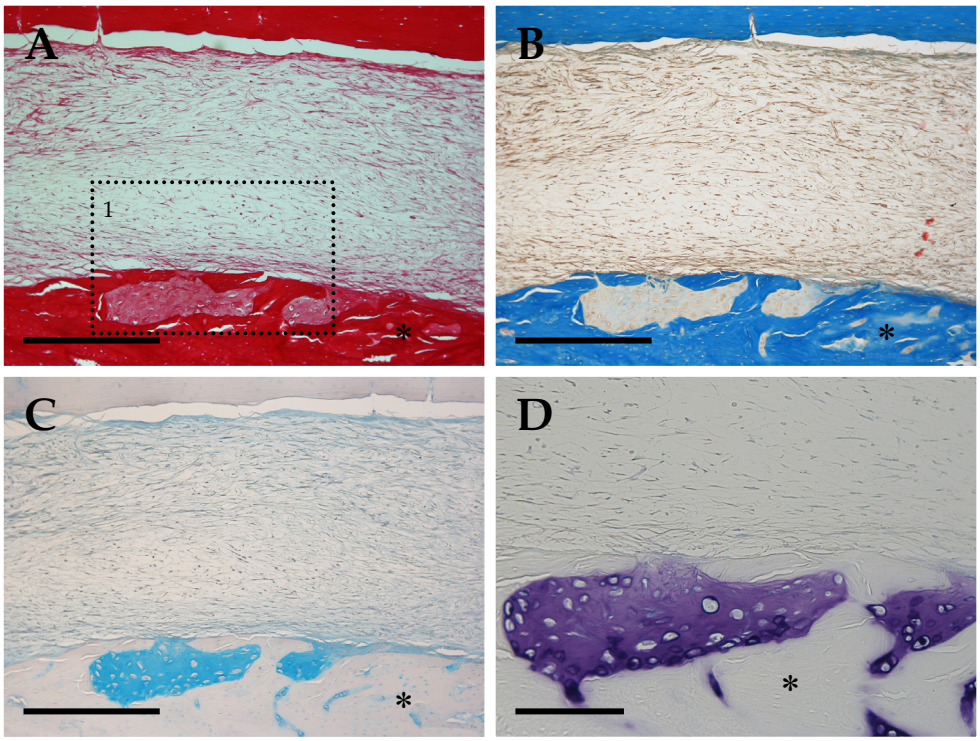


Figura 3.5.1. Estudio histológico de los implantes con células cultivadas en ausencia de rhTGF-β1 en cámaras de MOD. Las tinciones utilizadas son picrosirio-hematoxilina (A), tricrómico de Goldner (B), azul alciano (C) y azul de toluidina (D). Los asteriscos indican las paredes de la cámara. La figura D es un detalle de la zona 1. Barra: 200 µm en (D) y 500 µm en (A-C).

En cambio, en los implantes con células NO-ADH puede apreciarse la formación de un tejido con características de hueso trabecular más o menos compacto (flechas en la **figura 3.5.2.**), que es puesto de manifiesto por la tinción tricrómica que tiñe de azul las fibras colagénicas mineralizadas (**Figura 3.5.2. A1**), así como por la tinción picrosirio-hematoxilina (**Figura 3.5.2. B**). Cuando estas fibras de colágeno teñidas con picrosirio se observan bajo el microscopio de luz polarizada, muestran una fuerte birrefringencia, con colores que varían del amarillo al rojo, lo cual es testimonio de que las fibras están ordenadas en la misma dirección (**Figura 3.5.2. D**). En los bordes de la matriz neoformada se pueden distinguir numerosos osteoblastos íntimamente relacionados con ella, y en su interior osteocitos embebidos de forma ordenada, así como cavidades que

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

parecen indicar la formación de un tejido con cualidades medulares (puntas de flechas en la **figura 3.5.2.**). En este tejido, además de vasos sanguíneos de mayor o menor calibre, se observan varios tipos celulares, incluyendo células mesenquimales, hematopoyéticas y adiposas (**Figura 3.5.3.**).

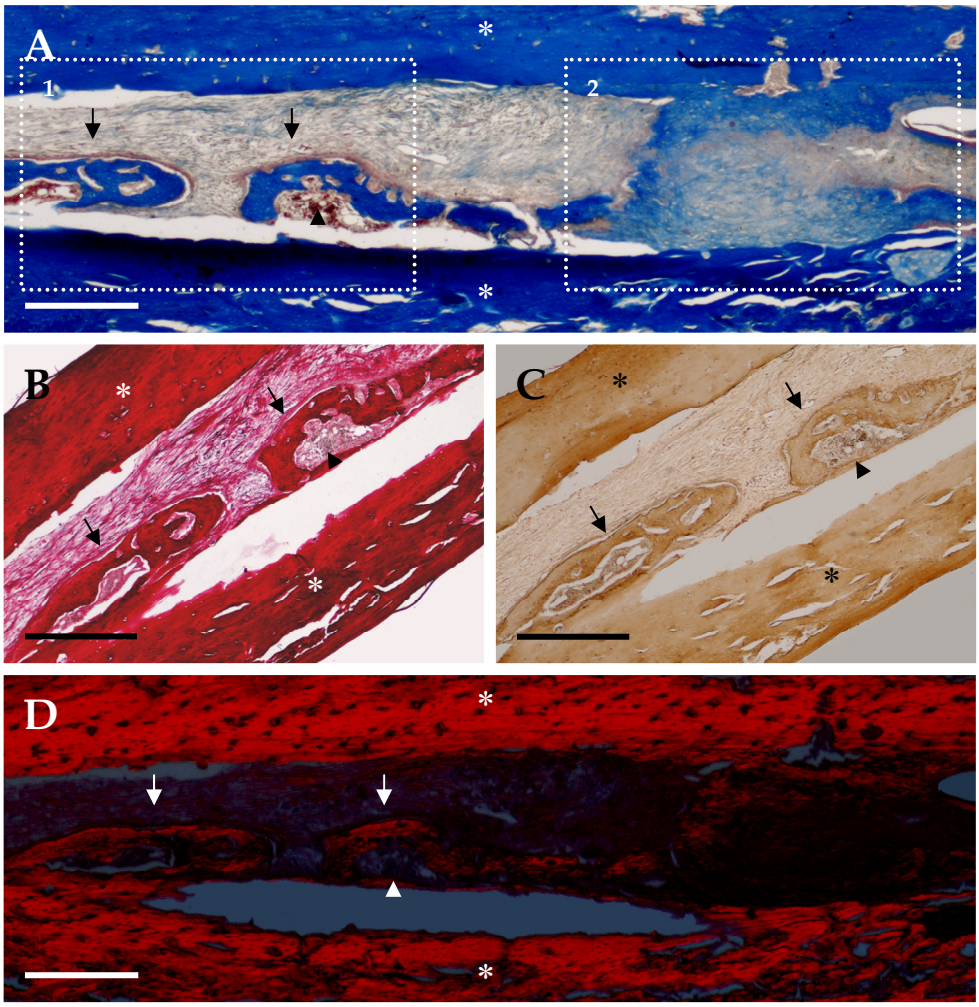


Figura 3.5.2. Estudio histológico de los implantes con células NO-ADH en cámaras de MOD. Las técnicas utilizadas son tricrómico de Goldner (A), picrosirio-hematoxilina observado en campo claro (B) y con luz polarizada (D) e inmunohistoquímica frente al colágeno tipo I (C). Los asteriscos indican las paredes de la cámara. Las fechas señalan el tejido óseo de nueva formación. Las puntas de flecha se encuentran sobre la médula ósea. Barra: 500 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

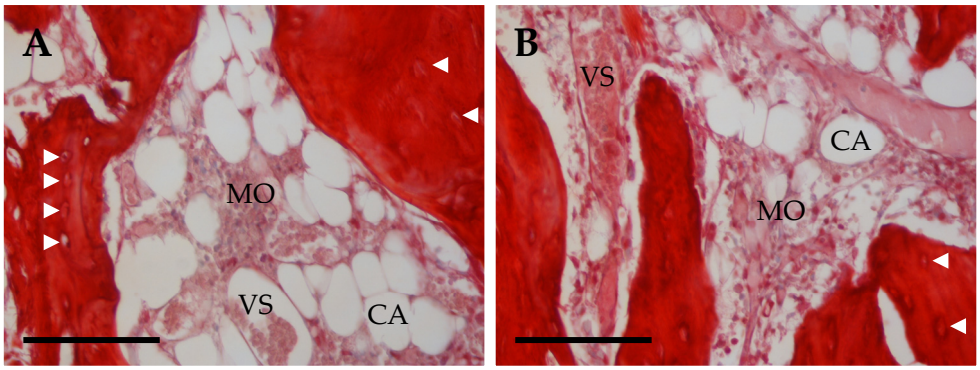


Figura 3.5.3. Estudio histológico de los implantes con células NO-ADH en cámaras de MOD. La técnica utilizada es picrosirio-hematoxilina. Las puntas de flecha señalan los osteocitos. CA: células adiposas; MO: médula ósea; VS: vasos sanguíneos. Barra: 100 µm.

La inmunotinción con anti-colágeno tipo I también indicó que el tejido formado tiene cualidades de hueso, y que su nivel de maduración es alto (compárese con las paredes de la cámara) (**Figura 3.5.2. C**).

Todo lo anterior nos permitió asegurar que el tejido formado por la población de células NO-ADH en el interior de la cámara de MOD, se corresponde con tejido óseo de alto grado de maduración.

En otras zonas de la cámara (**Figura 3.5.2. A2**) se pudo observar un área que presenta gran afinidad por el azul de toluidina (**Figura 3.5.4. A**) y el azul alciano (**Figura 3.5.4. B**), demostrando la presencia de proteoglucanos, componentes de la matriz cartilaginosa. La inmunohistoquímica frente al colágeno tipo II (**Figura 3.5.4. C**) confirmó que ese tejido posee todas las cualidades del cartílago. Al estudiarlo con el tricrómico de Goldner (**Figura 3.5.2. A2**), se aprecia que es un tejido maduro donde se ha iniciado el proceso de osificación, como muestra también la expresión colágeno tipo I (**Figura 3.5.4. D**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

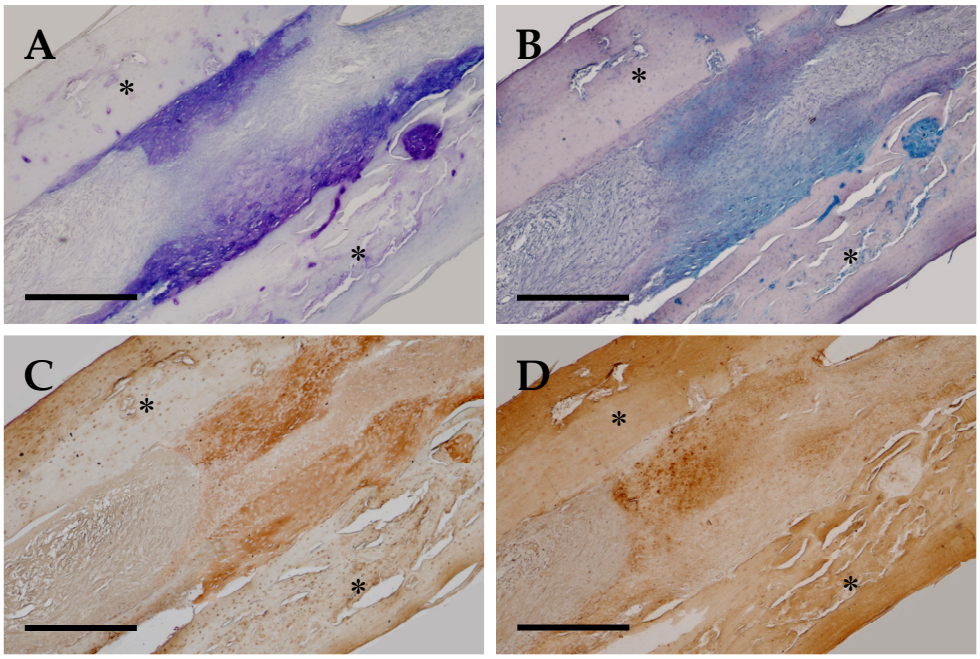


Figura 3.5.4. Estudio histológico de los implantes con células NO-ADH en cámaras de MOD. Las técnicas utilizadas son azul de toluidina (A), azul alciano (B) e inmunohistoquímica frente al colágeno tipo II y I (C, D, respectivamente). Los asteriscos indican las paredes de la cámara. Barra: 500 µm.

3.5.2. Implantes con células de los cultivos MCO y ADH

Una vez demostrado que las condiciones de cultivo en presencia de la matriz de colágeno selecciona una población celular con capacidad condro-osteogénica distinta de la cultivada en el plástico, nos planteamos estudiar las posibles diferencias entre el tejido neoformado en el interior de cámaras de MOD por 1.5 x 10^6 células procedentes de ambos tipos de cultivo (MCO y ADH), en todos los casos tratadas con rhTGF-β1 y osteoinductores, tras 2, 4 y 8 semanas de implantación en el animal. Asimismo, debido a que con el MCO la masa celular que se obtiene es limitada, y que para tratar cualquier problema de reparación esquelética son necesarias gran cantidad de células, también nos pareció interesante estudiar si *in vivo* podría existir un efecto sinérgico para la producción del tejido de interés entre ambas poblaciones.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.5.1.1. Implantes con células cultivadas en el gel de colágeno (MCO)

En el caso de los cultivos MCO, a las 2 semanas post-implante se aprecian condensaciones de fibras colagénicas de color azul por la tinción tricrómica (flechas en la **figura 3.5.5. A**). Además, se observa la presencia de pequeños vasos sanguíneos, de color rojo, repartidos por todo el interior de la cámara (fechas en la **figura 3.5.5. B**).

Después de 4 semanas de implante, la imagen general muestra la formación de grandes placas de un tejido de características similares al hueso trabecular (**Figura 3.5.5. D-I**), que aparece vascularizado y con numerosas cavidades que parecen corresponder a médula ósea. El estudio en detalle de la matriz ósea en formación, muestra numerosos osteoblastos estrechamente relacionados con el hueso maduro (puntas de flecha en la **figura 3.5.5. H**), que se distinguen por ser células de mayor tamaño con un gran núcleo y alineadas en los bordes de las placas ósea en formación, y que además expresan colágeno tipo I (puntas de flecha en la **figura 3.5.5. G**). Esta misma imagen visualizada con luz polarizada muestra una distribución ordenada de las fibras de colágeno propia de un hueso maduro (**Figura 3.5.5. I**).

La tinción con el colorante azul de toluidina (**Figura 3.5.5. E**), que produce la metacromasia en el tejido cartilaginoso, muestra la ausencia de restos de proteoglucanos sulfatados, lo que puede indicar que el origen del hueso sea intramembranoso.

El análisis inmunohistoquímico también reveló la presencia de colágeno tipo I, con lo que se puede afirmar que se trata de tejido óseo. Además, se observan condensaciones de células muy inmunorreactivas bordeando el hueso, que deben corresponder a osteoblastos que están sintetizando la nueva matriz ósea (puntas de flecha en la **figura 3.5.5. G**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

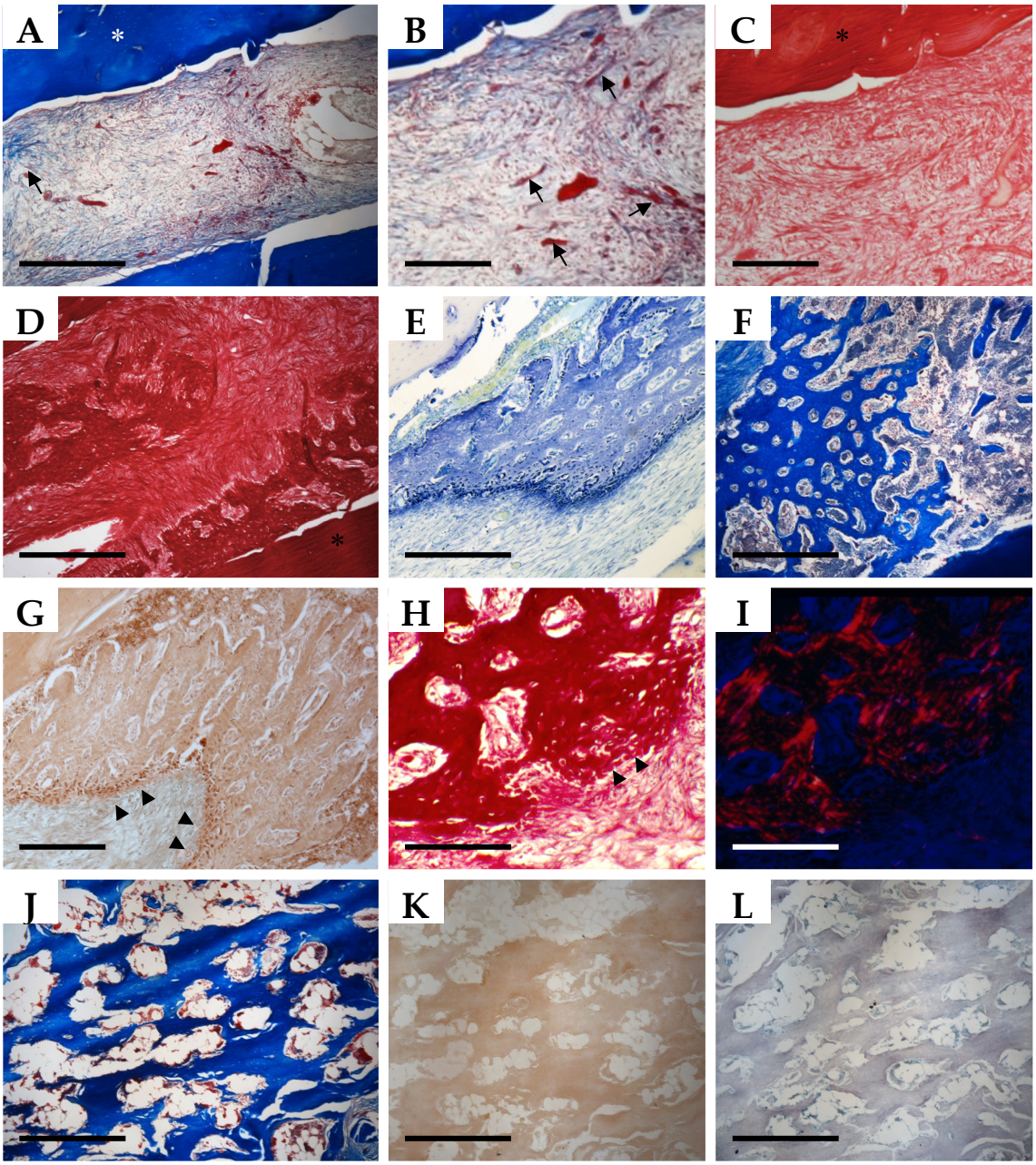


Figura 3.5.5. Estudio histológico de los implantes con células MCO en cámaras de MOD a las 2 (A-C), 4 (D-I) y 8 semanas (J-L). Las técnicas utilizadas son tricrómico de Goldner (A-B, F, J), picrosirio-hematoxilina visto en campo claro (C, D, H) y con luz polarizada (I), azul alciano (L), azul de toluidina (E) e inmunohistoquímica frente al colágeno I (G, K). Los asteriscos indican las paredes de la cámara. Las flechas señalan la condensación de las fibras colagénicas en (A) y los vasos sanguíneos en (B). Las puntas de flecha marcan los osteoblastos. La aparición de un tejido trabecular a las 4 semanas es evidente. Barra: 500 µm en (A, D-G, J-L), 200 µm en (B-C) y 100 µm en (H-I).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tras 8 semanas de implante, se hace muy complicado diferenciar los límites entre la cámara y el tejido óseo formado de nuevo, ya que las paredes de la MOD parecen haber sufrido un proceso de remodelación. Al mismo tiempo, las cavidades medulares han aumentado su tamaño, y en su interior encontramos mayor presencia de células adiposas (**Figura 3.5.5. J-K**). Esta cierta regresión en el tejido, respecto al encontrado a las 4 semanas, quizás sea debida a que pasado un cierto tiempo y agotada la histogénesis originada por las células que se pusieron en la cámara, se inicia un proceso de remodelación, donde la resorción es superior a la formación de tejido.

3.5.1.2. Implantes con células adherentes (ADH)

En los cultivos ADH a las 2 semanas, encontramos un tejido fibroso mucho más denso que en el caso anterior (**Figura 3.5.6. A**), que se tiñe con el azul alciano (**Figura 3.5.6. B**), indicando la presencia de restos ácidos y sulfatados de los proteoglucanos que también forman parte de la matriz de los tejidos conectivos. A estos mismos aumentos, en la **figura 3.5.6. C**, señalado con flechas, se distinguen grupos de células con características morfológicas de condroblastos junto a la pared de la cámara. Pero no se observan fenómenos de vascularización en ningún caso.

Después de 4 semanas, la apariencia general de estos implantes es de amplias zonas ocupadas por un tejido homogéneo con características de cartílago, que se transforma en otro de cualidades tintoriales diferentes, resuelto a trabéculas que dejan entre ellas cavidades ocupadas por un tejido de apariencia medular (**Figura 3.5.6. D-I**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

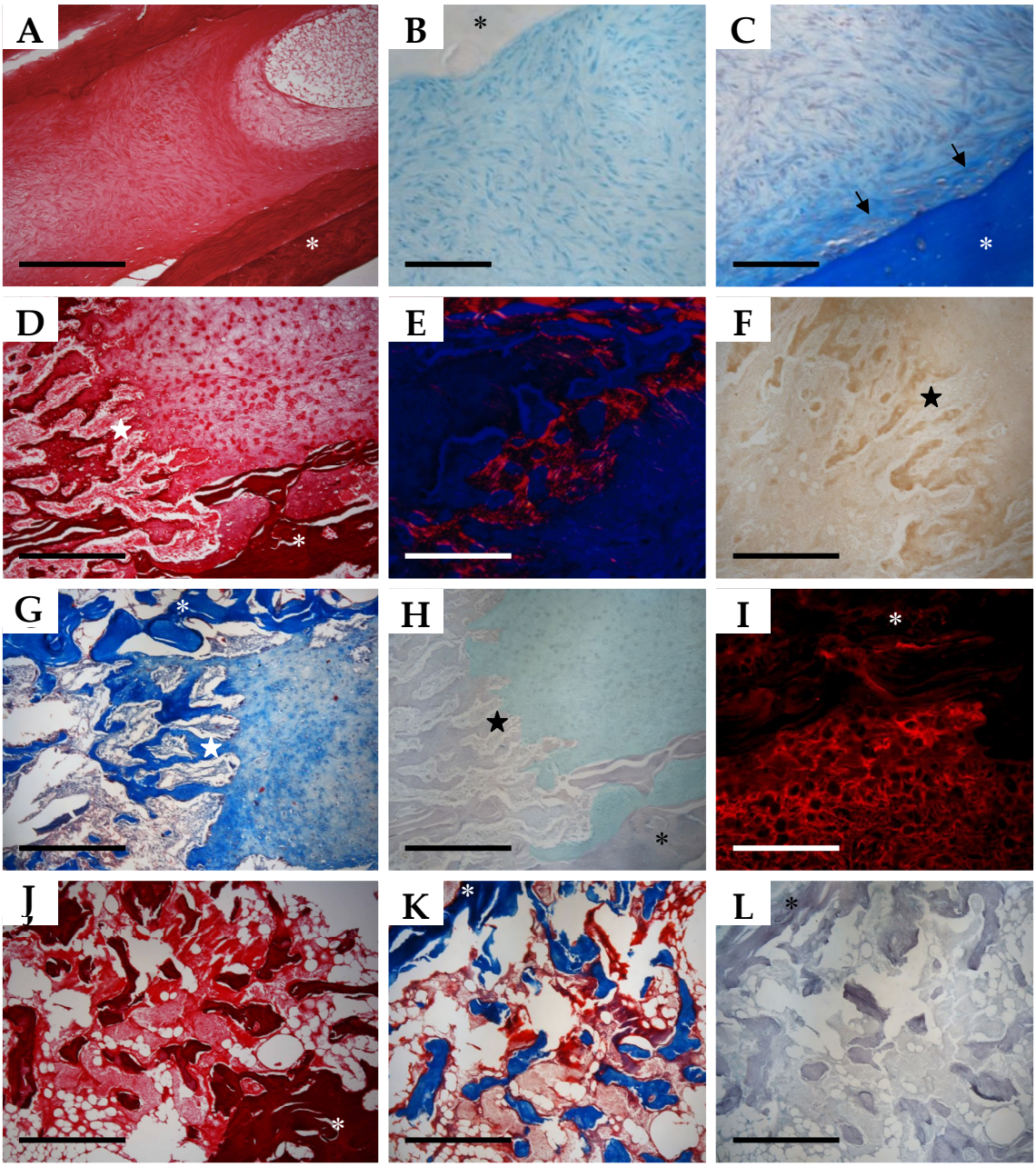


Figura 3.5.6. Estudio histológico de los implantes con células ADH en cámaras de MOD a las 2 (A-C), 4 (D-I) y 8 semanas (J-L). Las técnicas utilizadas son picrosirio-hematoxilina visto en campo claro (A, D, J) y con luz polarizada (E), azul alciano (B, H, L), tricrómico de Goldner (C, G, K), inmunohistoquímica frente al colágeno I (F) e inmunofluorescencia frente al colágeno II (I). Los asteriscos indican las paredes de la cámara. Las flechas señalan los condroblastos. Las estrellas indican el frente de osificación. Barra: 500 µm en (A, D-L) y 200 µm en (B-C).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Al final del período de implantación (8 semanas), observamos que el cartílago ha desaparecido, ocupando su lugar gran cantidad de adipocitos. Asimismo, el hueso que veíamos a las 4 semanas ha madurado, ya no se observan osteoblastos en sus bordes y, aunque en menor medida que en el caso del MCO, ciertas zonas de las paredes de las cámaras también aparecen con grandes cavidades indicativo de inicio de remodelación ósea y del fenómeno de regresión (**Figura 3.5.6. J-L**).

3.5.1.3. Implantes con células de los cultivos MCO y ADH

Como se comentó antes, este experimento se planteó principalmente para investigar *in vivo* la existencia de un posible efecto sinérgico para la producción de tejido entre ambas poblaciones. Para ello, se implantaron un total de 1.5×10^6 células (7.5×10^5 células MCO + 7.5×10^5 células ADH) en cámaras de MOD durante 2, 4 y 8 semanas.

Ya a las 2 semanas se observa la formación de un tejido cartilaginoso propiamente dicho, como demuestra la tinción de azul alciano (**Figura 3.5.7. B**) y la inmunofluorescencia frente al colágeno tipo II (**Figura 3.5.7. C**). En ninguna otra condición estudiada aparece un tejido tan claramente establecido en sólo 2 semanas de implante.

En las 2 semanas siguientes, este cartílago se desarrolla ocupando una parte importante de la cámara (**Figura 3.5.7. D-I**). También es frecuente encontrar grandes áreas ocupadas por hueso, en otras zonas de la cámara (puntas de flecha en las **figuras 3.5.7. D, G**), cuyo origen podría ser intramembranoso ya que no se observan restos de matriz cartilaginosa cuando se tiñen con azul alciano o de toluidina. En estas dos figuras a pocos aumentos se puede apreciar cómo ya a las 4 semanas ha comenzado la remodelación ósea en una de las paredes (estrella en las **figuras 3.5.7. D, G**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

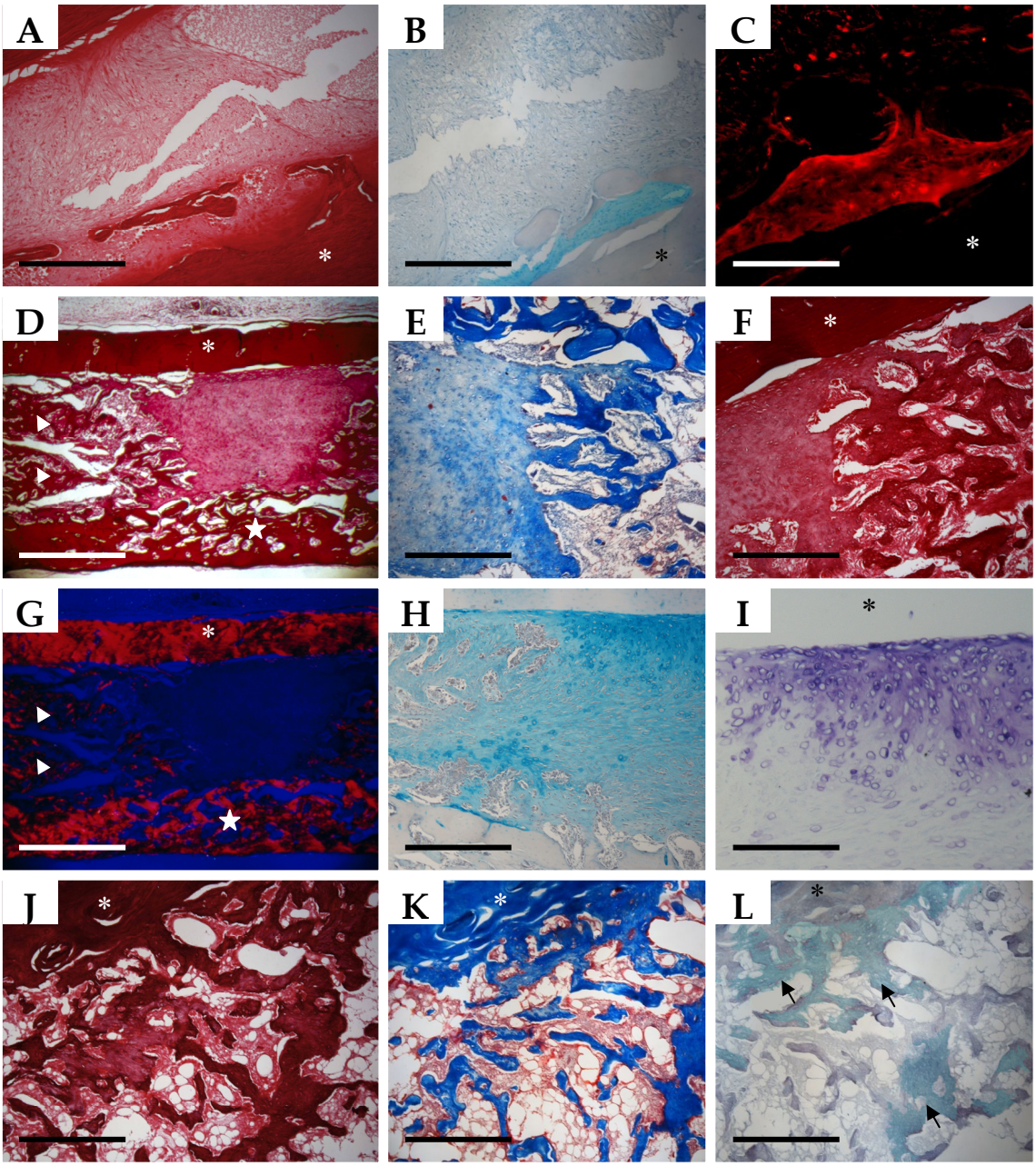


Figura 3.5.7. Estudio histológico de los implantes con mezcla de células MCO y ADH en cámaras de MOD a las 2 (A-C), 4 (D-I) y 8 semanas (J-L). Las técnicas utilizadas son picrosirio-hematoxilina visto en campo claro (A, D, F, J) y con luz polarizada (G), azul alciano (B, H, L), inmunofluorescencia frente al colágeno II (C), tricrómico de Goldner (E, K) y azul de toluidina (I). Los asteriscos indican las paredes de la cámara. Las puntas de flecha señalan el hueso de origen intramembranoso. Las flechas marcan la matriz cartilaginosa. Las estrellas se encuentran sobre la pared de la cámara en fase de remodelación. Barra: 500 µm en (A-B, E-F, H, J-L), 200 µm en (C, I) y 1 mm en (D, G).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Después de 8 semanas post-implante, encontramos algunas diferencias respecto a las cámaras que contenían células de los cultivos MCO y ADH (**Figura 3.5.7. J-L**). En este caso, aún podemos distinguir restos de cartílago teñidos con azul alciano (**Figura 3.5.7. L**), así como osteoblastos depositando nueva matriz, en contacto con el hueso previamente formado, que se observan de color rojo cuando se utiliza la tinción tricrómica de Goldner, en comparación con las fibras de colágeno, que constituyen el hueso maduro, teñidas de azul (**Figura 3.5.7. K**).

Podría decirse que, en general, las células del cultivo MCO forman el hueso ectópico mediante un proceso de osificación intramembranoso, ya que no se observan áreas que respondan a las características del tejido cartilaginoso, mientras que las ADH suelen hacerlo a partir de un molde de cartílago, pues se observa muy frecuentemente zonas en la que coexisten ambos tejidos y signos evidentes de transición entre ellos. Es por eso que cuando se mezclan ambos tipos celulares encontramos los dos fenómenos. Otro detalle que hemos advertido es que tras 8 semanas de implante la capacidad osteogénica de las células de ambos cultivos parece agotada cuando se implantan por separado, a diferencia de lo que ocurre en los implantes con mezcla de células, en los que se siguen encontrando osteoblastos activos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.6. ESTUDIOS DE IMPLANTES ECTÓPICOS PROLONGADOS POR BIOLUMINISCENCIA NO INVASIVA

Gracias a la colaboración que mantenemos con el Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, de Barcelona, grupo liderado por el Dr. Jerónimo Blanco, en el ámbito de la Red de Terapia Celular, hemos implementado en este estudio un procedimiento basado en el empleo del gen de la luciferasa como un trazador de localización, supervivencia y proliferación celular para su monitorización no invasiva por bioluminiscencia (BLI) en los implantes de MOD. En este sentido, nos propusimos comprobar que las células implantadas en las cámaras de MOD no colonizaban órganos y tejidos, ni formaban tumores en los mismos, en el tiempo que permanecen los implantes. Esta técnica también nos permitiría comprobar que las células se mantenían en el interior de las cámaras, con lo que podríamos atribuirles la responsabilidad principal en la formación del tejido correspondiente.

Como se describió en el capítulo de Material y Métodos, esta técnica consiste en marcar las células en cultivo con el gen de la luciferasa, implantarlas en cámaras de MOD subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos y monitorizarlas a través de una reacción catalizada por la luciferasa en la que, tras administrar el sustrato de la reacción, la luciferina, se liberan fotones que son recogidos en un sistema de captación automático y de cuantificación.

Como se muestra en la **figura 3.6.1.**, donde además pudimos comprobar que la inyección local de luciferina resultó en todos los casos más eficiente que la intraperitoneal, los eventos lumínicos se circunscriben exclusivamente al interior de las cámaras, y cómo esta señal va descendiendo con el tiempo de implantación. Este resultado puede ser debido a la disminución de la proliferación, en aras de la diferenciación celular, tras varias semanas de implante, en las cámaras del cultivo con células ADH.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

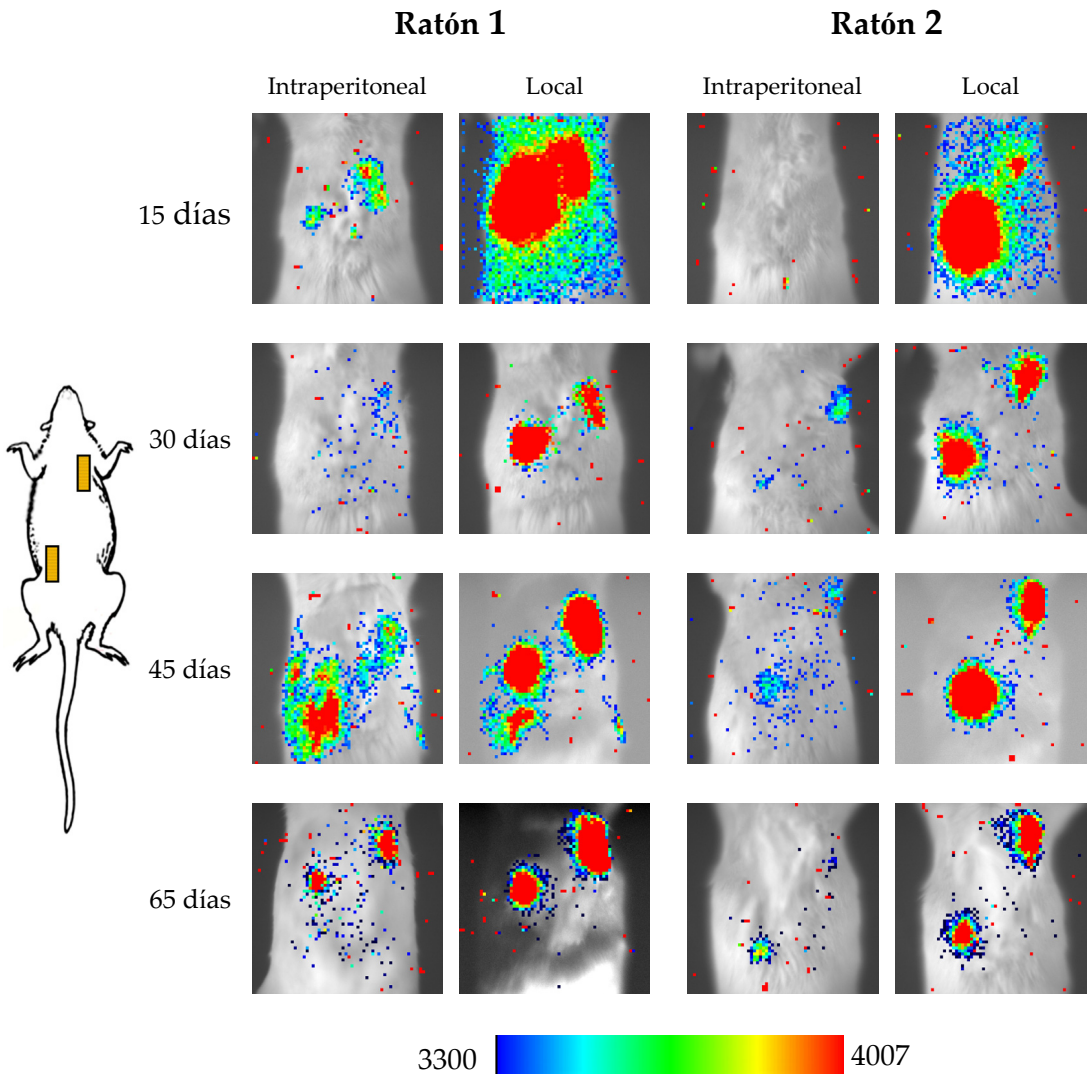


Figura 3.6.1. Resultados de la localización, supervivencia/proliferación celular y ensayo de bioseguridad mediante bioluminiscencia no invasiva en cámaras de MOD de células ADH marcadas con el gen de la luciferasa, tras inyección peritoneal y local de luciferina, a los 15, 30, 45 y 65 días de implante. Se colocaron dos cámaras de MOD por animal, una superior y otra inferior.

Las imágenes tomadas con el animal sacrificado y exponiendo los órganos internos, tras 65 días de implante, no muestran focos de agrupación celular, con lo que, al menos a estos tiempos de estudios descartamos la migración de células desde los implantes a otras localizaciones y la formación de tumores. Únicamente se observan eventos lumínicos en el interior de las cámaras (**Figura 3.6.2.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

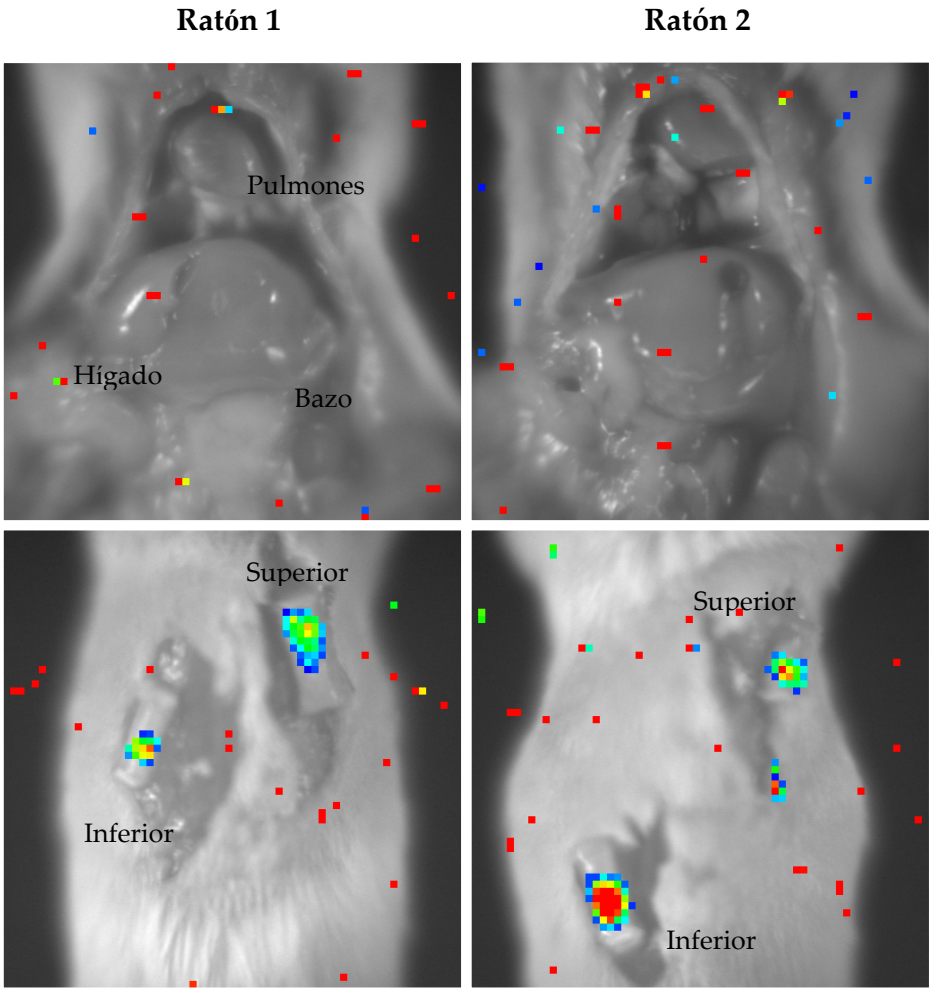


Figura 3.6.2. Ensayo de bioseguridad mediante bioluminiscencia no invasiva en cámaras de MOD de células ADH marcadas con el gen de la luciferasa, tras inyección peritoneal y local de luciferina, a los 65 días de implante. Se analizaron órganos vitales como el pulmón, el hígado y el bazo, de especial relevancia en el alojamiento y residencia de células ectópicas. En las imágenes inferiores se puede ver cómo la acumulación significativa de eventos lumínicos sigue estando sobre los implantes (superior e inferior).

El estudio histológico de las cámaras de MOD extraídas al final del ensayo, y tras el sacrificio de los animales inyectados, mostró la semejanza entre estos resultados y los obtenidos a las 8 semanas en los implantes con células ADH (**Figura 3.6.3.**), donde el cartílago ha sido sustituido por hueso, médula ósea y tejido adiposo. Si bien, en algunos casos se pueden apreciar restos de tejido

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

cartilaginoso en las paredes de las cámaras, inmunorreactivo frente al colágeno tipo II, que podrían ser debidos al anidamiento de células del propio huésped sumado al efecto condroinductor de la MOD (**Figura 3.6.3. D**).

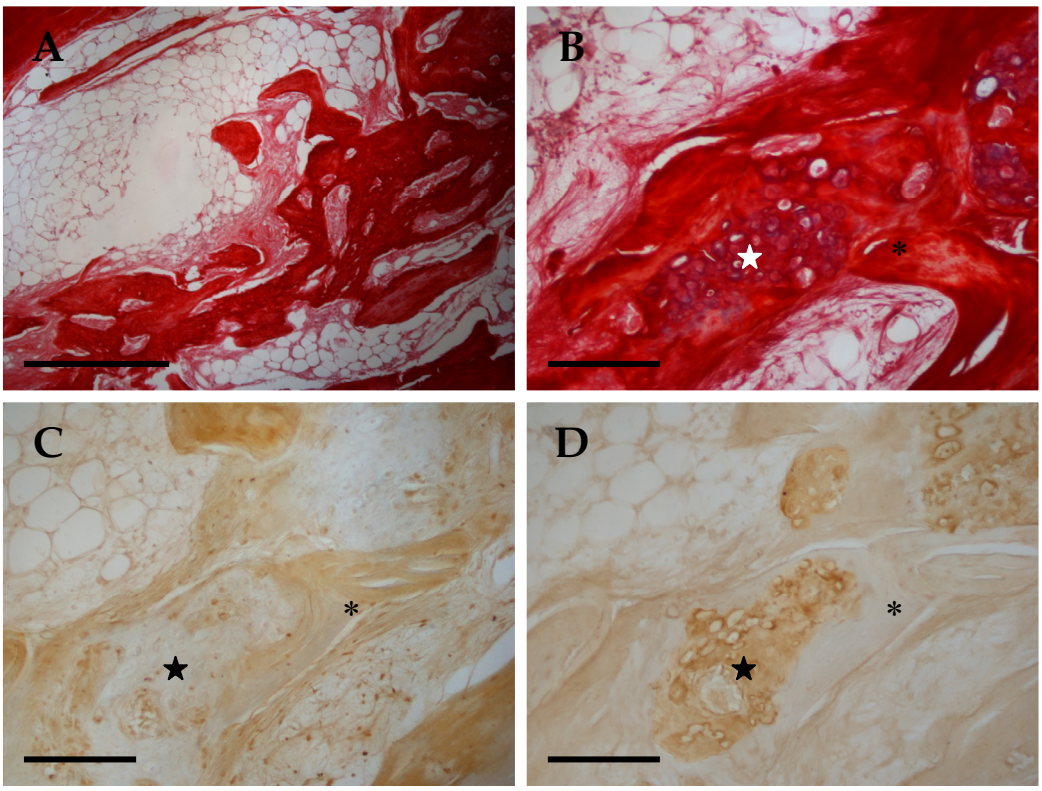


Figura 3.6.3. Estudio histológico de los implantes con células ADH en cámaras de MOD. Las técnicas utilizadas son picrosirio-hematoxilina (A, B) e inmunohistoquímica frente a colágeno I (C) y II (D). Los asteriscos indican las paredes de la cámara. Las estrellas se encuentran sobre la matriz cartilaginosa. Barra: 500 µm en (A) y 200 µm en (B-D).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los investigadores biomédicos conocen las limitaciones que existen al cultivar en placas de Petri o cualquier otra estructura bidimensional (2D), y han expresado la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo que representen mejor el ambiente natural de las células en los tejidos y órganos. Por consiguiente, varios grupos han iniciado experimentos *in vitro* con células troncales embrionarias donde observan que los marcadores de proliferación y diferenciación son significativamente más altos en el cultivo tridimensional (3D) que en el 2D (Chen *et al.,* 2003; Levenberg *et al.,* 2003; Imamura *et al.,* 2004; Baharvand *et al.,* 2006). Sin embargo, hoy en día la mayoría de los trabajos publicados en el campo de la osteogénesis utilizan el cultivo en monocapa para alcanzar la diferenciación osteogénica *in vitro*, mientras que los sistemas 3D, menos desarrollados, no cuentan con un alto grado de repetibilidad, y suelen ser utilizados únicamente como transportadores en los experimentos de implantación *in vivo* en animales. Sin embargo, los trabajos de Hasegawa y cols. (1994) marcaron un precedente importante cuando consiguieron producir tejido con características óseas en cultivos de células de médula ósea de rata, en un gel de colágeno en ausencia de dexametasona. Se demostró que el colágeno I promueve la diferenciación osteoblástica en algunos sistemas celulares, al provocar un incremento de la actividad fosfatasa alcalina y síntesis de osteocalcina y osteopontina, así como cambios en la morfología celular (Masi *et al.,* 1992; Lynch *et al.,* 1995). Del mismo modo, se señaló que la adición de colágeno I parece necesaria para la expresión del fenotipo osteoblástico por células mesenquimales inmaduras (Shi *et al.,* 1996), y que el TGF-β1 en el gel de colágeno realza todavía más el proceso de diferenciación osteogénica (Mizuno *et al.*, 1995).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Con estos antecedentes, nuestro grupo desarrolló un sistema de cultivo para seleccionar, amplificar e inducir los progenitores procedentes de médula ósea hacia los linajes de cartílago y hueso, denominado Método de Capacitación Osteogénica (MCO), que se basa en la interacción de las células con un gel de colágeno I y TGF-β1. Los resultados de estos experimentos indicaron que en estas condiciones se seleccionan células que, tras un período de inducción, expresan marcadores óseos *in vitro* y son capaces de formar cartílago y hueso *in vivo* (Andrades *et al.,* 1999, 2001; Becerra *et al.,* 2006). Basados en estos resultados, nos interesaba profundizar en el conocimiento del sistema.

Por todo ello, el objetivo inicial de esta tesis fue la caracterización celular, mediante citometría de flujo del MCO, además de averiguar si con él estábamos cultivando una o varias poblaciones de células condro-osteoprogenitoras diferentes de las seleccionadas en el cultivo adherente.

4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA SELECCIONADAS TRAS CULTIVOS 3D Y 2D

En principio, se había planteado también un análisis de la expresión génica a nivel de ARN para caracterizar de forma más precisa los atributos moleculares de estas células. Pero debido a que tras probar varios protocolos de extracción no conseguíamos cantidad suficiente de ARN, y que para el análisis en el citómetro de flujo necesitábamos un alto número de células, descartamos este planteamiento. Está bien documentado que un contenido imperceptible o bajo de ARN, al igual que poca fluorescencia para rodamina-123, pequeño tamaño y baja tasa de proliferación, son rasgos distintivos de células inmaduras o no comprometidas (Ratajczak *et al.,* 1998; Juan *et al.,* 1998; Minguell *et al.,* 2001). De ahí la necesidad de realizar los análisis del ciclo celular con ioduro de propidio y de tamaño (FS) y granularidad (SS) por FACS. Estos resultados mostraron que las células del cultivo MCO son de menor tamaño y se mantienen en un estado principalmente quiescente (80% en G_0/G1 y sólo 20% en S/M), a diferencia de las

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

del cultivo ADH que presentan una distribución más acorde con los parámetros de una población proliferante. Esta baja tasa de proliferación de las células del MCO, que en principio es un limitante para la expansión *in vitro,* y por tanto para su uso en terapias regenerativas, puede ser una indicación de que se trata, predominantemente, de células más cerca del estado troncal (madre). Mientras que las cultivadas en 2D, con alta tasa proliferativa, deben estar más cerca del estado de progenitor. Las primeras tendrían más potencialidad y las segundas serían una "realidad aplicable", aunque con una potencialidad más restringida (Winer *et al.,* 2009).

Respecto al inmunofenotipo encontramos grandes diferencias entre ambos sistemas de cultivo. Analizamos la expresión de las moléculas de superficie características del linaje mesenquimal, hematopoyético y endotelial, así como la actividad fosfatasa alcalina que utilizamos como indicador de diferenciación. Los resultados obtenidos en el cultivo de células ADH se corresponden con los descritos en la bibliografía para las MSCs (Deans *et al*., 2000; Bianco *et al*., 2001; Beyer *et al.,* 2006; Dominici *et al*., 2006; Rasmusson *et al*., 2006). Son células que expresan CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271, STRO-1 y HLA-I, y son negativas para CD34, CD45 y HLA-II. En cambio, en el cultivo MCO se distinguen poblaciones celulares de tres linajes diferentes. Por un lado, encontramos células con el inmunofenotipo descrito para los precursores endoteliales, doble positivas para CD34 y CD133, y negativas para CD45 (Asahara *et al.,* 1997, 1999; Shi *et al.,* 1998; Peichev *et al.,* 2000; Kocher *et al.,* 2001), que con el tiempo de cultivo terminan expresando CD49a y CD146, marcadores de células endoteliales maduras. En la literatura reciente existen discrepancias respecto a la expresión de estos marcadores. Mientras algunos autores describen a las células CD133+ como células troncales que pueden diferenciarse en células endoteliales maduras, contribuyendo así a la angiogénesis, por su capacidad natural para ser incorporadas en los focos de neovascularización (Amrani y Port, 2003; Stamm *et al.,* 2003; Agbulut *et al.,* 2004); otros señalan que

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

esta población que expresa CD133, derivada de la médula ósea humana, de la sangre del cordón umbilical o de la sangre periférica, está enriquecida en MSCs capaces de diferenciarse hacia osteoblastos (Tondreau *et al.*, 2005). En otros estudios, realizados con muestras de sangre de donantes escogidos al azar, se ha examinado si las células positivas para fosfatasa alcalina y osteocalcina eran también CD34+. El resultado indica que aproximadamente el 40% de las células que expresan osteocalcina y el 50% que muestran actividad fosfatasa alcalina, coexpresan el antígeno CD34; o a la inversa, que el 30% de las células CD34+ también son positivas frente a la osteocalcina (Eghbali-Fatourechi *et al.*, 2007). Esto corroboró resultados anteriores obtenidos mediante RT-PCR, donde se observó que el 20% de las células CD34+ expresaban el mRNA codificante para la osteocalcina (Matsumoto *et al.*, 2006). Además, tras inyectar por vía sistémica estas células CD34+ en ratas inmunodepremidas con fracturas de fémur, se mostró cómo se localizaban en el lugar de la fractura, se habían diferenciado hacia células endoteliales y osteoblastos, y habían acelerado el proceso de cicatrización.

Todos estos hechos podrían estar indicando la existencia de un precursor común entre células endoteliales y células osteoblásticas, en contra de la idea tradicional de que derivan de progenitores diferentes.

Otra conexión entre tejido óseo y vascular viene de la evidencia de que los pericitos vasculares son también capaces de diferenciarse hacia osteoblastos (Doherty *et al.*, 1998). Al mismo tiempo, se ha demostrado que células CD34+ derivadas de la aorta de rata, bajo las condiciones de cultivo apropiadas, pierden la expresión de CD34 y adquieren las características fenotípicas de los pericitos (positivas frente a la actina de músculo liso-α) (Howson *et al.*, 2005), suscitando la idea de que los vasos sanguíneos no sólo proporcionan la estructura tubular por la que se conduce la sangre, sino que quizás todas sus células son necesarias en los procesos de reparación de las fracturas y/o remodelación del hueso (Crisan *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2008).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En cualquier caso, debemos destacar la importancia, como estrategia para promover angiogénesis y mejorar la reparación de fracturas, de que en nuestro sistema tridimensional se seleccionen células CD133+. Angiogénesis y formación de hueso son inseparables, tanto en el desarrollo como en la reparación de fracturas (Matsumoto *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

Por otro lado, se observa en el MCO la presencia de células del linaje hematopoyético, positivas para CD34, CD45 y HLA-II que, como era de esperar, disminuyen su número con el tiempo de cultivo. En la bibliografía se señala que los progenitores, que darán lugar a las células hematopoyéticas y linfocitos, expresan CD133 y CD117 (Gallacher *et al.*, 2000). Nuevamente, se utiliza el marcador CD133 para describir un tipo de célula troncal, pero existe una diferencia importante entre ambos precursores (hematopoyéticos y endoteliales), la expresión de CD45. En nuestro cultivo MCO la gran mayoría de las células positivas para CD34 y CD133 son CD45 negativas, lo que indicaría que deben corresponder al linaje endotelial más que al hematopoyético.

Por último, también encontramos células positivas para los marcadores mesenquimales CD29, CD44, CD73, CD105, CD166, STRO-1 y HLA-I, pero no para CD90, CD106, CD271 y fosfatasa alcalina (Dominici *et al.*, 2006). Además, con el tiempo de cultivo *in vitro*, observamos cómo la población con características de células MAPCs (positivas para CD13 y CD49b, y negativas para CD34, CD44, CD45, CD90, CD106, HLA-I y II) que al principio es muy escasa (1% aprox.) aumentó significativamente entre los días 10 y 16 (Serafini y Verfaillie, 2008). Todos estos resultados refuerzan la idea de que en el gel de colágeno las células se mantienen en un estado más indiferenciado, menos comprometido, que en el cultivo adherente.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La mayoría de los marcadores se comportan de la misma manera en MSCs humanas y de ratón, aunque el problema actual sigue siendo que no disponemos de un marcador positivo, único y característico, que identifique a las MSCs ni humanas ni de ratón. Además, existen ciertas diferencias entre los distintos estudios. Por ejemplo, la Sociedad Internacional de Terapia Celular propone CD73, CD90 y CD105 como marcadores específicos, aunque no descarta la modificación de este criterio en el futuro si aparecen nuevas moléculas de identificación (Dominici *et al*., 2006). En cambio, otros autores recomiendan STRO-1, CD73 y CD106 como los marcadores de mayor estandarización, y no tienen en cuenta muchos otros por su falta de consistencia en la expresión o especificidad, o por falta de datos suficientes, entre los que incluyen CD10, CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, CD271, Flk-1 y Sca-1 (Kolf *et al.,* 2007). STRO-1 en combinación con CD106, selecciona una población celular en la que se incrementa la frecuencia de unidades formadoras de colonias (CFU-F), manteniendo las características propias de células troncales, como son multipotencialidad, alta expresión de telomerasa y alta tasa de proliferación *in vitro.* No obstante, el uso de STRO-1 se limita al aislamiento y/o identificación de MSCs durante los primeros pases, principalmente porque su expresión disminuye gradualmente con la expansión *in vitro* (Gronthos *et al*., 2003).

Y es que la caracterización se hace muy complicada por el hecho de que las MSCs comparten marcadores con otros tipos celulares como pueden ser células endoteliales, y porque la expresión también depende del método de cultivo y del estadio de diferenciación. Lo que sí está claro es que las MSCs no expresan CD11b, un marcador celular inmunológico; glicoporina-A, un marcador de línea eritroide o CD45. Tampoco el CD31, expresado en células endoteliales y hematopoyéticas; y CD117 (Tuan *et al*., 2003; Kolf *et al*., 2007) (**Tabla 4.1.1.**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 4.1.1. Antígenos de superficie celular identificados en el aislamiento de MSCs humanas (Kolf et al., 2007).

Tipo de marcaje	Antígenos de superficie
Positivos	CD13
	CD29
	CD44
	CD73
	CD105
	CD106
	STRO-1
Negativos	CD11b
	CD31
	CD34
	CD45
	CD117
Variables	CD10
	CD90
	CD271
	Flk-1
	Sca-1

Pensando en las posibles aplicaciones clínicas de nuestro sistema de cultivo tridimensional, como se ha dicho antes, hemos encontrado un gran inconveniente, que es la baja tasa de proliferación. En la búsqueda de otro método para amplificar estas células, previamente seleccionadas por el MCO, la primera elección fue hacerlas crecer en monocapa. Pero el resultado no fue satisfactorio, sólo una minoría se adhirió a la superficie (las denominadas MCO-ADH), mientras la mayoría de las células se mantenían en suspensión (NO-ADH), sin mostrar valores de proliferación destacables.

Al analizar el inmunofenotipo de las NO-ADH se demostró que eran las mismas poblaciones que se encontraban en el MCO a los 10 días, a excepción de las células CD166+. Esto nos pareció especialmente interesante, pues podíamos afirmar que las células que tienen la capacidad de adherirse al plástico son aquellas que tienen en su superficie esta molécula de adhesión. Asimismo, se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

demostraba que en el cultivo 2D se descartan algunas poblaciones celulares por no tener esa capacidad de adhesión. Estas poblaciones, que forman parte del linaje mesenquimal, sí están presentes cuando la médula ósea se cultiva en el MCO.

Respecto a las MCO-ADH, las que se adhirieron tras el MCO, tienen gran similitud con las del cultivo adherente (ADH). Sólo difieren en la expresión significativamente mayor en las primeras de los marcadores CD13 y CD49b, y menor de CD106, moléculas de superficie que se han utilizado para identificar la población de células MAPCs (Jiang *et al.*, 2002; Lakshmipathy y Verfaillie, 2005), así como otros tipos de células troncales pluripotenciales procedentes de la médula ósea que se han descrito recientemente (Orkin y Zon, 2002; Yoon *et al.*, 2005; Quesenberry *et al.*, 2007; Ratajczak *et al.*, 2008, 2009) (**Tabla 4.1.2.**).

Tabla 4.1.2. Fenotipo descrito para distintos tipos de células troncales procedentes de médula ósea (Adaptado de Ratajczak et al., 2008).

MSC (*Mesenchymal Stem Cell*)[1]	**Positivos:** CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, STRO-1 **Negativos:** CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a, HLA-II, vWF **Marcadores de MSCs más indiferenciadas:** CD133, CXCR4, p75LNGFR, CD34 (?)
MAPC (*Multipotent Adult Progenitor Cell*)[1]	**Positivos:** CD13, CD49b, SSEA-1, SSEA-4, Flk-1^{low}, CD90^{low} **Negativos:** CD34, CD44, CD45, CD106, c-kit, HLA-I, HLA-II
hBMSC (*Bone Marrow-derived Multipotent Stem Cell*)[1]	**Positivos:** CD90^{low}, CD105^{low}, c-kit^{low} **Negativos:** CD29, CD44, CD73
MIAMI (*Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cell*)[1]	**Positivos:** CD29, CD63, CD81, CD122, CD164, c-Met, BMPR1B, NTRK3 **Negativos:** CD34, CD36, CD45, c-kit, HLA-II
MASC (*Multipotent Adult Stem Cell*)[1]	**Positivos:** CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD73, CD90, CD105, HLA-I **Negativos:** CD14, CD34, CD38, CD45, CD133, c-kit, HLA-II
VSEL *(Very Small Embryonic Like Stem Cell)*[1]	**Positivos:** CD34, AC133, fosfatasa alcalina fetal, c-Met, CXCR4, LIF-R, SSEA-1 (ratón), SSEA-4 (humano) **Negativos:** CD29, CD45, CD90, CD105, HLA-I, HLA-II, Lin

[1]Fenotipo de células adherentes expandidas
BMPR1B: receptor tipo 1B de la proteína morfogenética ósea; c-Met: receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; LIF-R: receptor del factor inhibidor de leucemia; NTRK3: receptor de la neurotrofina-3; vWF: factor de von Willebrand

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Por lo tanto, este inmunofenotipo podría estar indicando que el cultivo MCO-ADH, formado mayoritariamente por la población CD166+ del MCO, se encuentra menos comprometido que el de las células ADH.

4.2. EL CULTIVO 3D EN GEL DE COLÁGENO COMO FORMA DE SELECCIÓN DE PROGENITORES PLURIPOTENTES

Al cultivar células ADH en nuestro sistema tridimensional (cultivo ADH-MCO), esperábamos obtener, principalmente, cambios en el tamaño celular y un descenso en la expresión de las moléculas de adhesión como CD166, fenómeno que se había observado en el cultivo MCO a los 16 días aunque el porcentaje total de células mesenquimales había aumentado. Sin embargo, se obtuvo más del 80% de las células con el inmunofenotipo de los progenitores pluripotentes del tipo MAPCs, es decir, CD13+ CD49b+ CD44–/^{low} CD106– y HLA-I– (Jiang *et al.,* 2002). Por otro lado, se cumplió nuestra hipótesis, en el sentido de obtenerse un descenso significativo en el tamaño celular (FS) y en el porcentaje de CD166+ ($p<0.001$), sugiriendo que en un cultivo 3D las células dejan de expresar este marcador porque no demandan la necesidad de adhesión a un sustrato. Otra posibilidad que explicaría la escasa presencia del marcador de adhesión, es que su expresión esté unida a cierto grado de diferenciación en las células mesenquimales. Se sabe que ALCAM está involucrado en la osteogénesis durante la morfogénesis del hueso (Bruder *et al.*, 1998), pero no hay nada descrito sobre su expresión en MAPCs.

El siguiente paso fue comprobar, si además del inmunofenotipo, las células ADH-MCO compartían la pluripotencialidad que se les atribuye a las MAPCs. Por ello, se desarrollaron experimentos de diferenciación hacia tejidos derivados de las tres hojas blastodérmicas.

En primer lugar, se demostró que las células ADH-MCO son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos. En comparación con las ADH, tras 21 días de cultivo *in vitro* en presencia de osteoinductores, se obtuvo un incremento

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

significativo en la actividad fosfatasa alcalina y en la formación de depósitos minerales. Esto mismo se observó en el caso de la adipogénesis inducida con insulina y dexametasona, tras 21 días el número de adipocitos fue mayor en el cultivo con características similares a las MAPCs. Respecto a la diferenciación condrogénica, se demostró que las ADH-MCO, a diferencia del cultivo ADH, son capaces de formar micromasas constituidas por un tejido de naturaleza cartilaginosa. Este resultado obtenido en la condroinducción para el cultivo ADH, puede resultar contradictorio con los datos publicados en los últimos años (Naumann *et al.*, 2004; Scharstuhl *et al.*, 2007). Igualmente, está descrito que el potencial de diferenciación de las MSCs disminuye paralelamente con el número de pases (**Figura 4.2.1.**). Tal vez, el hecho de que las células ADH que se utilizaron como control del experimento se encontraban en un pase avanzado (el mismo que para las ADH-MCO) puede haber limitado su capacitación condrogénica.

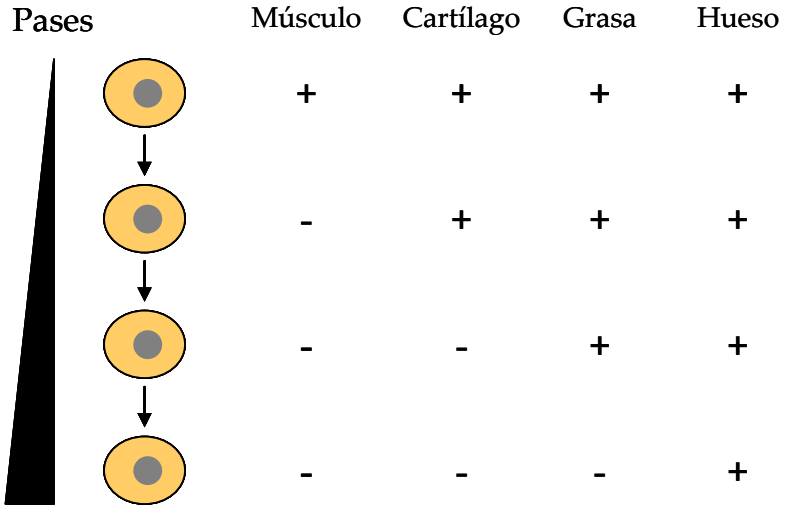


Figura 4.2.1. Potencial de diferenciación de las MSCs en relación al número de pases de cultivo in vitro. (Adaptado de E. Lucarelli, presentación en la Universidad de Málaga, mayo 2009).

Igualmente, tras 14 días de tratamiento con VEGF-B, y su posterior análisis mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia, se observó la presencia de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

células positivas frente a los marcadores característicos del linaje endotelial, como CD31, CD34, CD49a, CD133, CD146, Flk-1 y factor de von Willebrand, del mismo modo que está descrito en otras poblaciones de células pluripotenciales adultas (Reyes *et al.*, 2002).

En segundo lugar, se consiguió diferenciarlas a células derivadas del neuroectodermo. Después de 14 días en presencia de bFGF se observó que la mayoría de las células adquirieron la morfología y el fenotipo característicos de neuronas (β-III tubulina y NF-200), y alrededor de un 10% de células de la glía (GFAP). Lo cierto es que al tratarse de ensayos preliminares, sólo hemos demostrado la adquisición de las características morfológicas y fenotípicas propias de este linaje, quedando por comprobar que las células positivas para β-III tubulina y NF-200 se tratan de neuronas funcionales, es decir, que también adquieren las características bioquímicas y electrofisiológicas de neuronas dopaminérgicas, serotonérgicas y GABA-érgicas (Jiang *et al.*, 2003).

Por último, en este trabajo también se ha demostrado la capacidad de las células ADH-MCO para dar lugar a hepatocitos, células positivas frente a HNF-1, CK-18 y productoras de albúmina (Schwartz *et al.*, 2002). Tal y como ocurría en el caso de la diferenciación condrogénica, las células del cultivo ADH no fueron capaces de desarrollar el fenotipo característico de hepatocitos.

En los últimos años, se ha hecho más evidente que algunas células, como MAPCs y ahora también las ADH-MCO, no sólo pueden generar células maduras de su propio tejido de origen y linaje, sino también de tejidos derivados de otras capas embrionarias. Sin embargo, este fenómeno, denominado plasticidad o capacidad de transdiferenciación de las células troncales adultas, es un asunto muy debatido y controvertido. Algunos trabajos se apoyan en cuatro posibilidades para intentar explicar esta plasticidad (**Figura 4.2.2.**).

1.- La más destacada es aquella que señala que las células troncales correspondientes a un tejido podrían preexistir ya en dicho tejido o en cualquier

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

otro órgano y allí desarrollarse en presencia de determinados estímulos o condiciones microambientales. Es decir, exponen que en la médula ósea no hay una MAPC que se transdiferencia, sino que existen distintas células madre comprometidas a un tejido o TCSC (del inglés *tissue committed stem cell*), que dependiendo del medio inductor que se añada, sobreviven/expanden unas en lugar de otras (Ratajczak *et al.,* 2004; Kucia *et al.,* 2005). Tal vez esto ocurra en determinados cultivos, pero en el caso de las MAPCs se han realizado experimentos de clonación que han demostrado que una única célula fue capaz de diferenciarse en células del mesodermo, ectodermo y endodermo, e inyectada en un blastocito temprano, contribuyó a la mayoría de los tejidos somáticos (Jiang *et al.,* 2002; Lakshmipathy y Verfaillie, 2005; Aranguren *et al.,* 2008).

2.- Varios trabajos han demostrado que al menos algunas de las observaciones de pluripotencialidad podrían estar justificadas por procesos de fusión entre las células troncales trasplantadas y las células residentes (Ying *et al.,* 2002; Lucas y Terada *et al.,* 2003; Spees *et al.,* 2003). El fenómeno de fusión se suele acompañar con la formación de células con características de ambos tipos fusionados, y generalmente con doble dotación cromosómica, lo que induce una desventaja proliferativa.

3.- De la misma manera que ocurre durante el proceso de reprogramación, es posible que las células troncales adultas, en determinadas circunstancias, puedan desdiferenciarse para posteriormente diferenciarse hacia células de distinta estirpe (Odelberg *et al.,* 2000; Rideout *et al.,* 2001; Gurdon y Melton, 2008). Esto es lo que podría estar ocurriendo en nuestro caso, es decir, células ADH comprometidas se desdiferencian en el gel de colágeno tipo I y en presencia de rhTGF-β1, adquiriendo el fenotipo descrito de células troncales adultas, para posteriormente rediferenciarse a tejidos de las tres hojas blastodérmicas con los estímulos adecuados.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

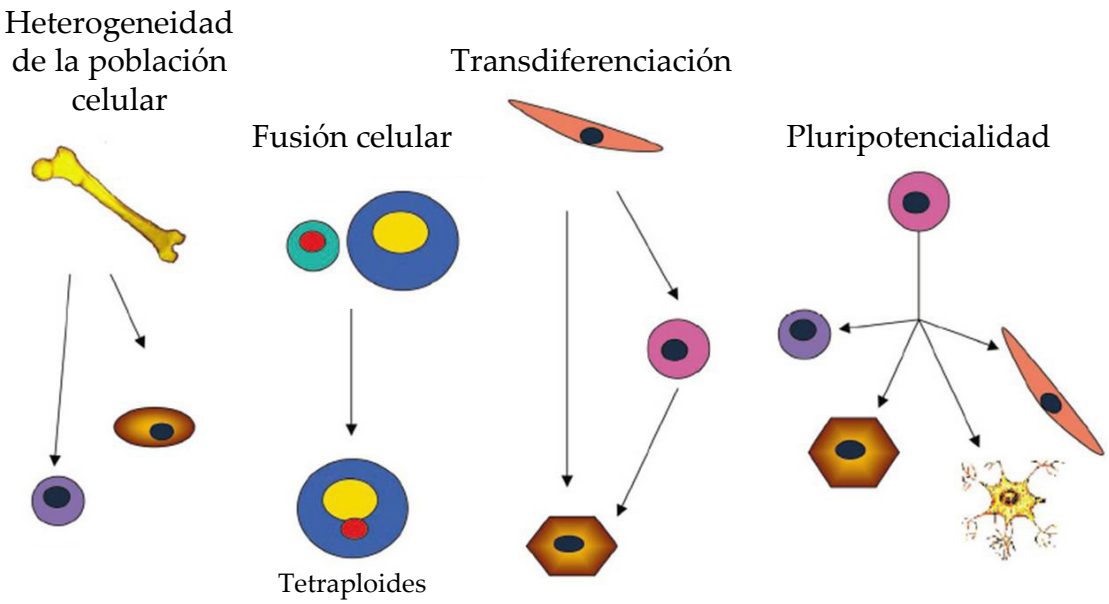


Figura 4.2.2. Posibles mecanismos de potencialidad de las células troncales adultas. (Adaptado de Prósper y Verfaillie, 2003).

4.- Finalmente, es posible que en el organismo adulto persistan células madre indiferenciadas, remanentes de tejido embrionario con capacidad pluripotencial.

Todos estos resultados obtenidos en los cultivos ADH-MCO despiertan unas enormes expectativas en el campo de la terapia celular y la medicina regenerativa, ya que establecen la base conceptual y experimental adecuada para obtener células pluripotentes de manera sencilla y reproducible, cultivando células adherentes en matrices de colágeno I en combinación con rhTGF-β1 durante seis días.

4.3. LOS IMPLANTES ECTÓPICOS PARA EL ESTUDIO DE LA CAPACITACIÓN CONDRO-OSTEOGÉNICA *IN VIVO*

4.3.1. Implantes con células NO-ADH

Después de demostrar que había células del linaje mesenquimal en la población NO-ADH, debíamos comprobar si tenían potencial osteogénico. En la bibliografía se ha descrito que este tipo de células, que son eliminadas del

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

cultivo primario con el primer cambio de medio, expresan proteínas relacionadas con el linaje osteoblástico, como fosfatasa alcalina y osteocalcina *in vitro* (Long *et al.,* 1990, 1995, 1999; Falla *et al.,* 1993; Eipers *et al.,* 2000), y son capaces de formar tejido óseo, incluso cuando se implantan en el riñón (Włodarski *et al.,* 2004). En otros casos, se han implantado estas fracciones adherentes y no adherentes de la médula ósea marcadas con GFP en ratones irradiados para comparar la reconstitución hematopoyética y mesenquimal. Los resultados mostraron que las células estromales adherentes no contribuyeron a la reconstitución hematopoyética, y sólo un 0-2% de los osteoblastos u osteocitos eran GFP positivos. Sin embargo, cuando el mismo experimento se repitió utilizando las células no adherentes, más del 90% de los leucocitos, eritrocitos y plaquetas expresaban GFP; y lo más importante, más del 50% de los osteoblastos u osteocitos también eran GFP+ (Dominici *et al.,* 2004).

Por todo esto, planteamos el ensayo de osificación ectópica en las cámaras de matriz ósea desmineralizada (MOD), de composición colagénica, y capacidad osteoinductora por su contenido de BMPs (Urist, 1965; Becerra *et al.,* 1996; Zhang *et al.,* 1997; Geesink *et al.,* 1999). En ellas se comprobó que el tejido formado por estas células NO-ADH se corresponde con un hueso esponjoso propiamente dicho, por ser inmunorreactivo frente al colágeno tipo I, componente orgánico mayoritario del tejido óseo, que se encuentra vascularizado y en cuyo interior se forma un tejido medular en el cual podemos encontrar todos los componentes típicos de una médula ósea. También encontramos otro tipo de condensación tisular con las características morfológicas y fenotípicas de la matriz cartilaginosa, por la presencia de proteoglucanos y colágeno tipo II, donde ya se ha iniciado el proceso de osificación endocondral. Este hecho se puso de manifiesto mediante el tricrómico de Goldner, así como con la inmunohistoquímica, que demostraron la presencia de fibras de colágeno tipo I mineralizadas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.3.2. Implantes de células de los cultivos MCO y ADH

El estudio histológico de las cámaras con células de los cultivos MCO y ADH tratados con rhTGF-β1 y osteoinductores, después de 2, 4 y 8 semanas de implante, mostró diferencias relevantes entre ambos sistemas de cultivo.

Una de ellas es la formación de gran cantidad de vasos sanguíneos tan sólo en las cámaras con células del cultivo MCO, que se observa con claridad a las dos semanas de implante con la tinción tricrómica. Es lógico pensar que los responsables de este fenómeno de angiogénesis deben ser los precursores endoteliales que se identificaron con la citometría de flujo, y que no están presentes en los cultivos adherentes (Amrani y Port, 2003; Stamm *et al.*, 2003; Agbulut *et al.*, 2004).

Por otro lado, otra diferencia muy significativa que se observa está relacionada con el tipo de tejido ectópico que se forma en el interior de las cámaras a las cuatro semanas. En el caso del cultivo MCO se trata de un tejido óseo trabecular, rodeado por gran cantidad de osteoblastos, muy vascularizado y con numerosas cavidades rellenas de un tejido asimilable a médula ósea. Mientras que las células ADH forman un tejido cartilaginoso, que se calcifica por sus bordes y que ocupa casi toda la cámara.

Aunque no se ha realizado ningún estudio específico encaminado a demostrar el tipo de osificación, por los datos indirectos obtenidos, consideramos que en el cultivo MCO la formación del hueso debe ser intramembranosa. No se encuentran células morfológicamente similares a condrocitos hipertróficos ni cartílago en fase de calcificación, como tampoco restos de proteoglucanos, que se ponen de manifiesto con la tinción con azul alciano y de toluidina. En cambio, para las células ADH el proceso de osificación es más probable que sea de tipo endocondral, pues se realiza sobre un tejido cartilaginoso previo, fácilmente identificable en todos los implantes realizados.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Cuando las células de los dos sistemas de cultivo son implantadas en la misma cámara se observan los dos tipos de condensaciones tisulares, en los extremos el hueso trabecular de origen intramembranoso, y en el centro masas de cartílago en cuyos bordes pueden observarse trasformación hacia tejido óseo. Asimismo, se muestra un efecto potenciador entre ambas poblaciones celulares, ya que a las dos semanas se observa un grado de histogénesis más avanzado, con un tejido cartilaginoso propiamente dicho, y tras ocho semanas aún se siguen encontrando osteoblastos activos y restos de matriz cartilaginosa, lo que indica que el proceso de osificación mantiene la actividad durante más tiempo que cuando se implantan ambos tipos celulares por separado.

4.4. BIOSEGURIDAD

Los tratamientos basados en la terapia celular requieren la utilización de una cantidad de células progenitoras muy superior a la obtenida de los donantes sea cual sea su origen, haciendo necesaria la expansión *in vitro* de estas células antes de su utilización terapéutica. Esta proliferación puede conllevar daño en el genoma de las células, que podrían provocar anomalías, incluida su transformación oncogénica. La generación de un tumor a partir de células normales está considerado como un proceso de múltiples pasos en los que se han alterado o eliminado varios puntos de control (Hahn y Weinberg, 2002). Esas alteraciones dan lugar a la aparición de una combinación de características específicas de los tumores, como factores de crecimiento independientes, evasión de las señales de inhibición del crecimiento, insensibilidad a los factores pro-apoptóticos, proliferación y neoangiogénesis ilimitadas, además de invasión del tejido y metástasis (García-Castro *et al.*, 2008).

Desde hace algunos años, se conoce que las células troncales y las células cancerosas comparten ciertas características, como la capacidad de renovación y el potencial de diferenciación. Recientemente, diferentes grupos han identificado una población de células pequeñas dentro de la masa tumoral que

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

presentan ambas características, y a las que se las ha denominado células madre cancerígenas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*) (Al-Hajj *et al.,* 2003; Singh *et al.,* 2003). Por lo que algunos grupos han propuesto, debido a las similitudes que existen entre ambos tipos celulares, que las CSCs son células troncales que han sufrido un proceso de transformación (Reya *et al.,* 2001).

Además, estudios recientes han descrito la transformación espontánea de MSCs humanas (Rubio *et al.,* 2005). En estos y otros experimentos se ha observado la formación de sarcomas en ratones inmunodeprimidos por la implantación de MSCs murinas o humanas aisladas de médula ósea y expandidas *in vitro* (Burns *et al.,* 2005; Robinson *et al.,* 2005; Tolar *et al.,* 2007).

Por estos motivos, y pensando en la posible aplicación clínica de algunas de las poblaciones celulares estudiadas en esta tesis, se desarrollaron los experimentos de bioseguridad utilizando la bioluminiscencia no invasiva como metodología. Con este análisis luminométrico se ha podido demostrar que las células derivadas de la médula ósea capacitadas *in vitro* e implantadas en cámaras de MOD en animales inmunodeprimidos, tienen la capacidad de formar hueso y cartílago *in vivo*, pero no invaden órganos como bazo, pulmones e hígado, ni desarrollan tumores en los mismos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CONCLUSIONES

1.- Con un método basado en matrices tridimensionales (MCO) pueden seleccionarse otras poblaciones de células madre mesenquimales (MSCs) de la médula ósea diferentes de la cultivada en el sistema bidimensional habitual.

2.- Las MSCs cultivadas en el gel de colágeno, en combinación con rhTGF-β1, se mantienen en un estadio más indiferenciado que las del cultivo adherente.

3.- El MCO estudiado ha demostrado ser muy eficaz para seleccionar una población no adherente de progenitores osteogénicos presente en la médula ósea, entre otras, así como una población de precursores endoteliales, de gran interés porque pueden diferenciarse en células endoteliales maduras y contribuir a la neovascularización, fundamental para el proceso de reparación ósea.

4.- Las células adherentes humanas cultivadas durante 6 días en el sistema tridimensional (ADH-MCO) sufren un proceso de desdiferenciación, adquiriendo el fenotipo de los progenitores pluripotentes del tipo MAPC.

5.- Las células ADH-MCO son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia tejidos derivados de las tres hojas blastodérmicas: mesodermo (hueso, cartílago, grasa y endotelio), neuroectodermo (neuronas y células de la glía) y endodermo (hepatocitos), cuando se las induce con los medios adecuados.

6.- Los ensayos de histogénesis *in vivo* en cámaras de matriz ósea desmineralizada (MOD) han mostrado que las células del cultivo MCO forman el hueso ectópico principalmente mediante un proceso de osificación intramembranoso, mientras que las ADH lo hacen mediante osificación endocondral. Al mezclarlas en la misma cámara se identifican ambos procesos,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

así como un efecto potenciador, ya que se adelanta el inicio de la condro-osteogénesis y la histogénesis se mantiene activa durante más tiempo.

7.- Experimentos de bioluminiscencia no invasiva han permitido demostrar que las células derivadas de la médula ósea capacitadas *in vitro* e implantadas en cámaras de MOD en ratones inmunodeprimidos, tienen la capacidad de formar hueso y cartílago *in vivo*, permanecen en el interior del implante, no invadiendo órganos ni tejidos vecinos, ni desarrollando tumores.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 2000; 15:663-73.

Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, Larghero J, Ghostine S, Léobon B, Robidel E, Borsani P, Le Lorc'h M, Bissery A, Chomienne C, Bruneval P, Marolleau JP, Vilquin JT, Hagège A, Samuel JL, Menasché P. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:458-63.

Airas L, Niemelä J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol* 1997; 136:421-31.

Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugghe 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* 2002; 16:2813-28.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:3983-8.

Alonso M, Claros S, Becerra J, Andrades JA. The effect of type I collagen on osteochondrogenic differentiation in adipose-derived stromal cells *in vivo*. *Cytotherapy* 2008; 10:597-610.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Alvarez J, Costales L, Serra R, Balbin M, Lopez JM. Expression patterns of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor during epiphyseal ossificación. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1011-21.

Amrani DL, Port S. Cardiovascular disease: potential impact of stem cell therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003; 1:453-61.

Andrades JA, Becerra J. Bone morphogenetic proteins, collagen matrices and mesenchymal stem cells. En: *Advances In Skeletal Reconstruction Using Bone Morphogenetic Proteins*, Ed. World Scientific 2002; 2:54-62.

Andrades JA, Becerra J. Type I collagen and a recombinant TGF-β1 serve as a scaffold for mesenchymal stem cells. En: *Advances In Tissue Banking,* Ed. World Scientific 2002; 6:283-311.

Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME. A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res* 1999; 250:485-98.

Andrades JA, Han B, Nimni ME, Ertl DC, Simpkins RJ, Arrabal MP, Becerra J. A modified rhTGF-beta1 and rhBMP-2 are effective in initiating a chondro-osseous differentiation pathway in bone marrow cells cultured in vitro. *Connect Tissue Res* 2003; 44:188-97.

Andrades JA, Santamaría JA, Nimni ME, Becerra J. Selection, amplification and induction of a bone marrow cell population to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an *in vitro* and *in vivo* study. *Int J Dev Biol* 2001; 45:689-93.

Aono A, Hazama M, Notoya K, Taketomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, Sasaki S, Fujisawa Y. Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210:670-7.

Aranguren XL, McCue JD, Hendrickx B, Zhu XH, Du F, Chen E, Pelacho B, Peñuelas I, Abizanda G, Uriz M, Frommer SA, Ross JJ, Schroeder BA, Seaborn MS, Adney JR, Hagenbrock J, Harris NH, Zhang Y, Zhang X,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Nelson-Holte MH, Jiang Y, Billiau AD, Chen W, Prósper F, Verfaillie CM, Luttun A. Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs in mice. *J Clin Invest* 2008; 118:505-14.

Armitage JO. Medical progress: bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330:827-38.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005; 97:512-23.

Asahara T, Másuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85:221-8.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-7.

Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; 159:123-34.

Asbury CL, Esposito R, Farmer C, van den Engh G. Fluorescente spectra of dna dyes measured in a flow cytometry. *Cytometry* 1996; 24:234-42.

Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 1980; 151:294-307.

Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258:7155-60.

Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentitation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systmes *in vitro. Int J Dev Biol* 2006; 50:645-52.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Barboni E, Rivero BP, George AJ, Martin SR, Renoup DV, Hounsell EF, Barber PC, Morris RJ. The glycophosphatidylinositol anchor affects the conformation of Thy-1 protein. *J Cell Sci* 1995; 108:487-97.

Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor β. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1032:79-87.

Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture healing. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1805-15.

Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265:134-9.

Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* 1999; 65:83-9.

Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1703-14.

Becerra J, Andrades JA, Santamaría JA, Cifuentes M, Guerado E. Bone regeneration, cell therapy and tissue engineering *Med Clin (Barc)* 2001; 116:23-34.

Becerra J, Cifuentes M, Guerado E, Andrades JA. Composición para la reparación ósea y cartilaginosa. Nº registro patente: P200401227, PCT/ES2005/000287 (2005).

Becerra J, Guerado E, Claros S, Alonso M, Bertrand ML, González C, Andrades JA. Autologous human-derived bone marrow cells exposed to a novel TGF-beta1 fusion protein for the treatment of critically sized tibial defect. *Regen Med* 2006; 1:267-78.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114:763-76.

Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D, Lopez M. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004; 103:3313-9.

Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 1989; 240:270-80.

Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal stem cells: isolation *in vitro* expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 174:249-82.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. Bone marrow stromal cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19:180-92.

Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200: 165-70.

Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, Borsotti C, Del Bo R, Fortunato F, Salani S, Quirici N, Bertolini F, Gobbi A, Deliliers GL, Pietro Comi G, Soligo D. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp Cell Res* 2004; 295:66-78.

Bostrom MPG, Asnis P. Transforming growth factor beat in fracture repair. *Clin Orthop* 1998; 355 Suppl:S124-31.

Botchkarev VA. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J Invest Dermatol* 2003; 120:36-47.

Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; 13:655-63.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Burns JS, Abdallah BM, Guldberg P, Rygaard J, Schrøder HD, Kassem M. Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2005; 65:3126-35.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425:841-6.

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213:341-7.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9:641-50.

Caplan AI. The mesengenic process. *CIin Plast Surg* 1994; 21:429-35.

Cawston TE, Wilson AJ. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20:983-1002.

Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor –â receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267:19027-30.

Cheifetz S, Hernández H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massagué J. Distinct transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 1990; 265:20533-8.

Chen SS, Revoltella RP, Papini S, Michelini M, Fitzgerald W, Zimmerberg J, Margolis L. Multilineage differentation of rhesus monkey embryonic stem cells in three-dimensional culture systems. *Stem Cells* 2003; 21:281-95.

Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A:1544-52. Erratum in: *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A:141.

Chilods CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79:5312-6.

Chu L, Jiang Y, Hao H, Xia Y, Xu J, Liu Z, Verfaillie CM, Zweier JL, Liu Z. Nitric oxide enhances Oct-4 expression in bone marrow stem cells and promotes endothelial differentiation. *Eur J Pharmacol* 2008; 591:59-65.

Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisén J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288:1660-3.

Claros S, Alonso M, Becerra J, Andrades JA. Selection and induction of rat skeletal muscle-derived cells to the chondro-osteogenic lineage. *Cell Mol Biol* 2008; 54:1-10.

Cotteret S, Belloc F, Boiron JM, Bilhou-Nabera C, Dumain P, Boyer C, Lacombe F, Reiffers J, Bernard P. Fluorescent *in situ* hybridization on flow-sorted cells as a tool for evaluating minimal residual disease or chimerism after allogenic bone marrow transplantation. *Cytometry* 1998; 34:216-22.

Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006; 20:557-70.

Craig W, Kay R, Cutler RL, Landsorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993; 177:1331-42.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3:301-13.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 1995; 16:521-7.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26:2287-99.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119:2204-13.

Dai SM, Matsuno H, Nakamura H, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin-18 enhances monocyte tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta production induced by direct contact with T lymphocytes: implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:432-43.

Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 398-418.

Datta N, Holtorf HL, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005; 26:971-7.

de Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1928-42.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28:875-84.

Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002; 143:1545-53.

Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 2002; 170:73-82.

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-β

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316:701-5.

Diefenderfer DL, Brighton CT. Microvascular pericytes express aggrecan message which is regulated by BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269:172-8.

Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential *in vitro* and *in vivo. J Bone Miner Res* 1998; 13:828-38.

Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999; 9:1-17.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Staper 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; 8:315-17.

Dominici M, Pritchard C, Garlits JE, Hofmann TJ, Persons DA, Horwitz EM. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:11761-6.

Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22:53-4.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89:747-54.

Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 1995; 9:2795-807.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Eaker SS, Hawley TS, Ramezani A, Hawley RG. Detection and enrichment of hematopoietic stem cell by side population phenotype. *Methods Mol Biol* 2004; 263:161-80.

Eghbali-Fatourechi GZ, Mödder UI, Charatcharoenwitthaya N, Sanyal A, Undale AH, Clowes JA, Tarara JE, Khosla S. Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone* 2007; 40:1370-7.

Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A:1425-35.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998; 355 Suppl:S7-21.

Eipers PG, Kale S, Taichman RS, Pipia GG, Swords NA, Mann KG, Long MW. Bone marrow accessory cells regulate human bone precursor cell development. *Exp Hematol* 2000; 28:815-25.

Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 1995; 80:371-8.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-6.

Falla N, Van Vlasselaer, Bierkens J, Borremans B, Schoeters G, Van Gorp U. Characterization of a 5-fluorouracil-enriched osteoprogenitor population of the murine bone marrow. *Blood* 1993; 82:3580-91.

Farnum CE, Wilsman NJ. Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage. *Anat Rec* 1987; 219:221-32.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-30. Erratum in: *Science* 1998; 281:923.

Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004; 2:18.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

François S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Saché A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24:1020-9.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated Mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4:267-74.

Fromigué O, Marie PJ, Lomri A. Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1998; 68:411-26.

Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000; 95:2813-20.

García-Castro J, Rubio D, Bernad A. Biosafety issues in human cell therapy. En: *Cell Therapy*, Ed. McGraw Hill 2008; 57-69.

Gazzerro E, Gangji V, Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 1998; 102:2106-14.

Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81:710-8.

Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004; 427:148-54.

Gerstenfeld LC, Barnes GL, Shea CM, Einhorn TA. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res* 2003; 44 Suppl 1:85-91.

Gonçalves R, Lobato da Silva C, Cabra JM, Zanjani ED, Almeida-Porada G. A Stro-1(+) human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system. *Exp Hematol* 2006; 34:1353-9.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183:1797-806.

Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8:607-12.

Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 2006; 207:331-9.

Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog. *J Orthop Res* 2001; 19:18-25.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; 116:1827-1835.

Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vögele-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, Watzek G. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng* 2005; 11:896-903.

Guo Y, Follo M, Geiger K, Lübbert M, Engelhardt M. Side-population cells from different precursor compartments. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12:71-82.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Gurdon JB, Melton DA. Nuclear reprogramming in cells. *Science* 2008; 322:1811-5.

Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:331-41.

Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ, Ghosh-Choudhury N, Wozney J, Mundy GR. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1994; 9:855-63.

Hasegawa T, Oguchi H, Mizuno M, Kuboki Y. The effect of the extracellular matrix on differentiation of bone marrow stromal cells to osteoblasts. *Jpn J Oral Biol* 1994; 36:383-94.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13:69-80.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390:465-71.

Herndon DN, Nguyen TI, Gilpin DA. Growth factors. Local and systemyc. *Arch Surg*1993; 128:1227-33.

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102:3483-93.

Howell JC, Lee WH, Morrison P, Zhong J, Yoder MC, Srour EF. Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996:158-73.

Howson KM, Aplin AC, Gelati M, Alessandri G, Parati EA, Nicosia RF. The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289:C1396-407.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 2004; 8:498-508.

Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med* 2003; 141:342-9.

Huang W, Rudkin GH, Carlsen B, Ishida K, Ghasri P, Anvar B, Yamaguchi DT, Miller TA. Overexpression of BMP-2 modulates morphology, growth, and gene expression in osteoblastic cells. *Exp Cell Res* 2002; 274:226-34.

Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF 3rd, Boiani M, Schöler HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300:1251-6.

Imamura T, Cui L, Teng R, Johkura K, Okouchi Y, Asanuma K, Ogiwara N, Sasaki K. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies in three-dimensional culture system form hepatocyte-like cells *in vitro* and *in vivo*. *Tissue Eng* 2004; 10:1716-24.

Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, López-Otín C, Krane SM. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:17192-7.

Ishibe M, Nojima T, Ishibashi T, Koda T, Rosier RN, Puzas JE, Kaneda K. Comparison of the type- 2 insulin-like growth factor receptor in normal osteoblasts and osteosarcoma-derived osteoblasts-like cells. *J Orthop Res* 1995; 13:643-8.

Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 1996; 13:291-300.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Itoh T, Mochizuki M, Nishimura R, Matsunaga S, Kadosawa T, Kokubo S, Yokota S, Sasaki N. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J Vet Med Sci* 1998; 60:451-8.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107:1395-402.

Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 2002; 9:642-7.

Ji KH, Xiong J, Hu KM, Fan LX, Liu HQ. Simultaneous expression of Oct4 and genes of three germ layers in single cell-derived multipotent adult progenitor cells. *Ann Hematol* 2008; 87:431-8.

Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1:11854-60.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-9.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; 30:896-904.

Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in *vivo*. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47:126-31.

Juan G, Darzynkiewicz Z. Cell cycle analysis by flow and laser scanning cytometry. *Cell Biol* 1998; 1:261–74.

Kalwak K, Turkiewicz D, Ussowicz M, Gorczynska E, Toporski J, Ryczan R, Rybka B, Noworolska-Sauren D, Chybicka A. Clinical value of the flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

spontaneous activation of T-cell subpopulations is associated with acute GvHD. *Transplant Proc* 2003; 35:1559-62.

Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands and cytokines. *Circulation* 2001; 104:1046-52.

Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Kobayashi T, Nishiyama K, Fukase M, Kumegawa M, Chihara K. Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1681-90.

Kaneko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, Nakagawa M, Toyama Y, Yabe Y, Kumegawa M, Hakeda Y. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 2000; 27:479-86.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002; 8:147-59.

Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994; 127:1755-66. Erratum in: *J Cell Biol* 1995; 128:713.

Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 2005; 23:412-23.

Kim MK, Niyibizi C. Interaction of TGF-beta1 and rhBMP-2 on human bone marrow stromal cells cultured in collagen gel matrix. *Yonsei Med J* 2001; 42:338-44.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME. Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res* 1995; (318):222-30.

Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:235-9.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7:430-36.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:204-14.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89:755-64.

Komori T. A fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276:813-16.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:10711–6.

Kørbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349:570-82.

Korbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346:738-46.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105:369-77.

Kubis N, Tomita Y, Tran-Dinh A, Planat-Benard V, André M, Karaszewski B, Waeckel L, Pénicaud L, Silvestre JS, Casteilla L, Seylaz J, Pinard E. Vascular fate of adipose tissue-derived adult stromal cells in the ischemic murine brain: A combined imaging-histological study. *Neuroimage* 2007; 34:1-11.

Kucia M, Reca R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 2005; 19:1118-27.

LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111:589-601.

Lacroix P. Recent investigations on the growth of bone. *Nature* 1945; 156:576.

Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* 2002; 90:634-40.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6:1229-34.

Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11:4497-504.

Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Jüppner H, Segre GV, Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996; 273:663-6.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14:311-24.

Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; 75:200-12.

Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem* 2000; 275:26967-75.

Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:12741-6.

Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH. Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J Orthop Res* 2009; 27:8-14.

Li RH, Bouxsein ML, Blake CA, D'Augusta D, Kim H, Li XJ, Wozney JM, Seeherman HJ. rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res* 2003; 21:997-1004.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84A:1032-44.

Lin HY, Wang XF. Expression cloning of TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev* 1992; 32:105-10.

Liu F, Ventura F, Doody J, Massagué J. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 1995; 15:3479-86.

Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2004; 59:198-202.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Long MW, Ashcraft EK, Normalle D, Mann KG. Age-related phenotypic alterations in populations of purified human bone precursor cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999; 54:B54-62.

Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995; 95:881-7.

Long MW, Williams JL, Mann KG. Expression of human bone-related proteins in the hematopoietic microenvironment. *J Clin Invest* 1990; 86:1387-95.

Lucas JJ, Terada N. Cell fusion and plasticity. *Cytotechnology* 2003; 41:103-9.

Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblasts phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995; 216:35-45.

Lyons RM, Moses HL. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* 1990; 187:467-73.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:46-62.

Mackie EJ, Trechsel U. Stimulation of bone formation *in vivo* by transforming growth factor beta-remodeling of woven bone and lack of inhibition by indomethacin. *Bone* 1990; 11:295-300.

Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 2001; 189:275-84.

Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 2003; 122:877-91.

Masi L, Franchi A, Santucci M, Danielli D, Arganni L, Giannone V, Formigli L, Benvenuti S, Tanini A, Beghe F, Mian M, Brandi ML. Adhesion growth

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcif Tissue Int* 1992; 51:200-12.

Massagué J, Cheifetz S, Ignotz RA, Boyd FT. Multiple type-beta transforming growth factors and their receptors. *J Cell Physiol Suppl* 1987; Suppl 5:43-7.

Massagué J. Receptor for the TGF-beta family. *Cell* 1992; 69:1067-70.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:753-91.

Massagué J. TGFbeta signalling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 1996; 85:947-50.

Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:597-641.

Massagué J. Wounding Smad. *Nat Cell Biol* 1999; 1:472-8.

Matsui M, Araya SI, Wang HY, Matsushima K, Saida T. Immunomonitoring measures in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004; 148:192-9.

Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol* 2006; 169:1440-57.

Matsumoto T, Kuroda R, Mifune Y, Kawamoto A, Shoji T, Miwa M, Asahara T, Kurosaka M. Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone* 2008; 43:434-9.

Mayer H, Scutt AM, Ankenbauer T. Subtle differences in the mitogenic effects of recombinant human bone morphogenetic proteins -2 to -7 on DNA synthesis on primary bone-forming cells and identification of BMP-2/4 receptor. *Calcif Tissue Int* 1996; 58:249-55.

McCloskey TW, Oyaizu N, Coronesi M, Pahwa S. Use of a flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71:14-8.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med* 2001; 226:507-20.

Minina E,Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 2001; 128:4523-34.

Mizuno M, Kuboki Y. TGF-beta accelerated the osteogenic differentiation of bone marrow cells induced by collagen matrix. *Biochem Biophy Res Comm* 1995; 211:1091-8.

Moses HK, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res* 1981; 41:2842-8.

Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop Rel Res* 1996; 324: 24-8.

Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 2000; 473:161–64.

Nakamura T, Aikawa T, Iwamoto-Enomoto M, Iwamoto M, Higuchi Y, Pacifici M, Kinto N, Yamaguchi A, Noji S, Kurisu K, Matsuya T. Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237:465-9.

Naumann A, Dennis JE, Aigner J, Coticchia J, Arnold J, Berghaus A, Kastenbauer ER, Caplan AI. Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-dimensional in vitro macroaggregate culture system. *Tissue Eng* 2004; 10:1695-706.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004; 303:1483-7.

Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron, J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* 2005; 64:157–65.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* 1997; 18:1201-25.

Noda M, Camilliere JJ. *In vivo* stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* 1989; 124:2991-94.

Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 277:5330-8.

Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002; 20:1060-9.

Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell* 2000; 103:1099-109.

Ohneda O, Ohneda K, Arai F, Lee J, Miyamoto T, Fukushima Y, Dowbenko D, Lasky LA, Suda T. ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 2001; 98:2134-42.

Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; 3:323-8.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701-5.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004; 22:377-84.

Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J* 1990; 9:2085-93.

Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Jin DF, Clifford GM, Warren FD, Drier EA, Oppermann H. Osteogenic protein-2. A new member of the transforming

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:25220-7.

Palladino MA, Morris RE, Starnes HF, Levinson AD. The transforming growth factor-betas. A new family of immunoregulatory molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 593:181-7.

Pearce DJ, Ridler CM, Simpson C, Bonnet D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. *Blood* 2004; 103:2541-6.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95:952-8.

Pelacho B, Luttun A, Aranguren XL, Verfaillie CM, Prósper F. Therapeutic potential of adult progenitor cells in cardiovascular disease. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7:1153-65.

Peralta-Zaragoza O, Bahena-Román M, Díaz-Benítez CE, Madrid-Marina V. Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Publica Mex* 1997; 39:451-62.

Pfeilschifter J, Mundy GR. Modulation of transforming growth factor beta activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:2024-28.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massagué J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8:9-22.

Prósper F, Verfaillie CM. Adult stem cells. *An Sist Sanit Navar* 2003; 26:345-56.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346:5-15.

Quesenberry PJ, Colvin G, Dooner G, Dooner M, Aliotta JM, Johnson K. The stem cell continuum: cell cycle, injury, and phenotype lability. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1106:20-9.

Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; 157:851-64.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19:1-22.

Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation. *N Engl J Med* 1988; 809:29-35.

Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2006; 312:2169-79.

Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20:847-56.

Ratajczak MZ, Kucia M, Majka M, Reca R, Ratajczak J. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells--are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem Cytobiol* 2004; 42:139-46.

Ratajczak MZ, Kucia M, Ratajczak J, Zuba-Surma EK. A multi-instrumental approach to identify and purify very small embryonic like stem cells (VSELs) from adult tissues. *Micron* 2009; 40:386-93.

Ratajczak MZ, Pletcher CH, Marlicz W, Machalinski B, Moore J, Wasik M, Ratajczak J, Gewirtz AM. CD34+, kit+, rhodamine123(low) phenotype

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

identifies a marrow cell population highly enriched for human hematopoietic stem cells. *Leukemia* 1998; 12:942-50.

Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Ratajczak J, Kucia M. Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance. *Exp Hematol* 2008; 36:742-51.

Reddi AH, Huggins CB. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69:1601-5.

Reddi AH. BMPs: actions in flesh and bone. *Nat Med* 1997; 3:837-9.

Reddi AH. Bone and cartilage morphogenesis: cell biology to clinical applications. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4:737-44.

Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1:S1-6.

Reddi AH. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opinion Cell Biol* 1992; 4:850-5.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414:105-11.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109:337-46.

Rideout WM 3rd, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293:1093-8.

Ripamonti U, Crooks J, Matsaba T, Tasker J. Induction of endochondral bone formation by recombinant human transforming growth factor-beta2 in the baboon (Papio ursinus). *Growth Factors* 2000; 17:269-85.

Rizzino A. Transforming growth factor-beta: multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Dev Biol* 1988; 130:411-22.

Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

isolation from nonneoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:5339-43.

Robinson AJ, Meedeniya AC, Hemsley KM, Auclair D, Crawley AC, Hopwood JJ. Survival and engraftment of mouse embryonic stem cell-derived implants in the guinea pig brain. *Neurosci Res* 2005; 53:161-8.

Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992; 18:S3-S6.

Roura S, Farré J, Soler-Botija C, Llach A, Hove-Madsen L, Cairó JJ, Gòdia F, Cinca J, Bayes-Genis A. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105 + mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail* 2006; 8:555-63.

Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65:3035-9

Ruiz-Argüelles GJ, Ramírez Cisneros FJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Morales-Aceves R. Glycosilphosphatidylinositol-anchored cell surface protein deficiency in mexican mestizo patients with aplastic anemia. *Rev Invest Clin* 1999; 51:5-9.

Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:7599-603.

Sampath TK, Reddi AH. Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:6591-5.

Sampath TK, Wientroub S, Reddi AH. Extracellular matrix proteins involved in bone induction are vitamin D dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 124:829-35.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 2000; 164:247-56.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Santa María L, Rojas CV, Minguell JJ. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2004; 300:418-26.

Sanyal A, Sarkar G, Saris DB, Fitzsimmons JS, Bolander ME, O'Driscoll SW. Initial evidence for the involvement of bone morphogenetic protein-2 early during periosteal chondrogenesis. *J Orthop Res* 1999; 17:926-34.

Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002; 99:507-12.

Scharstuhl A, Schewe B, Benz K, Gaissmaier C, Bühring HJ, Stoop R. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem Cells* 2007; 25:3244-51.

Scheufler C, Sebald W, Hülsmeyer M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 A resolution. *J Mol Biol* 1999; 287:103-15.

Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 2002; 30:816-22.

Schofield R. The relationship between the spleen colonyforming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4:7-25.

Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109:1291-302.

Serafini M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cell populations obtained from bone marrow. En: *Cell Therapy*, Ed. McGraw Hill 2008; 89-102.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Serra R, Karaplis A, Sohn P. Parathyroid hormonerelated peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J Cell Biol* 1999; 145:783-94.

Shamblott MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal PD, Huggins GR, Cui Y, Cheng L, Gearhart JD. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:113-8.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:13726-31.

Shao YY, Wang L, Ballock RT. Thyroid hormone and the growth plate. *Rev Endocr Metab Disord* 2006; 7:265-71.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92:362-7.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18:696-704.

Shi S, Kirk M, Kahan AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1139-45.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 8:55-62.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63:5821-8.

Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 2006; 24:1707-18.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:2397-402.

Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul* 1990; 1:875-82.

Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications. *JAMA* 1989; 262:938-41.

Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: Recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992; 119:1017-21.

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361:45-6.

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 2004; 131:5883-95.

St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999; 13:2072-86.

Sträter N. Ecto-5'-nucleotidase: structure function relationships. *Purinergic Signal* 2006; 2:343-50.

Streuli CH, Schmidhauser C, Kobrin M, Bissell MJ, Derynck R. Extracellular matrix regulates expression of the TGF-beta 1 gene. *J Cell Biol* 1993; 120:253-60.

Suwa F, Fang YR, Toda I, Tang CS, Yang LJ, Gao YH, Ueda Y. SEM study on microvascular changes following implantation of bone morphogenetic protein combined with hydroxyapatite into experimental bone defects. *J Osaka Dent Univ* 1998; 32:27-34.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially resues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 2001; 15:467-81.

Tavian M, Zheng B, Oberlin E, Crisan M, Sun B, Huard J, Peault B. The vascular wall as a source of stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1044:41-50.

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416:542-5.

Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32:11-6.

Thomson BM, Bennett J, Dean V, Triffitt J, Meikle MC, Loveridge N. Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells: skeletogenic potential, colony-forming activity, and response to dexamethasone, transforming growth factor beta, and basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Res* 1993; 8:1173-83.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-7.

Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, Demer LL. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 2003; 108:2505-10.

Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Xia L, Zhou N, Riddle M, Schroeder TM, Westendorf JJ, McIvor RS, Hogendoorn PC, Szuhai K, Oseth L, Hirsch B, Yant SR, Kay MA, Peister A, Prockop DJ, Fibbe WE, Blazar BR. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; 25:371-9.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105(1):93–8.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; 3:778-84.

Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 2005; 23:1105-12.

Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:11457-62.

Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008; 102:77-85.

Trippel SB. Potential role of insulin like growth factors in fracture healing. *Clin Orthop* 1998; 355 Suppl:S301-13.

Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008; 26:591-9.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:32-45.

Tuan RS. Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 427 Suppl:S105-17.

Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:1828-32.

Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-9.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev* 2003; 24:782-801.

van der Horst G, van Bezooijen RL, Deckers MM, Hoogendam J, Visser A, Löwik CW, Karperien M. Differentiation of murine preosteoblastic KS483 cells depends on autocrine bone morphogenetic protein signaling during all phases of osteoblast formation. *Bone* 2002; 31:661-9.

Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422:901-4.

Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 369-91.

Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* 2005; 265:55-61.

von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 2006; 312:623-9.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996; 273:613-22.

Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297:2256-9.

Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422:897-901.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:387-403.

Wiesmann A, Buhring HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med* 2006; 31:2-8.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Winer JP, Janmey PA, McCormick ME, Funaki M. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. *Tissue Eng Part A* 2009; 15:147-54.

Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995; 9:2105-16.

Włodarski KH, Galus R, Włodarski P. Non-adherent bone marrow cells are a rich source of cells forming bone in vivo. *Folia Biol (Praha)* 2004; 50:167-73.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242:1528-34.

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992; 32:160-7.

Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massagué J. TGF-beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992; 71:1003-14.

Wulthier RE. A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of cells, mitochondria and matrix vesicles. *Clin Orthop* 1982; 169:219-42.

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416:545-8.

Yoon BS, Pogue R, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Development* 2006; 133:4667-78.

Yoon ST, Boden SD. Osteoinductive Molecules in Orthopaedics: Basic Science and Preclinical Studies. *Clin Orthop* 2002; 395:33-43.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115:326-38.

Zegzula HD, Buck DC, Brekke J, Wozney JM, Hollinger JO. Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79:1778-90.

Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev* 2001; 106:97-106.

Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004; 131:2161-71.

Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 1996; 122:2977-86.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425:836-41.

Zhang M, Powers RM Jr, Wolfinbarger L Jr. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol* 1997; 68:1085-92.

Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A, Wu GD. The Role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells* 2006; 24:928-35.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2:477-88.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Autologous human-derived bone marrow cells exposed to a novel TGF-β_1 fusion protein for the treatment of critically sized tibial defect

José Becerra[1], Enrique Guerado[2], Silvia Claros[1], Mônica Alonso[1], María L Bertrand[2], Carlos González[2] & José A Andrades[1†]

[†]Author for correspondence
[1]University of Málaga, Department of Cell Biology, Genetics and Physiology, Faculty of Sciences, 29071 Malaga, Spain
Tel.: ;
Fax: ;
E-mail:

[2]Hospital Costa del Sol, Division of Orthopaedic Surgery and Traumatology, 29600 Marbella, Spain

We report the first clinical case of transplantation of autologous bone marrow-derived cells *in vitro* exposed to a novel recombinant human transforming growth factor (rhTGF)-β1 fusion protein bearing a collagen-binding domain (rhTGF-β_1-F2), dexamethasone (DEX) and β-glycerophosphate (β-GP). When such culture-expanded cells were loaded into porous ceramic scaffolds and transplanted into the bone defect of a 69-year-old man, they differentiated into bone tissue. Marrow cells were obtained from the iliac crest and cultured in collagen gels impregnated with rhTGF-β1-F2. Cells were selected under serum-restricted conditions in rhTGF-β_1-F2-containing medium for 10 days, expanded in 20% serum for 22 days and osteoinduced for 3 additional days in DEX/β-GP-supplemented medium. We found that the cell number harvested from rhTGF-β_1-F2-treated cultures was significantly higher (2.3- to 3-fold) than that from untreated cultures. rhTGF-β_1-F2 treatment also significantly increased alkaline phosphatase activity (2.2- to 5-fold) and osteocalcin synthesis, while calcium was only detected in rhTGF-β_1-F2-treated cells. Eight weeks after transplantation, most of the scaffold pores were filled with bone and marrow tissue. When we tested the same human cells treated *in vitro* in a rat model using diffusion chambers, there was subsequent development of cartilage and bone following the subcutaneous transplantation of rhTGF-β_1-F2-treated cells. This supports the suggestion that such cells were marrow-derived cells, with chondrogenic and osteogenic potential, whereas the untreated cells were not under the same conditions. The ability for differentiation into cartilage and bone tissues, combined with an extensive proliferation capacity, makes such a marrow-derived stem cell population valuable to induce bone regeneration at skeletal defect sites.

Keywords: BMP, bone marrow, bone repair, chondro-osteogenesis, hydroxyapatite, mesenchymal stem cell, non-union fracture, TGF-β, tissue engineering

Adult stem cells from human marrow stroma, operationally termed mesenchymal stem cells or marrow stromal cells (MSCs) [1,2], are now being considered for use in a wide range of tissue engineering technologies, and cell or gene therapy strategies, because of their high capacity for self-renewal [3–5], their multipotentiality for differentiation [5–7] and their demonstrable contributions to somatic tissue restoration [8–11]. With respect to the potential for clinical benefit in skeletal disorders, the possibility of using MSCs for bone tissue engineering has been suggested as an alternative strategy and a promising option, since the requirement for new bone in cases of bone loss caused by trauma, age and metabolic or genetic bone diseases is a major clinical and socioeconomic need [11–15].

To generate bone, MSCs need to undergo differentiation into the osteogenic lineage. Although the factors that regulate their *ex vivo* expansion and promote their osteogenic maturation remain poorly defined, it is now well established that members of the transforming growth factor (TGF)-β family play a prominent role in the development, growth and maintenance of the vertebrate skeleton [16,17]. The effect of TGF-β_1 on the proliferation and osteoblastic differentiation of MSCs *in vitro* – causing an increase in total cell number, alkaline phosphatase activity (ALP), and osteocalcin (OC) production – is well documented [18–20]. Therefore, controlled administration of TGF-β_1 could represent an emerging tissue engineering technology that may modulate cellular responses to encourage bone regeneration at a skeletal defect site [21].

In animal models of osteogenesis, TGF-β_1 administration has been shown to stimulate osteoblast activity, causing the formation of new woven bone [22–24], and promoting the healing of fractures and skeletal defects [25,26]. It is important to note, however, that discrepant effects of TGF-β on proliferation and differentiation of MSC populations with osteogenic potential and bone formation have been reported [27–30]. Overall, the data emphasize that the physiological effects of TGF-β on cells of

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

International Society for Cellular Therapy ISCT

Cytotherapy (2008) Vol. 10, No. 6, 597–610

informa healthcare

The effect of type I collagen on osteochondrogenic differentiation in adipose-derived stromal cells *in vivo*

M Alonso, S Claros, J Becerra and JA Andrades

Department of Cell Biology, Genetics and Physiology, Laboratory of Bioengineering and Tissue Regeneration, Faculty of Sciences, University of Málaga, and Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Málaga, Spain

Background

The objective of this study was to investigate whether type I collagen would elicit in vivo *bone formation of passaged rat adipose-derived adult stromal cells (ADASC) placed extraskeletally.*

Methods

After expansion for 1–4 passages (P), cells were incubated in osteogenic medium containing dexamethasone, ascorbic acid and β-glycerol phosphate for 2–4 weeks. Undifferentiated cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS). Osteogenic differentiation was evaluated by alkaline phosphatase (ALP) and von Kossa staining as well as by gene expression of ALP, osteopontin (OP), osteonectin (ON), osteocalcin (OC), collagen I (colI), collagen II (colII), bone sialoprotein (BSP), periostin (Postn), runx2, osterix (Osx), sox9, msx1 and msx2. Diffusion chambers were filled with 1×10^6 *cells mixed with or without type I collagen gel and implanted subcutaneously into rats. Controls included chambers exposed to (1) undifferentiated cells (with or without collagen, (2) collagen without cells and (3) empty chambers (*n = *5 per group).*

Results

Four weeks after implantation, in vivo *bone and cartilage formation was demonstrated in implants containing 4-week osteo-induced P1 and P4 cells wrapped in the collagen gel, as confirmed by Goldner's trichrome and Alcian blue staining, respectively. Newly formed bone stained positive for type I collagen. Control implants had no bone or cartilage and were primarily filled with fibrous tissue at that time interval.*

Discussion

Recent studies have demonstrated that ADASC offer great promise for cell-based therapies because of their ability to differentiate toward bone, cartilage and fat. However, the influence of different matrices on the in vivo *osteogenic capability of ADASC is not fully understood. These findings suggest that type I collagen may support the survival and expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in passaged rat ADASC* in vivo.

Keywords

adipose-derived adult stromal cell, bone/cartilage formation, chondroblast, osteoblast, osteochondrogenic differentiation, type I collagen.

Introduction

The repair of massive segmental bone defects and non-healing fractures remains a challenging problem in orthopedic surgery. Although conventional autologous and allograft bone grafting are currently available for treatment of these orthopedic disorders, early expectations of these methods have yet to be realized [1–4]. The utilization of tissue engineering in the repair of bone and cartilage has shown great promise, particularly in disunion fractures where endochondral ossification occurs during wound healing [5]. Therefore, of the potential targets for tissue engineering and regenerative medicine, skeletal

Correspondence to: **José A. Andrades**, PhD, Department of Cell Biology, Genetics and Physiology, Faculty of Sciences, University of Málaga, Málaga 29071, Spain. E-mail:

© *2008 ISCT*

DOI: 10.1080/14653240802242084

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Cellular and Molecular Biology ™ **54**, N° 1, 1-10
DOI 10.1170/T825

ISSN 1165-158X
2008 Cell. Mol. Biol.™

SELECTION AND INDUCTION OF RAT SKELETAL MUSCLE-DERIVED CELLS TO THE CHONDRO-OSTEOGENIC LINEAGE

S. CLAROS, M. ALONSO, J. BECERRA AND J.A. ANDRADES*

* José A. Andrades, Ph.D. Department of Cell Biology, Genetic and Physiology Faculty of Sciences, University of Málaga 29071 – Málaga, Spain
Tel: , Fax: , E-mail:

Received September 1st, 2008; Accepted October 16th, 2008; Published October 26th, 2008

Abstract – Bone marrow (BM) has been long established as the main source of pluripotential mesenchymal stem cells (MSCs), and has been so far the main recognized source of osteoprogenitor cells that contribute to the turnover of the skeletal scaffold. The existence of an osteoprogenitor cell in other connective tissues such as skeletal muscle has been reported. In light of its availability and because of the relative ease of muscle cell isolation, skeletal muscle is an attractive source of cells for use in tissue engineering applications. The aim of this study was to explore the potential to differentiate into the chondro-osteoblastic lineage of a plastic adhering cell population, referred t as skeletal muscle-derived cells (SMDCs), obtained from biopsies of rat skeletal muscle. SMDCs displayed a fibroblast-like morphology. Our study revealed that the isolated cell population had a mesenchymal origin as indicated by abundant expression of STRO-1 and CD166. Osteogenic markers like osteocalcin (OC), bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OP) gene expressions were detected by RT-PCR. When these cells were cultured in the presence of an osteo-inductive culture medium, positive staining for alkaline phosphatase (ALP) and formation of mineralized matrix were increased. Furthermore SMDCs formed bone and cartilage tissues ***in vivo*** when placed inside of diffusion chambers and in demineralized bone matrix (DBM) cylinders, implanted subdermically into the backs of rat for 28 days. In conclusion, this experimental procedure is capable of selecting a cell population obtained from the skeletal muscle that is able to complete the differentiation pathway leading to the formation of cartilage and bone. In this respect SMDCs resemble BM stromal cells (BMSCs) and have demonstrated a potential application for cartilage and bone tissue engineering.

Key words: Skeletal muscle cells; Mesenchymal stem cells; Chondrogenesis; Osteogenesis; rhBMP-2; Demineralized bone matrix; Diffusion chamber; Rat.

INTRODUCTION

Bone, a dynamic tissue that provides structural support for soft tissues as well as stores for calcium and phosphate, depends for its normal function on a critical balance between formation and resorption. Since osteocytes and osteoclasts do not replicate, the maintenance of a healthy bone must rely on an exogenous source of cells. Although bone marrow stromal cells (BMSCs) have been long recognized as the main source of pluripotential mesenchymal stem cells (MSCs), several studies have suggested the existence of an osteoprogenitor cell in the skeletal muscle (9,35). Although not normally subject to rapid cell turnover, adult skeletal muscle also retains the ability to grow in response to increased work load and to repair and regenerate following damage. The mechanical functions of skeletal muscle are carried out by syncytial myofibers, each containing a highly

Abbreviations: **AB**, Alcian blue; **ALP**, alkaline phosphatase; **APC**, allophycocyanine; **BMP**, bone morphogenetic protein; **BMSC**, bone marrow stromal cell; **BSP**, bone sialoprotein; **Col I**, collagen type I; **Col II**, collagen type II; **DBM**, demineralized bone matrix; **FITC**, fluorescein isothiocyanate; **GT**, Goldner's trichromic stain; **IHC**, immunohistochemistry; **MSC**, mesenchymal stem cell; **OC**, osteocalcin; **ON**, osteonectin; **OP**, osteopontin; **Osx**, osterix; **PE**, phycoerythrin; **PSH**, picrosirius-hematoxylin; **rSMDC**, rat skeletal muscle-derived cell; **TB**, toluidine blue; **TGF**, transforming growth factor.

Copyright © 2008 C.M.B. Edition

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA