

José Miguel Alvarez Dotu

Modelo de regeneración ósea
basado en las células troncales del
tejido adiposo de conejo: estudio
comparativo con el injerto autólogo
óseo

Departamento

Anatomía e Histología Humanas

Director/es

Junquera Escribano, María Concepción



Tesis Doctoral

Modelo de regeneración ósea basado en las células troncales del tejido adiposo de conejo: estudio comparativo con el injerto autólogo óseo

Autor

José Miguel Alvarez Dotu

Director/es

Junquera Escribano, María Concepción

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía e Histología Humanas

2012

***MODELO DE REGENERACIÓN
ÓSEA BASADO EN LAS CÉLULAS
TRONCALES DEL TEJIDO
ADIPOSO DE CONEJO.
ESTUDIO COMPARATIVO CON EL
INJERTO AUTÓLOGO ÓSEO.***

Fotografía de portada: ADSC_s de conejo en una matriz de fibrina.
Tinción con azul de metileno.



*“Modelo de regeneración ósea basado en las
células troncales del tejido adiposo de conejo.
Estudio comparativo con el injerto autólogo óseo”.*

Memoria de TESIS DOCTORAL presentada por **D. José Miguel Álvarez Dotu.**

Licenciado en Medicina y Cirugía, para optar al grado de Doctor por la

Universidad de Zaragoza.

Directora de la tesis

Dra. Concepción Junquera Escribano

Catedrática de Universidad

Departamento de Anatomía e Histología Humanas

Facultad de Medicina

Universidad de Zaragoza

En Zaragoza, a 29 de Febrero de 2012



**Departamento
Anatomía
e Histología Humanas
Universidad Zaragoza**

Dña. Concepción Junquera Escribano, Catedrática del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Zaragoza,

INFORMA:

Que D. José Miguel Álvarez-Dotu ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "**MODELO DE REGENERACIÓN ÓSEA BASADO EN LAS CÉLULAS TRONCALES DEL TEJIDO ADIPOSO DE CONEJO. ESTUDIO COMPARATIVO CON EL INGERTO AUTÓLOGO ÓSEO**" y que bajo mi juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza. Una vez finalizado, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Zaragoza, a 8 de febrero de 2012.

Dña. Concepción Junquera Escribano



Yo, José Miguel Álvarez Dotu, declaro que soy autor del presente trabajo de investigación realizado en el Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, bajo la dirección de la Dra. Dña. Concepción Junquera Escribano, Catedrática de Biología de la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Zaragoza, a 29 de Febrero de 2012.

Firmado: José Miguel Álvarez Dotu

Agradecimientos

Finalizado este trabajo no quisiera dejar de mostrar mi gratitud a todos los que habeis colaborado conmigo, tanto a los que voy a citar como a los que no. A todos mi más sincero agradecimiento.

Es de justicia comenzar por la persona sin la cual este trabajo no existiría, Concha, mi directora de Tesis. Gracias por creer en mi, por enseñarme los caminos de la ciencia, por tu apoyo constante y sobre todo por haberme contagiado esa pasión por el conocimiento y el saber.

Quiero dar las gracias a todos los compañeros del laboratorio de la Unidad de Cultivos Celulares del IACS, por esos momentos tan maravillosos que hemos compartido. Comienzo por Ramiro por su entusiasmo y por haberme iniciado en las técnicas básicas del laboratorio. A Ana siempre tan amable y tan dispuesta a colaborar. A Victor por su disposición a compartir conocimientos y su colaboración. No me olvido del Dr. David García, director de la Unidad de Cultivos Celulares, por su inestimable ayuda en el diseño y preparación de los experimentos.

Mucho tengo que agradecer al Dr. Tomás Castiella, del servicio de Anatomía Patológica del hospital Clínico Lozano Blesa, por sus enseñanzas, su ayuda con las preparaciones histológicas y sobre todo por sus opiniones tan sensatas.

No me puedo olvidar de la Dra. María Royo por sus desvelos con el microscopio confocal.

Tampoco me puedo olvidar del Dr. Javier Godino por su excelente trabajo con la citometría de flujo.

Tengo que hacer una mención especial para Irene, compañera de grupo de investigación, por no escatimar nunca su ayuda.

Una dedicación especial es para mi familia. A mi mujer, Pilar, por su amor, su aliento, su ilusión y ese apoyo constante. A mis hijos Lucía y Oscar por su cariño y todo ese tiempo que le he robado a su dedicación.

Quisiera reiterar mi agradecimiento a todos aquellos que no habeis sido mencionados habiendo estado conmigo.

*A mi familia
Pilar, Lucía
y Oscar*

ABREVIATURAS

Arg: Arginina.

Asp: Aspartato.

ADSC: Célula estromal derivada de la grasa.

ALF: Fostasa alcalina.

AS: Célula madre adulta.

BDNF: Factor neurogénico derivado del cerebro.

BMP: Proteína morfogenética ósea.

BSA: Albúmina sérica bovina.

BHA: Hidroxianisol butilado.

DAPI: Diclorhidrato de 4', 6'diamidino-2-fenilindol.

DEMEM: Medio Dulbecco Eagle modificado.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: Ácido desoxirribonucléico.

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético.

EG: Célula madre germinal.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EMT: Transición epitelio-mesenquimal.

ES: Célula madre embrionaria.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

FVS: Fracción vasculo-estromal.

GAPDF: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GF: Factor de crecimiento.

GFAP: Proteína gliofibrilar ácida.

Gly: Glicina.

HA: Hidroxiapatita.

HS: Suero humano.

HSC: Célula madre hematopoyética.

IGF: Factor de crecimiento insulínico.

IPS: Célula madre pluripotencial inducida.

IT: Ingeniería de tejidos.

ITO: Ingeniería del tejido óseo.

ITS: Suplemento insulina, transferrina y selenio.

MAP-2: Proteína asociada a los microtúbulos -2.

MAPC: Célula progenitora multipotencial adulta.

MEM: Medio Eagle modificado.

MSC: Célula madre mesenquimal de la médula ósea.

NSE: Enolasa específica neuronal.

OCN: Osteocalcina.

OPG: Osteoprotegerina.

PBS: Buffer fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PG: Prostagladina.

PLA: Ácido poliláctico.

PRP: Plasma rico en plaquetas.

RANK: Receptor activador del factor nuclear Kappa- β .

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa- β .

RGD: Tripéptido arginina-glicina-aspartato.

RNA: Ácido ribonucléico.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

SBF: Suero bovino fetal.

SCF: Factor de células madre.

SP: Células de la población lateral.

TGF: Factor de crecimiento transformante.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

VEGF: Factor de crecimiento vasculo-endotelial.

ÍNDICE

ÍNDICE:

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.- ANTECEDENTES.....	1
2.- TERAPIAS CONVENCIONALES.....	1
2.1. Injertos autólogos.....	2
2.2. Injertos homólogos o Aloinjertos.....	2
2.3. Injertos heterólogos o Xenoinjertos.....	2
2.4. Injertos aloplásticos o de biomateriales.....	3
2.5. Osteodistracción.....	3
3.- ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO.....	4
3.1. Terapia celular.....	4
3.2. Ingeniería de tejidos.....	5
4.- PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA INGENIERÍA DEL TEJIDO ÓSEO.....	5
4.1. Definición.....	5
4.2. Pilares de la ingeniería del tejido óseo.....	5
4.2.1. Las matrices tridimensionales.....	6
4.2.2. Las células.....	8
4.2.3. Los factores de crecimiento.....	9
5.- LAS CÉLULAS MADRE.....	15
5.1. Definición.....	16
5.2. Clasificación.....	17
5.3. Plasticidad, versatilidad o capacidad de transdiferenciación.....	28
5.4. Células troncales de la médula ósea.....	31

5.5. Células troncales del tejido adiposo.....	39
5.6. Perspectivas sobre el uso terapéutico de las células troncales.....	41
6.- ESTRATEGIAS DE LA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.....	42
6.1. Introducción.....	42
6.2. Bases fisiológicas de la regeneración ósea.....	43
6.2.1. <i>Histofisiología ósea.....</i>	43
6.2.1.1. <i>Las células óseas.....</i>	43
6.2.1.2. <i>La matriz orgánica.....</i>	47
6.2.1.3. <i>La fase mineral.....</i>	51
6.2.2. <i>El remodelado óseo.....</i>	51
6.2.2.1. <i>Fases del remodelado óseo.....</i>	52
6.2.2.2. <i>Factores reguladores del remodelado óseo.....</i>	53
6.2.2.3. <i>El sistema RANKL/ OPG/ RANK.....</i>	60
6.3. <i>La regeneración ósea.....</i>	63
6.3.1. <i>La osificación intramembranosa.....</i>	64
6.3.2. <i>La osificación endocondral.....</i>	66
6.3.3. <i>La reparación de la fractura ósea.....</i>	68
6.3.4. <i>Estado actual de las terapias de regeneración ósea.....</i>	70
6.3.5. <i>Estado actual de la investigación en regeneración ósea.....</i>	72
II.- JUSTIFICACIÓN.....	75
III.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	79
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
1.- ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.....	83

2.- MATERIAL BIOLÓGICO.....	83
2.1. Obtención del tejido adiposo.....	83
2.2. Obtención de las células.....	84
2.2.1. Disgregación enzimática.....	84
2.2.2. Explantes de tejido adiposo.....	94
3.- EXPANSIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR.....	96
3.1. Siembra del cultivo.....	96
3.2. Pasaje o repique del cultivo.....	97
3.3. Congelación y descongelación.....	99
4.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	103
4.1. Estudio de la velocidad de crecimiento del cultivo.....	105
4.1.1. Proliferación a distintos pasos.....	107
4.1.2. Proliferación con diferentes concentraciones de suero bovino fetal.....	108
4.2. Estudio de la viabilidad celular.....	110
5.- ESTUDIO DE LA CITOMORFOLOGÍA.....	111
5.1. Microscopía óptica.....	112
5.1.1. De las células vivas.....	112
5.1.1. De las células mediante tinción.....	113
5.2. Seguimiento del cultivo mediante microscopía de intervalos.....	118
6.- FENOTIPADO.....	121
7.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN.....	126
7.1. Diferenciación osteogénica.....	126
7.1.1. Diferenciación en multicapa.....	128

7.1.2. Diferenciación en bola.....	129
7.1.3. Comprobación de la diferenciación.....	130
7.1.3.1. Actividad de la fosfatasa alcalina.....	130
7.1.3.2. Depósito de Calcio.....	133
7.1.3.3. Activación de los genes que gobiernan la síntesis de proteínas de la matriz ósea.....	135
7.2. Diferenciación condrogénica.....	140
7.2.1. Diferenciación en micromasa.....	141
7.2.2. Diferenciación en placa.....	143
7.2.3. Comprobación de la diferenciación.....	145
7.3. Diferenciación adipogénica.....	147
7.3.1. Comprobación de la diferenciación.....	149
7.4. Diferenciación neurogénica.....	150
7.4.1. Comprobación de la diferenciación.....	153
8.- LAS MATRICES TRIDIMENSIONALES.....	156
8.1. La matriz de fibrina autóloga.....	156
8.2. La matriz de hidroxiapatita.....	162
9.- MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	166
9.1. Los implantes biológicos.....	168
9.2. Cirugía de implantación.....	170
9.3. Comprobación de la vitalidad de los implantes biológicos.....	173
9.4. Estudio radiológico.....	173
9.5. Estudio histológico e histomorfométrico.....	174
V.- RESULTADOS.....	183

1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	183
2.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	186
2.1. Proliferación a diferentes pasos.....	186
2.2. Proliferación con diferentes concentraciones de suero bovino fetal.....	188
3.- ESTUDIO DE LA CITOMORFOLOGÍA.....	191
3.1. Características morfológicas generales.....	192
3.2. Características morfológicas particulares básicas.....	196
3.3. Características morfológicas específicas.....	199
3.4. Seguimiento del cultivo mediante microscopia de intervalos.....	205
4.- CARACTERIZACIÓN POR MARCADORES DE SUPERFICIE.....	206
5.- ESTUDIO DE LA PLURIPOTENCIALIDAD.....	209
5.1. Diferenciación osteogénica.....	209
5.2. Diferenciación condrogénica.....	214
5.3. Diferenciación adipogénica.....	217
5.4. Diferenciación neurogénica.....	218
6.- CRECIMIENTO EN MATRICES.....	221
7.- RESULTADOS IN VIVO EN EL MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	225
7.1. De la cirugía de implantación.....	225
7.2. Comprobación de la viabilidad celular en los implantes.....	227
7.3. Análisis radiológico.....	229
7.4. Estudio histológico.....	232
7.4.1. Análisis histológico comparativo.....	232
7.4.2. Análisis histomorfométrico.....	238

VI.- DISCUSIÓN.....	243
1.- ADECUACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO DEL MODELO DE EXPERIMENTACIÓN.....	243
2.- RENDIMIENTO CELULAR DEL TEJIDO ADIPOSO DE CONEJO.....	246
3.- PROLIFERACIÓN CELULAR DEL CULTIVO.....	248
4.- ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	251
5.- FENOTIPADO DE LAS ADSC _s	253
6.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN.....	257
6.1. Diferenciación Osteogénica.....	258
6.2. Diferenciación Condrogénica.....	260
6.3. Diferenciación Adipogénica.....	262
6.4. Diferenciación Neurogénica.....	264
7.- CULTIVO EN MATRICES.....	268
8.- IMPLANTACIÓN EN EL MODELO ANIMAL.....	271
VII.- CONCLUSIONES.....	281
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	285

I.- INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

En España se producen 60.000 fracturas de cadera anuales, según la Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas (Díaz Curiel y cols., 2004), esto supone una ocupación de entre el 20% y el 22% de las camas de los servicios de Cirugía Ortopédica y Traumatología españoles.

La prevalencia de osteoporosis en el mundo desarrollado, según la OMS, es de más del 20% de la población (Report of a WHO study group, 1994), porcentaje que presumiblemente irá en aumento con el progresivo envejecimiento de la población.

Estos son datos puntuales que nos sirven para ilustrar el enorme interés que en este momento suscitan las investigaciones sobre la regulación del metabolismo óseo, encaminadas especialmente a lograr protocolos que conduzcan a la osteogénesis.

Desde la óptica de la cirugía oral, España e Italia son los países de Europa donde más implantes dentales se colocan, más de 700.000 en el año 2009 (Bertrand Baschwitz, 2009), los cuales requieren unos mínimos de masa ósea, hecho este que ha desatado un rápido desarrollo de diversas técnicas dentro del campo de la cirugía oral y maxilofacial para poder conseguir un aumento de la masa y volumen óseos en los maxilares.

2. TERAPIAS CONVENCIONALES

En la actualidad las técnicas convencionales más empleadas para conseguir aumento óseo son las basadas en la realización de injertos, que pueden ser de varios tipos (Braddock y cols., 2001; Fodor, 2003; Salgado, Coutinho y Reis, 2004), y las técnicas de osteodistracción (Ilizarov, B, 1989). Según el material de injerto empleado, estos se clasifican como:

2.1. Injertos autólogos de hueso.

Son aquellos en los que el injerto proviene del propio paciente, son muy eficaces, es el único tipo de injerto que tiene propiedades osteogénicas, es decir, que es capaz de formar hueso pues contiene las únicas células con potencialidad para ello; osteoinductivas, estimula la formación de hueso por contener los factores solubles de señalización que inducen a las células a formar el hueso; y de osteoconducción, pues proporciona el soporte más adecuado para la proliferación celular. Presenta como inconvenientes un aporte limitado de material, así como ocasionar morbilidad en la zona donante (Salgado, Coutinho y Reis, 2004).

2.2. Aloinjertos o injertos homólogos.

El material de injerto está tomado de otro individuo de la misma especie, estos presentan poder osteoconductivo y en menor grado osteoinductivo pero, al carecer de células vivas, no presentan propiedades osteogénicas. Poseen como ventajas el no necesitar de un segundo campo quirúrgico para su obtención y el tener abundante disponibilidad del material, su principal inconveniente reside en los estrictos controles sanitarios a que tienen que ser sometidos, debido a que al proceder de otros individuos podrían ser transmisores de diversas patologías infecciosas. Los tipos de aloinjerto óseo más comúnmente utilizados son el hueso desmineralizado, congelado, desecado, DFDB sus siglas en inglés, el hueso congelado, desecado (liofilizado) FDB y el hueso irradiado (Misch y Ditsh, 1993).

2.3. Xenoinjertos o injertos heterólogos.

El injerto procede de otra especie, estos representan una pequeña porción de las terapias para reemplazo óseo, es necesario tratarlos para anular su antigenicidad,

generalmente mediante la extracción química de cualquier traza de materia orgánica, por este motivo actúan solamente como osteoconductores. Se especula con la obtención y uso en el futuro de animales genéticamente modificados lo que resolvería los problemas de antigenicidad (Fodor, 2003).

2.4. Injertos aplásticos o de biomateriales.

Se trata de materiales sintéticos biocompatibles que carecen de poder osteoinductivo actuando como osteoconductores. Existen multitud de compuestos siendo los más utilizados los vidrios bioactivos, las cerámicas y los polímeros de síntesis (Misch y Ditsch, 1993; Salgado, Coutinho y Reis, 2004).

2.5. Osteodistracción.

Además de los diversos tipos de injertos se está utilizando, cada vez con mayor frecuencia en el campo de la cirugía implantológica oral, la osteodistracción, técnica descrita por primera vez por el ruso Ilizarov y que se basa en la osteogénesis inducida entre dos segmentos óseos vascularizados que son separados gradualmente, preservando la integridad del coágulo de fibrina que se forma entre ellos, mediante un procedimiento mecánico de distracción (Ilizarov, A, B, 1989).

Como se puede observar cada una de estas opciones de tratamiento que hemos revisado presenta una serie de inconvenientes específicos, por este motivo se hace necesaria la búsqueda urgente de nuevas alternativas de tratamiento.

3. ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO.

Es aquí donde aparece, en teoría, como una opción muy válida para restaurar, mantener o mejorar la masa ósea, la creación de sustitutivos biológicos que incluyan células cultivadas, en medios de cultivo suplementados con factores de crecimiento específicos, e incluidas en matrices tridimensionales implantables; pudiéndose incluir esta opción dentro del campo de acción de la llamada medicina regenerativa (Stocum, 2001; Samitier, 2006), la cual se puede definir como una especialidad multidisciplinar emergente, que busca el mantenimiento, la mejora, la reparación o la sustitución de células, tejidos y órganos mediante la aplicación de métodos relacionados con la terapia génica, la dosificación de sustancias biorregenerativas y principalmente con:

3.1. La terapia celular.

La terapia celular se perfila como una de las técnicas más prometedoras del futuro arsenal médico para la reparación de tejidos destruidos o dañados. Consiste en el proceso de introducir nuevas células en un tejido para poder tratar una enfermedad, siendo su objetivo la sustitución de las células dañadas por otras nuevas. Son diversos los tipos de células que se pueden aplicar, así se pueden aplicar células funcionales maduras (Pluchino y cols., 2003), células modificadas (Shing y cols., 2002), células heterólogas (Sakai y cols., 1999), sobresaliendo como candidatas para desarrollar esta estrategia dos tipos de células, las células progenitoras comprometidas o células precursoras y las células troncales o células madre (Verfaillie y cols., 2002) que revisaremos con detalle más adelante.

3.2. La ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos (IT) es un campo de investigación, relativamente nuevo, multidisciplinar que combina los conocimientos de las ciencias de materiales con la biología celular y molecular (Langer y Vacanti, 1993), para resolver problemas clínicos o quirúrgicos asociados a la pérdida de tejido o al fallo funcional de órganos (Patrick y cols., 1998). Utiliza los principios de la ingeniería y los métodos de análisis de los procesos biológicos que suceden en el desarrollo y reparación de los tejidos vivos. Los especímenes implicados en la ingeniería de tejidos son células vivas, así como sus componentes extracelulares que participan en el desarrollo de dispositivos que permitan y estimulen o favorezcan la reparación o restauración de un órgano o tejido dañado (Heineken y cols., 1991; Langer y Vacanti, 1993).

4. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.

4.1. Definición.

La ingeniería de tejidos (IT), (Hardingham y cols., 2002), se define como el uso de los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica orientados a la compresión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos, y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función (Skalar y cols., 1988; Vacanti A y B, 2006).

4.2. Pilares de la ingeniería de tejido óseo.

En la experimentación de IT confluyen tres elementos fundamentales, las matrices tridimensionales, los factores de crecimiento y los diferentes tipos de células, en un ambiente físico-químico apropiado que permita la regeneración del tejido u órgano.

4.2.1. Las matrices tridimensionales. (scaffolds en inglés)

Son dispositivos que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones, y por otro lado aportan las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica. También se encargan de definir la arquitectura del tejido a reparar (Kim, Baez y Atala, 2000). Las células interactúan con las matrices durante el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento a la vez que van sintetizando su propia matriz extracelular. Las matrices para ITO deben de reunir varios requisitos:

Biocompatibilidad, no deben desencadenar respuesta inmune ni tener efectos tóxicos, ni sobre el paciente ni sobre las células que vamos a implantar (Jiménez Planas, 2002; Mano y cols., 2007).

Porosidad, esta debe de ser elevada, formando una estructura tridimensional, con un alto valor de área superficial, con poros abiertos e interconectados para permitir el adecuado sembrado y crecimiento celular en el seno de la matriz y la adecuada vascularización para la difusión de nutrientes y eliminación de los desechos metabólicos, resultado de la actividad celular (Ma, 2008), hecho fundamental en el hueso debido a sus características metabólicas, ya que se esperan altas transferencias de sustancias, incluso cuando se realizan procesos “*in vitro*”. El tamaño de los poros influye en el proceso, siendo el ideal en ITO de entre 200 μm y 900 μm (Salgado, Coutinho y Reis, 2004; Shieh y Vacanti, 2007) también se tendrá en cuenta la distribución del tamaño de los poros, su forma y el tamaño de los puntos de interconexión en la estructura porosa (Slivka y cols., 2001).

Propiedades de la superficie tanto químicas, que estarán relacionadas con la capacidad de las células para adherirse y proliferar sobre el material (Cassinelli, Morra y Bruzzone, 2003), como topográficas, que son fundamentales para la osteoconducción, proceso por el cual las células osteogénicas migran en la matriz a través de un coágulo de fibrina que se establece después de implantado el material (Mauney, Volloch y Kaplan, 2005).

Osteoinductividad proceso por el cual las células son estimuladas a diferenciarse hacia la línea osteogénica (Salgado y cols., 2004).

Propiedades mecánicas, estas estarán en concordancia con las fuerzas a las que se verá sometido el implante permitiendo mantener la estructura del tejido prediseñada hasta que el nuevo tejido formado se encuentre totalmente estabilizado e integrado (Ma, 2008). Las matrices presentaran unas características mecánicas similares a las de la matriz extracelular natural correspondiente (Chen y cols., 2003).

Biodegradabilidad, la tasa de reabsorción de las matrices debe ser igual a la de formación ósea (Falke y Atala, 2000; Salgado y cols., 2004; Logeart y cols., 2005), así a medida que las células produzcan su propia matriz extracelular natural el biomaterial debe degradarse en componentes no tóxicos fácilmente eliminables, manteniendo su estructura tridimensional (Du y Moradian-Oldak, 2006).

Radiolucidez para poder diferenciar radiológicamente el material implantado del nuevo hueso formado (Logeart y cols., 2005).

En los últimos años se han reportado diferentes materiales para la fabricación de matrices, así se utilizan materiales metálicos, como el titanio y el circonio; cerámicos como la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico; poliméricos naturales como el colágeno, el ácido hialurónico, el fibrinógeno y el polisacárido quitosano; y poliméricos sintéticos

como los policarbonatos, los polímeros del ácido poliláctico, (PLA), del ácido poliglicólico, (PGA), etc... (Salgado, Coutinho y Reis., 2004; Yang y cols., 2001).

Uno de los retos de la ITO es el encontrar un material que cumpla todos los requisitos anteriormente expuestos, siendo capaz de imitar las propiedades naturales del hueso mientras proporciona una ayuda temporal para la regeneración del tejido, a la vez que se va degradando y sustituyendo por hueso de nueva formación (Hutmacher, 2000).

4.2.2. Las células

Las células ideales para la IT deben de ser fáciles de obtener, fáciles de cultivar, deben de conservar su fenotipo, mantener su función, ser multi ó pluripotentes y no deben generar respuestas inmunes (Yang y cols., 2001). En la actualidad la inmensa mayoría de los investigadores consideran como candidatas para desarrollar esta estrategia a las llamadas células madre, en este sentido las células madre mesenquimales (Haynesworth y cols., 1992), (*mesenchymal stem cells*, MSC) que muestran un fenotipo estable y permanecen en monocapa en el cultivo, están siendo utilizadas con mayor frecuencia en ITO (Haynesworth y cols., 1992; Bruder y cols., 1997).

Tan grandes son las expectativas que las llamadas células madre están generando en la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos, y tan enorme parece ser su futuro potencial terapéutico que les vamos a dedicar un capítulo independiente en esta introducción.

4.2.3. Los factores de crecimiento

Los factores de crecimiento (GF, sus siglas en inglés) son proteínas de señalización, sintetizadas por las células, involucradas en la proliferación y diferenciación celular y en la morfogénesis de los tejidos (Bowen-Pope, Vogel y Ross, 1984), su identificación ha sido posible mediante el uso de modernas técnicas de laboratorio como la hibridación “*in situ*”, la reacción en cadena de la polimerasa de cDNA en tiempo real (RT-PCR) y el empleo de anticuerpos monoclonales.

Los factores de crecimiento se podrían definir como un tipo de mediadores biológicos que regulan la proliferación celular, la quimiotaxis, la diferenciación celular y la síntesis de la matriz extracelular. Algunos GFs son sintetizados por prácticamente todas las células, como el TGF β_1 (Burt y Law, 1994), lo que significa que está implicado en casi todos los procesos fisiológicos; cada GF tiene unas actividades concretas y sus acciones específicas, en una célula determinada, estas dependerán de las circunstancias del entorno celular. Son multifuncionales, así un GF puede estimular la proliferación de ciertos tipos celulares e inhibir la de otros y además causar efectos no relacionados con la proliferación en otro tipo celular.

Los principales factores de crecimiento, relacionados con la osteogénesis y la regeneración, conocidos en la actualidad son (Varkey, Gittens y Uludag, 2004):

El factor transformante del crecimiento, TGF, se trata de la mezcla de dos proteínas, la TGF α y la TGF β . En el tema que nos concierne nos interesa la forma beta que forma parte una superfamilia de proteínas que incluye TGF β -1 hasta TGF β -5, BMPs, actinas e inhibinas (Kingsley, 1994), hasta el momento se han publicado un total de 74 TGF β -like secuencias que probablemente representan a unos 23 genes distintos (Burt y Law, 1994).

El TGF beta-1 es un homodímero no glicosilado, de 25 Kda de peso molecular, en el cual el 100% de su secuencia aminoácida se conserva de una especie a otra, lo que sugiere su participación en procesos funcionales básicos para el mantenimiento de dichas especies (Alevizopoulos y Mermod, 1997); se secreta de forma inactiva pudiendo formar dos tipos de complejos inactivos, uno, llamado LAP (latency associated peptide), formado al asociarse a una proteína, si además se asocia a otra proteína de enlace tendremos el otro tipo, llamado LTBP (latent TGFbeta binding protein). La misión de estas proteínas sería la de estabilizar el TGFbeta, pues en estado libre tiene una vida media de 2 minutos mientras que inactivo su vida media es de 90 minutos.

Para realizar su actividad biológica debe de encontrarse en forma libre, siendo todavía desconocido el mecanismo fisiológico por el que pasa del estado latente al de activo al liberarse de la proteína. Una vez activo el TGF deberá interaccionar con los receptores adecuados que son dos proteínas TGFR-I y TGFR-II y entonces se producirán sus efectos, la modulación de la proliferación celular, generalmente como supresor, la mejora de la formación de la matriz extracelular, aumentando su síntesis e inhibiendo su degradación, y también tiene efecto inmunosupresor (Koli y cols., 2008). El predominio de unas acciones sobre otras está en función de las circunstancias del entorno celular.

Las proteínas morfogenéticas óseas, (BMPs) junto a los factores de diferenciación y crecimiento (GDFs) controlan el desarrollo embrionario así como la homeostasis postfetal de múltiples tipos de tejidos en muchos organismos, desde los humanos hasta los invertebrados. Estas se expresan de forma tejido-específica y señalizan, como ligando a receptores serina-treonina quinasa, una serie de cambios coordinados en la expresión génica que regula la diferenciación y el desarrollo de múltiples tipos de

tejidos. Además, estas proteínas están reguladas tras su transcripción a través de varias proteínas solubles (Tobin y Celeste, 2006).

Actualmente se conocen unas 20 y su secuencia de aminoácidos revela que desde la BMP2 a la BMP12 pertenecen a la superfamilia del factor transformante del crecimiento de tipo beta, (TGF β) y son capaces de transformar el tejido conjuntivo en tejido óseo. Son los factores más potentes de diferenciación osteoblástica conocidos, son osteoinductores, teniendo también efecto sobre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Algunos autores postulan que inhiben la osteoclastogénesis (Celeste y cols., 1995).

La BMP-2 es el mayor inductor de la diferenciación osteoblástica conocido. Se han identificado, mediante estudio con microarrays de alta densidad, en el ratón dos factores de transcripción, Hey1 y Tcf7, que intervienen en la cascada de activación genética que gobierna la diferenciación hacia osteoblasto. Estos dos factores de transcripción tienen tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” unas características muy similares al factor de transcripción Cbfa1 (de Jong y cols., 2004).

Los factores de crecimiento derivados de la insulina tipo I (IGF-I) y tipo II (IGF-II) se encuentran en el hueso en gran cantidad, el IGF-I es el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea, es secretado por los osteoblastos, regula la formación de hueso de forma autocrina, e induce la proliferación celular, la diferenciación y la biosíntesis del colágeno tipo I, también aumenta el número de osteoclastos (McCarthy, Centrella y Canalis, 1989); es un polipéptido de 70 aminoácidos que presenta un 50% de similitud con la secuencia de aminoácidos de la proinsulina, con la cual posee algunas funciones similares; aunque es una proteína liberada por muchos tejidos del organismo que actúa sobre casi todas las células del cuerpo, se secreta principalmente por el hígado, 30 mg/día, en respuesta a señales de la hormona del crecimiento (GH) actuando como mediador de las acciones de la GH en el esqueleto,

coopera con PDGF aumentando la capacidad de síntesis de DNA; el IGF-1 circula en sangre ligado en un 90% a proteínas de unión específicas de las cuales se conocen 6 clases (IGF-BP 1-6), siendo la principal la BP-3.

La determinación mediante enzimoimmunoanálisis de doble unión de IGF-1 en suero ofrece una mayor fiabilidad, en el diagnóstico de la acromegalía y en la evaluación de la talla baja, que la determinación aleatoria de GH (Trejo y cols., 2007; Moyer-Mileur y cols., 2008).

El IGF-II es una hormona peptídico monocatenaria de estructura similar a la insulina con un importante papel en el desarrollo fetal, se sintetiza en el hígado así como en los tejidos diana, con efecto paracrino y autocrino, el 99% va en sangre unido a IGF-BPs, teniendo una vida media de 18 horas, el 1% restante viaja libre en sangre teniendo una vida media de 20 minutos; el principal factor estimulante de la secreción de IGF-II es la GH, siendo el receptor primario de la IGF-II el llamado receptor manosa 6 fosfato, al cual se puede unir también el IGF-I, con menor afinidad, pero no la insulina. El IGF-II se puede unir al receptor del IGF-I con menor afinidad que este pero con mayor afinidad que la insulina, la cual sí que se une a este receptor (Picha y cols., 2008).

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF, se descubrió en los gránulos alfa de las plaquetas (Antoniades, 1981), también lo producen los macrófagos, las células endoteliales y los fibroblastos, entre otras células. Las células del tejido conectivo responden a él iniciando un proceso de replicación, también, estimula la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos y, por otro lado, favorece la reabsorción ósea (Hoch y Soriano, 2003).

Se trata de un dímero, formado por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuros entre cisteínas, de 30 KDa de peso molecular, producto de la expresión de 4

genes diferentes que puede ensamblarse de 5 isoformas distintas conocidas como: AA, AB, BB, CC, DD, siendo las cadenas C y D las más recientemente identificadas. Al PDGF-C también se le conoce con el nombre de spinal cord-derived growth factor (SCDGF/PDGF-C/fallotin) (Hamada, Ui-Tei y Miyata, 2000), y al PDGF-D se le conoce también como SCDGF-B (Hamada y cols., 2001). Las isoformas de PDGF más conocidas están formada por dos cadenas de aminoácidos A y B, estas dos cadenas son similares en un 60% de su estructura, la cadena A posee 121 aas y la B 125 aas, cada una se codifica por un gen diferente, el de la A se localiza en el cromosoma 7, el de la B en el cromosoma 22, la combinación de las dos cadenas origina tres formas: PDGF-AA, PDGF-AB, y PDGF-BB, estas tres isoformas se expresan de distinta manera en los diferentes tipos de células (Heldin y Westermark, 1999).

El PDGF fue el primer factor de crecimiento que se demostró quimiotáctico para los monocitos y macrófagos (Hoch y Soriano, 2003). Para que las diferentes isoformas de PDGF actúen deben de interaccionar con sus receptores específicos, estos son proteínas insertadas en la membrana celular y las hay de dos tipos, el receptor alfa que es una proteína de 170 KDa y el receptor beta que tiene 190 KDa de peso molecular. Ambos poseen una porción extracelular con cinco dominios tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y una porción intracelular con un dominio tirosinkinasa. El receptor alfa se une a las dos cadenas A y B, mientras que el receptor beta se une solo a la cadena B, los dos receptores inducen respuestas mitogénicas para las células del tejido conectivo, el receptor beta se implica también en la estimulación de la quimiotaxis en los fibroblastos, células musculares lisas, neutrófilos y células mononucleares. Además de estas funciones el PDGF estimula la liberación de los gránulos de los neutrófilos y monocitos, estimula la fagocitosis, estimula la síntesis de colágeno y la activación y secreción de la colagenasa.

La composición del PDGF es dependiente del tipo de célula que lo sintetiza, así la isoforma AA es secretada fundamentalmente por los fibroblastos además de por las células musculares lisas, los osteoblastos y los astrocitos. La isoforma BB está más relacionada con los macrófagos (Mantur y Koper, 2008).

Los factores de crecimiento fibroblástico, (FGFs), constituyen una familia de 7 miembros que comparten entre el 40% y el 60% de homología en su secuencia de aminoácidos, y son: el FGF ácido ó aFGF o FGF-1; el FGF básico o bFGF o FGF-2; el oncogén int-2 ó FGF-3; el oncogén hst ó FGF-4; el FGF-5; el FGF-6 y el KGF o factor de crecimiento de los queranocitos (Burgess y Maciag, 1989).

Los mejor caracterizados son el ácido aFGF y el básico bFGF que fueron sintetizados en los años setenta a partir de extractos de cerebro bovino; el aFGF es un péptido de cadena sencilla compuesto de 140 aminoácidos y el bFGF consta también de una cadena similar de 150 aminoácidos con un alto grado de homología lo que sugiere que derivan de un mismo gen ancestral sencillo. En los humanos el gen que codifica el aFGF está en el cromosoma 4 y el que codifica el básico se encuentra en el 5, 4 genes distintos codifican el receptor de FGFs (FGFR 1-4) pudiendo los genes FGF-1 y FGF-2 dar varias formas de receptores por ajuste pasivo; la característica común de todos los receptores es el poseer 2 ó 3 dominios tipo inmunoglobulina en la parte extracelular y un dominio tirosin quinasa en la intracelular (Van der Geer, Hunter y Lindberg, 1994). Ambos estimulan la proliferación de la mayoría de las células implicadas en la regeneración y reparación tisular, como son las células endoteliales vasculares, los fibroblastos, los queranocitos, los condroblastos, los osteoblastos y los mioblastos. El FGF básico produce migración celular, siendo sintetizado por gran variedad de células (Guerra y cols., 2008).

El factor de crecimiento vascular endotelial, (VEGF) es el factor angiogénico más potente conocido, se trata de un grupo de 5 proteínas señalizadoras homodiméricas, (VEGF_{A-D}) implicadas en la vasculogénesis y en la angiogénesis, que tienen una similitud del 24% en su secuencia aminoácido el PDGF beta, pero que inducen efectos biológicos diferentes debido a que se unen a otro tipo de receptores; su efecto está mediado por 3 receptores con actividad tirosina quinasa denominados VEGFR-1 (flt-1), VEGF-2 (KDR-flk-1) y VEGF-3 (flt-4).

Se comportan estimulando la mitogénesis y la migración de las células endoteliales vasculares; el VEGF-A está implicado en el desarrollo del cáncer (Ferrara, 2007; Kerbel, 2008), no tienen influencia en la osteogénesis pero sí en la formación de la neovascularización; motivo este que la hace sumamente importante en el proceso de formación de nuevo hueso (Zhang y cols., A, 2008).

5. LAS CÉLULAS MADRE

El cuerpo humano contiene varios billones de células de cerca de 225 tipos diferentes, estos diferentes tipos celulares se originan a partir de una única célula, el cigoto, mediante un complejo proceso de diferenciación, en el cual grupos de genes se activan y desactivan, dando a cada tipo celular sus características individuales (González y cols., 2007). La mayoría de las células diferenciadas especializadas no pueden replicarse y su reemplazo debe realizarse desde un pool de células indiferenciadas, las llamadas células madre (Rossant, 1995).

El concepto de célula madre no es nuevo, se encuentra ya descrito en la literatura médica y científica del siglo XIX (Gehron-Robey, 2000), e incluso, más allá de la ciencia, si reflexionamos sobre leyendas de la antigüedad clásica podríamos encontrar referencias a la capacidad de autorregeneración del cuerpo, como en la leyenda de

Prometeo tan bellamente referenciada por la Dra. Nadia Rosenthal en su publicación del 2003 *Prometeus vulture and stem cells promise*.

Las llamadas células madre incluyen un amplio espectro de células con diferentes capacidades de proliferación y diferenciación poseyendo todas ellas una serie de características específicas comunes como son la clonogenicidad y la capacidad de diferenciarse en uno o más tipos celulares (Weissman, Anderson y Gage, 2001).

5.1. Definición.

Se podría definir el concepto de célula madre como aquellas células que poseen la doble capacidad de autorreplicarse y de dar origen a uno o varios linajes celulares diferenciados (Körbling y Estro, 2003); podríamos añadir, como corolario, el ser capaces de implantarse y colonizar en los tejidos y el poseer la capacidad de regenerar un tejido (Jiang y cols., 2002; Verfaillie y cols., 2002), (Figura 1).

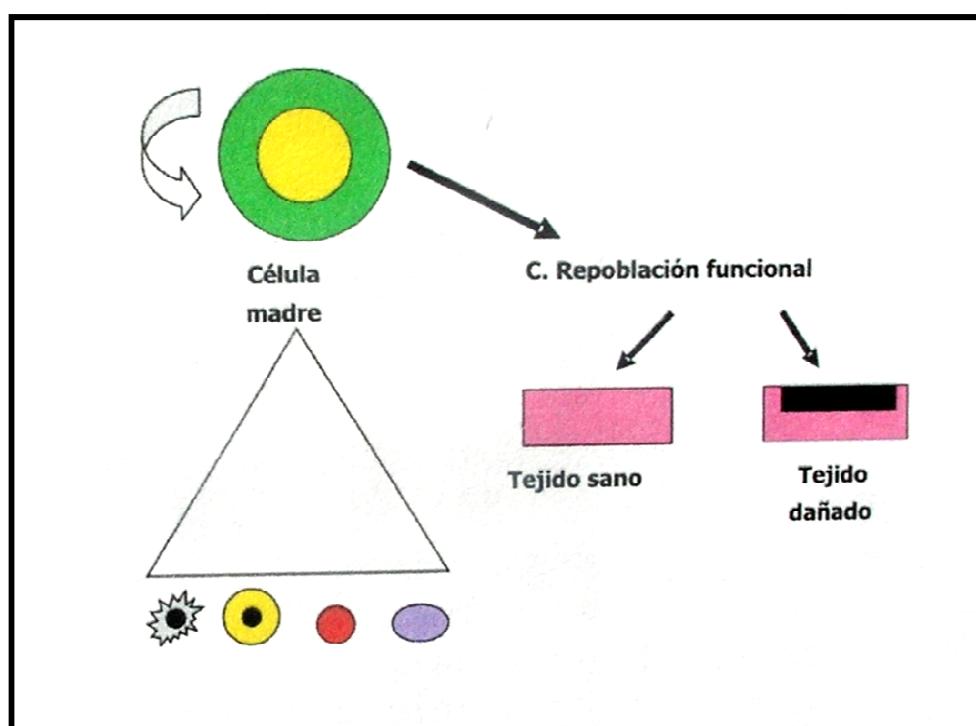


Figura 1. Propiedades de las células madre.

El término “célula madre” suele utilizarse normalmente, en la literatura científica y en el lenguaje periodístico, en español como traducción del término inglés “*stem cell*”. Otras denominaciones utilizadas en la literatura científica en castellano son las de células estaminales, células de tronco, células stem, células troncales etc..., esto origina confusiones e imprecisiones conceptuales, nosotros desde este momento utilizaremos el término “célula troncal” como traducción más adecuada del inglés “*stem cell*”, para esto nos basamos en que en el Diccionario de la Lengua Española de la Real Academia (22^a edición 2001) incluye el término célula troncal para el concepto de stem cell mientras que el término célula madre lo define como “célula que se reproduce dando lugar a dos o más células hijas”. Así mismo en el Vocabulario Científico de la Real Academia de las Ciencias Exactas Físicas y Naturales (3^a edición 1996) se incluye el término “célula tronco” como “célula pluripotencial o célula pluripotente”.

5.2. Clasificación.

Podemos clasificar las células troncales atendiendo a diversos criterios, así se clasifican según su:

Potencialidad o capacidad de diferenciación

Las células troncales totipotentes son aquellas que bajo las condiciones adecuadas son capaces de formar un individuo completo, así el cigoto se considera como una célula totipotencial. En su etapa evolutiva siguiente, la fase de mórula, cada blastómera es capaz por sí misma de generar un individuo completo, este hecho se refleja de modo natural en los gemelos monocigóticos. En ratones esta totipotencialidad se mantiene únicamente hasta ocho blastómeras (Verfaillie y cols., 2002).

Las células troncales pluripotentes son aquellas que poseen la capacidad para diferenciarse hacia tejidos provenientes de cualquiera de las tres capas embrionarias, pudiendo originar todos los tipos de células y tejidos del organismo pero no pudiendo originar los tejidos extraembrionarios y por lo tanto no podrían originar un individuo completo. Un ejemplo de estas células son las células provenientes de la masa celular interna (MCI) del blastocisto (Desbaillets y cols., 2000; Verfaillie y cols., 2002).

Las células troncales multipotentes serían aquellas capaces de diferenciarse hacia los diversos tipos celulares provenientes de la misma capa embrionaria. Clásicamente se han propuesto como ejemplo de multipotencialidad las células troncales adultas, hecho este que como veremos posteriormente está en revisión debido al hallazgo de nuevas capacidades en las células troncales adultas (Jiang y cols., 2002).

Las células unipotentes, que son aquellas que solo se pueden diferenciar en un tipo celular, se suelen denominar como células progenitoras comprometidas (Verfaillie y cols., 2002), o células precursoras (Rosenthal, 2003), (Figura 2).

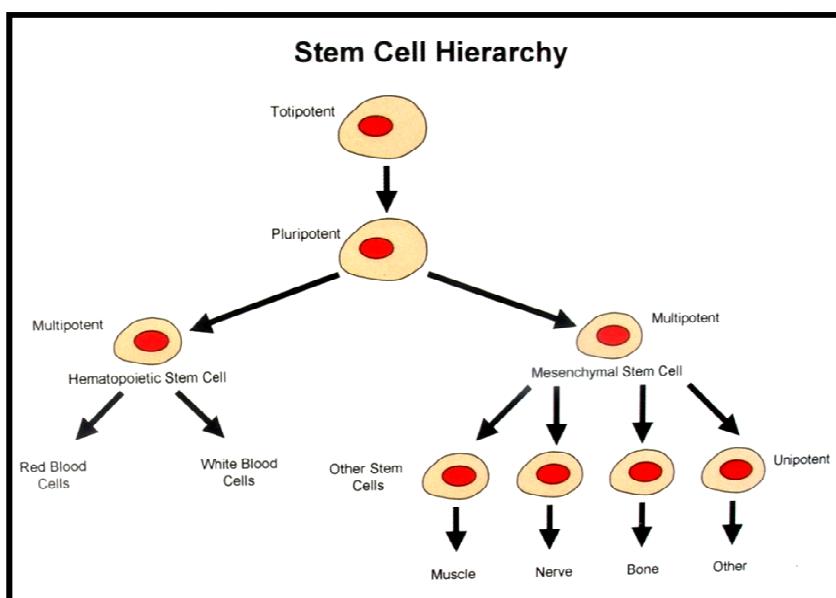


Figura 2. Jerarquía de las células troncales en relación con su potencialidad. Se han escogido las células hematopoyéticas y las mesenquimales para ilustrar la multipotencialidad

Estado evolutivo.

Células troncales embrionarias, ES (embryo stem) que son las células pluripotenciales obtenidas del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocisto.

Tras la fecundación el óvulo adquiere la condición de cigoto e inicia un proceso de migración por la Trompa de Falopio; a la par va sufriendo distintos periodos de división celular que le llevan a aumentar rápidamente su número de células, en este estadio llamadas blastómeras, sobre el tercer día posfecundación, el embrión tiene forma de esfera compacta formada por de 12 a 16 blastómeras, es la llamada fase de mórula. Sobre el cuarto día, la mórula de 16 células llega al útero e inicia su implantación o anidación, las células continúan dividiéndose. Alrededor del quinto día comienza a introducirse líquido en el interior de esta masa de células formándose una cavidad, el blastocele, en esta etapa al embrión se le denomina blastocisto, las células continúan con su proceso de división alcanzando un número aproximado de 100, al formarse el blastocele se crea una capa de células externa, denominada trofoectodermo ó trofoblasto la cual dará origen a la placenta, que rodea a un grupo de 20 ó 30 células que se encuentran en uno de los polos pegadas a la pared interior haciendo prominencia dentro del blastocele. Esta agrupación de células recibe el nombre de masa celular interna (MCI) o embrioblasto (Langman, 1977) y sus células darán origen a todos los tejidos y órganos del individuo en formación, se trata de células pluripotentes.

Estas células de la masa celular interna “*in vivo*” no conservan la pluripotencialidad indefinidamente pues se van diferenciando progresivamente en los diversos tipos celulares que conforman los tejidos del embrión en desarrollo (Rossant, 1995). Por el contrario si estas células del embrioblasto se extraen de su ambiente natural y se cultivan “*in vitro*” son capaces de proliferar ilimitadamente manteniendo su

pluripotencialidad, bajo estas condiciones son consideradas células troncales embrionarias (Verfaillie y cols., 2002).

En el embrión las células germinales no inician su proceso de diferenciación sexual hasta la mitad de la gestación, hasta ese momento mantienen la capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes celulares, de estas células germinales primordiales embrionarias y fetales se obtienen las células troncales germinales, EG (embryo germinal). Estas células, a diferencia de las células derivadas de la MCI, solo se mantienen viables en cultivo de 70 a 80 pases, pero presentan la ventaja de no originar teratomas cuando se implantan en animales de experimentación (Verfaillie y cols., 2002; Rosenthal, 2003;), (Figura 3).

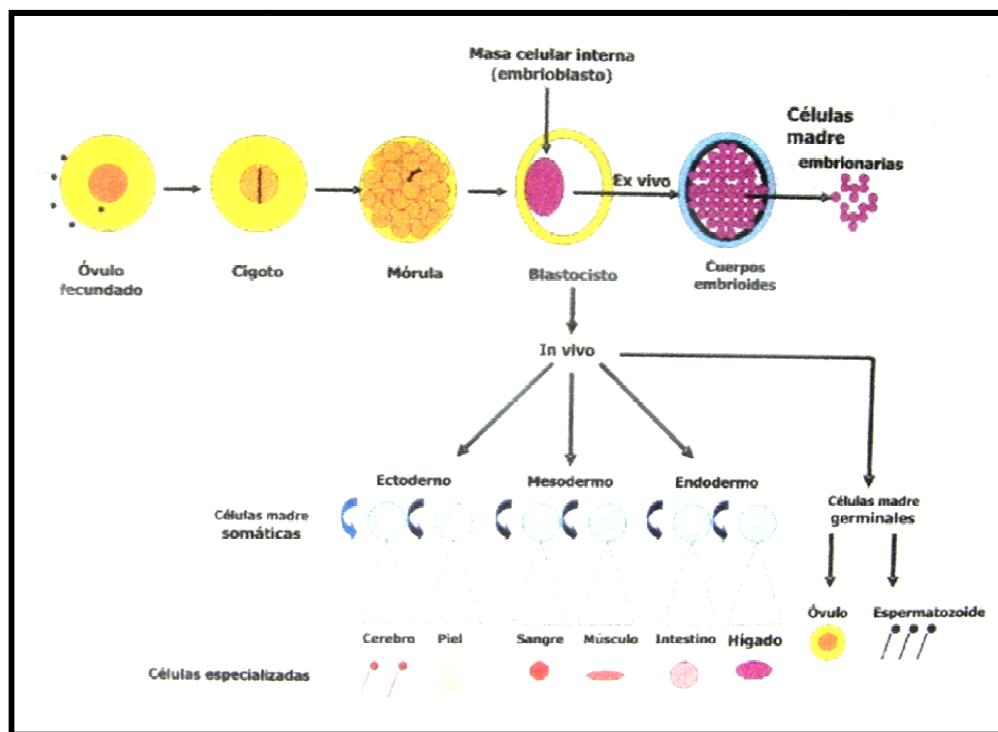


Figura 3. Esquema del origen de las células troncales embrionarias y germinales.

Las células troncales adultas, AS (adult stem). En el proceso de desarrollo normal del organismo adulto existe un proceso continuado de proliferación celular para poder mantener constante el número de células diferenciadas de determinados tejidos sometidos a un proceso de desgaste natural. Las células con elevado turnover se reemplazan mediante un proceso regulado de proliferación, diferenciación y apoptosis, ejemplo de esto son las células hematopoyéticas de la médula ósea (Orlic y cols., 2001) y las células epiteliales de la piel o del intestino delgado. Estos tejidos contienen subpoblaciones celulares encargadas de proporcionar nuevas células diferenciadas para poder mantener las elevadas tasas de recambio celular de estos tejidos.

Parece evidente que desde la vida perinatal a la adulta van apareciendo células troncales en los tejidos somáticos como parte de la estrategia del organismo para su renovación en condiciones fisiológicas o ante un daño. Esto nos llevaría a la conclusión de que las células troncales del adulto no serían células derivadas directamente del embrión temprano sino que serían células de aparición tardía, especializadas en suministrar células de repuesto al organismo adulto (Rosenthal, 2003).

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, se han definido las células troncales adultas como células localizadas dentro de un tejido específico, que están restringidas en su capacidad de diferenciación (Daley, Goodell y Snider, 2003), siendo capaces únicamente de generar células del tejido que representan.

Tradicionalmente se han considerado las AS como células multipotenciales (Körbling y Estro, 2003), sin embargo se están publicando distintos trabajos que sugieren que algunos tipos de AS tendrían una potencialidad mayor de la esperada, existiendo AS pluripotenciales en algunos órganos capaces de diferenciarse en diferentes células de tejidos derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias (Krause y cols., 2001; Jiang y cols., 2002; Trottier y cols., 2008; Zuk, 2010).

Es importante destacar que para considerar a una célula troncal pluripotencial tiene que cumplir las siguientes condiciones:

1. En primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse en células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria.
2. En segundo lugar, debe demostrar la funcionalidad “*in vitro*” e “*in vivo*” de aquellas células a las que se ha diferenciado.
3. Finalmente se tiene que producir un asentamiento claro y perdurable de estas células en el tejido diana.

En la actualidad no se ha publicado ningún estudio en el que se cumplan todas estas condiciones de forma estricta: diferenciación, implantación y perdurabilidad, sin embargo algunos trabajos apuntan de forma bastante evidente la existencia de AS pluripotenciales (Jiang y cols., 2002).

La existencia de AS en diversos tejidos como médula ósea (Reyes y cols., 2001), sangre periférica y sangre del cordón umbilical (Gascard y cols., 2008), cerebro (Gao y cols., 2008), médula espinal (Varghese y cols., 2009), grasa (Zuk y cols., 2002), pulpa dentaria (Kerkis y cols., 2006), vasos sanguíneos (Zhang y cols., 2009), músculo esquelético (Buckingham y cols., 2008), piel (Lorenz y cols., 2008), tejido conjuntivo (Coura y cols., 2008), córnea (Secker y cols., 2008), hígado (Ma y cols., 2008), conductos pancreáticos (Lee y cols., 2008), folículo piloso (Wu y cols., 2008), tejido gastrointestinal (Boman y cols., 2008) y pulmón (Bellusci y cols., 2008) no admite controversia, sin embargo, cada vez parece más evidente que las AS derivadas de estos órganos no solo pueden generar células maduras de dichos órganos sino que también pueden diferenciarse a células maduras de otras capas embrionarias, poniendo en entredicho un dogma asentado de la embriología (Langman, 1977), el

que dice que el destino de una célula queda sellado cuando entra a formar parte de una de las capas embrionarias.

Las células troncales pluripotenciales inducidas. IPS_S (Induced Pluripotent Stem).

El mantenimiento de la diferenciación celular está regulado por una serie de mecanismos dinámicos que pueden ser alterados. Una célula diferenciada puede ser reprogramada mediante la modificación de su patrón de expresión génica hacia el de otro tipo celular (Yamanaka y Blau, 2010). Así una célula somática adulta puede reprogramarse hacia una célula pluripotencial semejante a las ES.

Se han desarrollado varias técnicas para inducir pluripotencialidad a las células somáticas diferenciadas, estas células reprogramadas, para poder considerarse similares a las ES, deben de cumplir varios requisitos:

El primero es el ser capaces de diferenciarse “*in vitro*” en linajes celulares derivados de las tres hojas germinales, expresando los marcadores de superficie específicos.

También tienen que ser capaces de provocar teratomas al implantarlas “*in vivo*”.

El tercer requisito es el que puedan formar quimeras (Patel y Yang, 2010).

Se han descrito 4 técnicas para inducir pluripotencialidad en células somáticas adultas, (figura 4), estas son:

1) *La transferencia nuclear.* Se han conseguido células reprogramadas mediante la transferencia del ADN nuclear de una célula diferenciada a un ovocito, previamente enucleado, al que se le estimula, mediante pulsos eléctricos que aumentan la concentración de Ca⁺⁺ libre intracelular, hacia la formación de un embrión, el cual se

mantiene en medio de cultivo hasta su implantación “*in vivo*” (Fulka y cols., 2004). El objetivo de esta técnica es el conseguir células troncales pluripotenciales. Se han evidenciado fallos en la reprogramación que conducen a la pérdida de los embriones cuando son implantados o conducen al nacimiento de clones con anomalías (Yang y cols., 2007).

Esta técnica, por razones obvias no se ha realizado en humanos. En primates, esta técnica, ha mostrado una eficacia muy limitada (Byrne y cols., 2007). También se ha reportado una variante de esta técnica consistente en la transferencia nuclear en cigotos enucleados (Egli y cols., 2007).

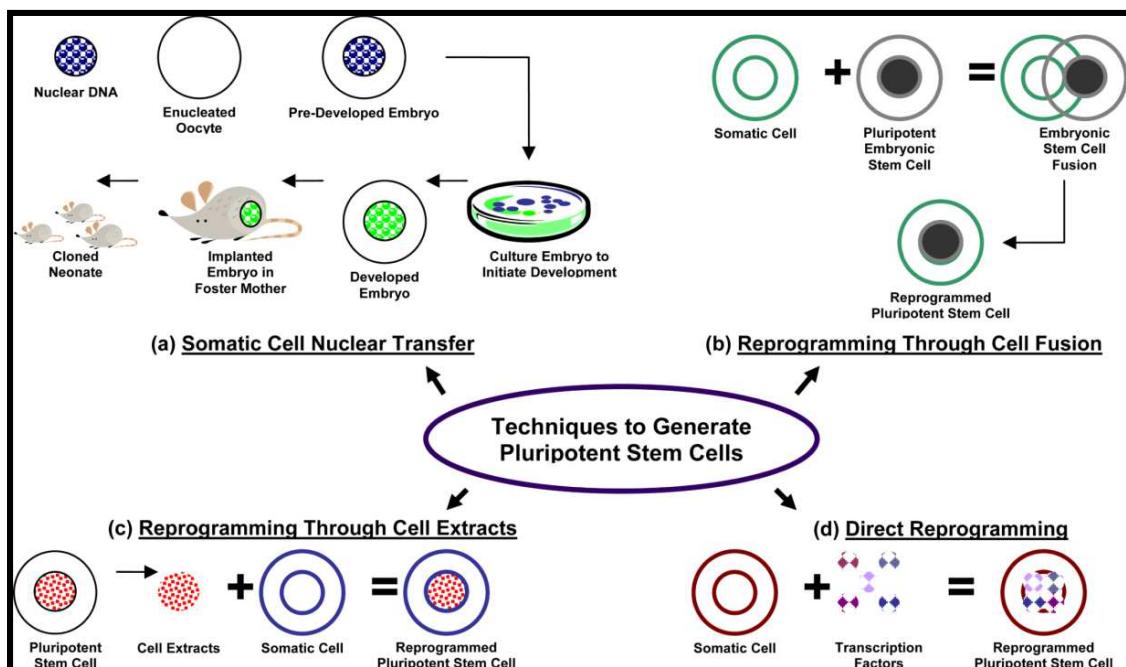


Figura 4. Esquema de las técnicas para la obtención de células pluripotentes reprogramadas. Tomado de Patel y Yang . Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. Stem Cell Rev. 2010 Sep;6(3):367-80.

2) *Fusión celular.* (Figura 5) Otro método consiste en la fusión de células somáticas diferenciadas con ES. El citoplasma de las ES contiene factores de reprogramación que actúan sobre el núcleo de la célula diferenciada (Tada y cols., 1997; Flasza y cols., 2003). Los híbridos obtenidos presentan propiedades similares a las ES, expresando marcadores de pluripotencialidad, incluyendo la expresión de Oct4, Sox2, y Nanog (Cowan, 2005).

Estas células híbridas al ser implantadas *in vivo* son capaces de producir teratomas. El inconveniente de la fusión celular es el no disponer de una técnica que permita eliminar los componentes cromosómicos de la ES (Patel y Yang, 2010).

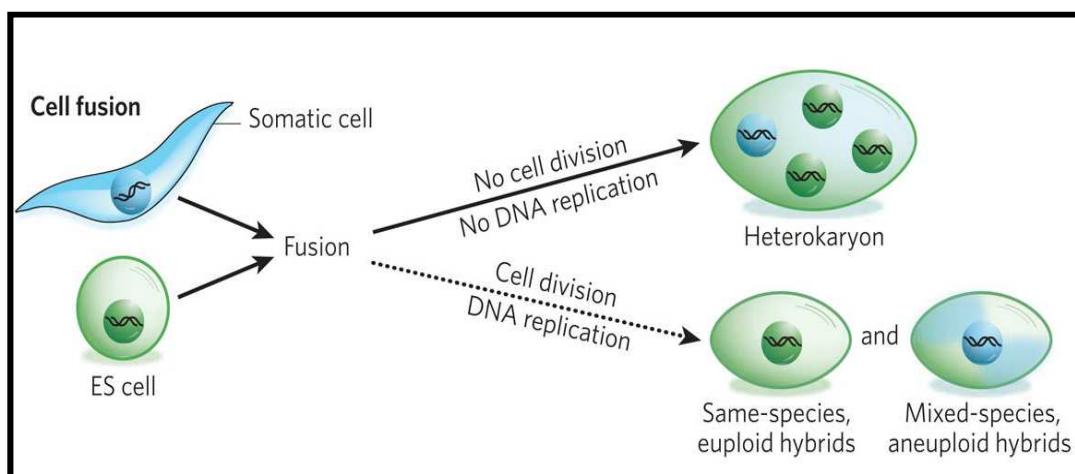


Figura 5. Fusión celular, si las células fusionadas proliferan se producirá un híbrido tetraploide, si las células son de especies diferentes, o un híbrido diploide si las células fusionadas son de la misma especie. Imagen tomada de Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010 Jun 10;465(7299):704-12.

3) *Reprogramación por medio de extractos celulares.* Esta técnica también se conoce como cultivo de inducción a la reprogramación y consiste en incubar el cultivo celular con un extracto celular obtenido de células pluripotentes, incluyendo células troncales embrionarias germinales y ES_s.

Para posibilitar la penetración de estos extractos en las células es necesario permeabilizar la membrana citoplasmática mediante la adición al medio de cultivo de sustancias químicas permeabilizantes (Patel y Yang, 2010). En el extracto celular se han identificado factores como Brs1, Oct4, Vtf1, Oxt2, Rex1 y Nanog. Por este procedimiento se ha conseguido la reprogramación en modelo murino, sin embargo solo se ha podido conseguir una reprogramación parcial con las células humanas (Taranger y cols., 2005).

4) *Reprogramación directa. Las IPS.* Se ha evidenciado que las células diferenciadas adultas mantienen toda la información genética necesaria para poder reprogramarse a un estado de célula embrionaria (Yamanaka y Blau, 2010).

En el año 2006 Shinya Yamanaka y su doctorando Kazutoshi Takahashi describieron por primera vez la reprogramación de células adultas de ratón hacia células pluripotentes, a través de la activación de los genes reprogramadores endógenos mediante la utilización de factores de transcripción exógenos. Identificaron 24 genes que se expresan en los ovocitos y en las ES_s, de estos emplearon 4, Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 que mediante un vector vírico, un retrovirus, fueron introducidos en las células. Estos 4 genes exógenos codifican 4 factores de transcripción que activan los genes reprogramadores endógenos para llevar a la célula a un estado de pluripotencialidad (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Las células así obtenidas fueron denominadas células IPS, (Induced Pluripotent Stem), expresaban Fbx15, marcador específico de ES, e “*in vivo*” eran capaces de inducir teratomas, pero no eran capaces de formar quimeras viables. Expresaban bajos niveles de Oct4 y Nanog endógenos y sus promotores estaban parcialmente metilados. El análisis de la metilación de los promotores de Oct4 y Nanog mostraba un

patrón epigenético intermedio entre las células diferenciadas y las ES (Wernig y cols., 2007).

En estudios posteriores, controlando la expresión de Nanog y Oct4 se obtuvieron células germinales con una expresión génica y patrones de metilación del ADN similares al de ES (Okita, Ichisaka y Yamanaka, 2007) y se consiguieron quimeras viables. Otros grupos obtuvieron resultados similares (Maherali y cols., 2007; Meissner, Wernig y Jaenisch, 2007).

Posteriormente, en 2007, dos grupos independientes notificaron haber conseguido células IPS humanas (Takahashi y cols., 2007; Yu y cols., 2007) utilizando ambos 4 factores de transcripción exógenos. El grupo de Thomson utilizó como vector un lentivirus y los genes de transcripción Oct4, Sox2, Lin 28 y Nanog. El grupo de Yamanaka siguió el mismo procedimiento que había usado con el modelo murino, un retrovirus como vector y los genes Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4. Con este procedimiento consiguió 1 célula IPS cada 5000 células reprogramadas, el doble de eficiencia que con el protocolo del grupo americano, estos hallazgos han sido confirmados posteriormente por otros investigadores (Park y cols., 2008; Lowry y cols., 2008).

Desde la notificación de la obtención de las IPS_s humanas se han reportado numerosos avances en el procedimiento, así de los 4 factores de transcripción iniciales parece que el Oct4 es el único imprescindible. Se han generado IPS_s sin utilizar c-Myc (Nakagawa y cols., 2008), o utilizando solo 2 factores (Kim y cols., 2008) e incluso con solo Oct4 (Kim y cols., 2009).

También se ha conseguido sustituir el vector vírico empleando plásmidos con la secuencia de ADN del Oct4 (Grinnell y cols., 2007), o utilizando el sistema de trasposición piggy bac, un transposon que integra genes en el genoma de la célula huésped (Woltjen y cols., 2009).

Otra alternativa es el empleo de una proteína que contiene la secuencia de codificación de los factores de transcripción (Kaji y cols., 2009). También se ha conseguido la reprogramación utilizando moléculas químicas, como el RepSox, que reemplazan a los factores de transcripción (Ichida y cols., 2009).

El descubrimiento de las IPS ha abierto enormes expectativas en la investigación con células troncales, soluciona los problemas éticos que despierta la investigación con las ES a la par que proporciona una fuente de células pluripotenciales. Por otro lado la producción de IPS_s es relativamente sencilla y económica, abriendo un amplio abanico de posibilidades de utilización que incluye el estudio de los mecanismos de diferenciación celular, su utilización como medio biológico de evaluación en estudios farmacológicos, su uso en medicina regenerativa y también su empleo en la consecución de modelos celulares de enfermedades genéticas humanas.

Estas propiedades que presentan las células troncales ha propiciado la aparición de un nuevo concepto denominado:

5.3. Plasticidad, versatilidad ó capacidad de transdiferenciación.

La capacidad de transdiferenciación de las células troncales adultas se podría definir como la capacidad que adquieren estas células, bajo determinadas condiciones microambientales, de diferenciarse en células de tejidos distintos de aquel con el cual la célula troncal se encuentra aparentemente comprometida (Verfaillie y cols., 2002; Körbling y Estro, 2003).

Se ha planteado que cuando el entorno natural de las AS es sustituido por otro estas cambiarían su programa de diferenciación en base a variaciones en las señales internas y externas que recibirían en las interacciones con todos los elementos constitutivos del nuevo hábitat (Khurana y Mukhopadhyay, 2008), entre estos

elementos podrían considerarse: proteínas favorecedoras e inhibidoras del ciclo celular, factores secretados por las células vecinas e interacciones intercelulares y con la matriz extracelular del tejido mediante proteínas de membrana (Theise, 2005).

Se ha propuesto una explicación para estos cambios basada en las modificaciones que podrían suceder en diferentes fases del ciclo celular, en la modulación de la cromatina y en la variación de los receptores de la membrana celular (Jovin y Giordano, 2008), de esta manera una célula genéticamente comprometida puede sufrir un proceso de desdiferenciación, mediante un salto atrás en su etapa de maduración y adquirir por esta retrodiferenciación una nueva capacidad regenerativa que le permite después rediferenciarse en células maduras especializadas de estirpes diferentes (Verfaillie y cols., 2002).

Se sabe, desde hace bastante tiempo, que estos procesos de desdiferenciación y rediferenciación pueden ocurrir en ciertos animales como los anfibios (Theise, 2005), que son capaces de regenerar alguna extremidad dañada. De igual forma durante el proceso de clonación por transferencia nuclear el núcleo de la célula somática sufre un proceso de reprogramación que se supone sería similar al que sufren las AS cuando son extraídas de su microambiente natural (López Moratalla y González de la Tajada, 2003; Prósper y Verfaillie, 2003).

Este proceso de transdiferenciación no está exento de controversia, mientras unos estudios lo apoyan (Fu y cols., 2001; Verfaillie y cols., 2002; Körbling y Estro, 2003) otros trabajos lo cuestionan, explicando algunos de los hallazgos de versatilidad como debidos a la:

Heterogeneidad de las células troncales adultas presentes en una población celular (Jiang y cols., A, 2002; Jiang y cols., B, 2002). Diversos estudios apoyan la coexistencia de diferentes tipos de células troncales en determinados tejidos

cada uno con distintas características y potencialidades, sirva de ejemplo la heterogenicidad de las células troncales adultas encontradas en la médula ósea (Roobrouck y cols., 2008). En este sentido es posible que algunas de las observaciones realizadas sean debidas a este hecho, pero también es de destacar que en la actualidad se ha demostrado a nivel clonal la potencialidad de las células madre identificadas (Jiang y cols., A, 2002; Prósper y Verfaillie, 2003; Grant y cols., 2002).

También se ha especulado con la posibilidad de que los resultados observados sean debidos a:

Fusión celular (Terada y cols., 2002), existen trabajos que apoyan el criterio de que la aparente plasticidad de las AS se debe en algunos casos a un proceso de fusión celular entre las AS transplantadas y las células residentes en ese tejido (Terada y cols., 2002; Ying y cols., 2002), como ejemplo se ha señalado que el contacto intercelular podría tener una acción importante en la fusión de una célula incorporada a un nuevo microambiente (Ying y cols., 2002), el fenómeno de fusión da lugar a células híbridas con características de ambas poblaciones fusionadas pero generalmente con una doble dotación cromosómica y la consiguiente desventaja de poseer una menor capacidad proliferativa (Ying y cols., 2002; Prósper y Verfaillie, 2003).

La existencia del fenómeno de fusión es innegable (Yamanaka, 2007) pero parece muy poco probable que pudiese justificar todas las observaciones de pluripotencialidad realizadas, quizás la fusión celular pudiese explicar la transformación celular en tejidos donde la frecuencia de los otros mecanismos sea extremadamente baja (Wang y cols., 2003).

Otra explicación que se ha argumentado sería la:

Persistencia de células troncales indiferenciadas rebasado el periodo embrionario con capacidad multi o pluripotencial remanentes del tejido embrionario (Verfaillie y cols., 2002; Körbling y Estro., 2003).

Hasta el momento ninguno de los modelos expuestos puede por sí solo explicar completamente el mecanismo de la plasticidad de las ASs, pudiendo ser que en determinados casos, tejidos y situaciones ambientales sucediesen más de uno de estos procesos.

Como hemos señalado anteriormente se ha descrito la presencia de células troncales en diversos tejidos (Reyes y cols., 2001; Zuk y cols., 2002; Coura y cols., 2008; Gascard y cols., 2008;) y órganos (Bellusci y cols., 2008; Boman y cols., 2008; Gao y cols., 2008; Ma, Chan y Guan 2008; Secker y cols., 2008) siendo las células de la médula ósea de las más estudiadas (Reyes y cols., 2001; Grant y cols., 2002; Verfaillie y cols., 2002; Prósper y Verfaillier, 2003).

5.4. Células troncales de la médula ósea.

Estas células vienen siendo utilizadas clínicamente desde hace 50 años en los transplantes de médula ósea. En la médula ósea se ha identificado un grupo heterogéneo de células troncales adultas entre las que se encuentran los siguientes tipos (Weissman, Anderson y Gaje, 2001; Verfaillie y cols., 2002; Jiang y cols., 2002), (Figura 6):

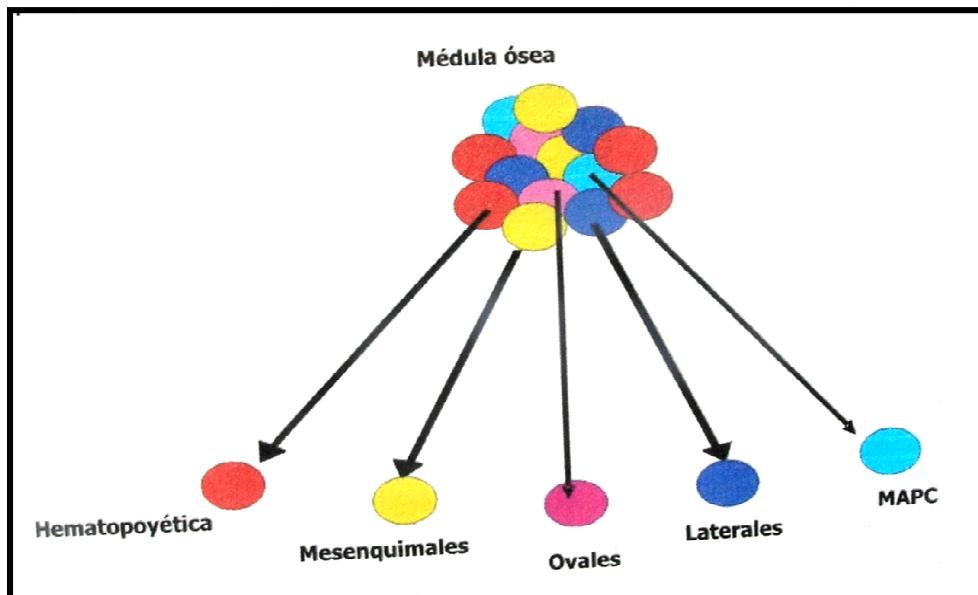


Figura 6. Población de células troncales presentes en la médula ósea.

Células troncales hematopoyéticas. (HSC). El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos ha demostrado, definitivamente, la existencia de células troncales multipotenciales hematopoyéticas en la médula ósea y en la sangre periférica (Armitage, 1994).

En modelos animales se han podido aislar e identificar la HSC (Ide, 2008) pero en el hombre no se ha podido identificar, de igual modo, a la célula responsable de la regeneración del resto de líneas celulares hematopoyéticas, entre otras cosas porque la demostración definitiva de las HSCs depende de la realización de experimentos de repoblación que obviamente no se pueden realizar en humanos (Prósper y Verfaillie, 2003).

Habitualmente se emplea el marcador de superficie CD34 (Prósper y Verfaillie, 2003) para identificar estas células. Se ha señalado que bajo determinadas circunstancias, además del potencial hematopoyético, podrían dar origen a células

derivadas de otras capas embrionarias (Grant y cols., 2002), se ha demostrado que además del marcador CD34 pueden expresar un espectro de marcadores en dependencia de su estado de diferenciación, así en un estadio más inmaduro expresan el marcador de superficie CD133 (Miraglia y cols., 1997), un inmunofenotipo característico de estas células se considera CD34⁺, CD133⁺, CD117⁺, CD38⁻, Lin⁻ (marcador de linaje celular) (Orlic y cols., 2001; Hernández-Ramírez y Dorticos-Valea, 2004), no obstante se describen variaciones en su inmunofenotipo, llegándose a apoyar la existencia de HSC CD34⁻ en estado quiescente que, tras previa activación, se diferenciarían en células CD34⁺ (Quaini y cols., 2002). Es de destacar que se ha incorporado a su inmunofenotipo el marcador KDR/flk-1 que es el receptor tipo 2 del VEGF (Rafii y Liden, 2003) y que también lo expresan las células progenitoras endoteliales que se caracterizan como CD133+, CD34+, KDR+, sugiriéndose que las HSC son capaces de contribuir a la angiogénesis y la vasculogénesis (Rafii y Liden, 2003).

En la actualidad se acepta la existencia de un precursor común endotelial y hematopoyético, el hemangioblasto (Grant y cols., 2002).

Células troncales mesenquimales. (MSC). En 1976 se informó de que de la médula ósea se podían obtener células estromales con capacidad clonogénica (Epikhina y Latsinik, 1976; Kuznetsov y cols., 1978), posteriormente se describió una población celular que presentaba una gran capacidad proliferativa y de diferenciación a varios linajes celulares (Bruder, Fink y Caplan 1994; Caplan, 1994; Pittenger y cols., 1999), estas células se denominaron células troncales mesenquimales, denominándose habitualmente por sus siglas en inglés MSC (mesenchymal stem cell), (Bruder, Fink y Caplan, 1994).

Otras denominaciones que se les han dado son las de células mesenquimatosas o mesenquemáticas o células troncales estromales, por su procedencia del estroma de la médula ósea, o células troncales del mesénquima.

Estas fueron las primeras células troncales no hematopoyéticas que se aislaron de la médula ósea. Entre sus características destaca su capacidad de adherencia, su aspecto de fibroblastos fusiformes, cuando están en cultivos no estimulados, el crecer en monocapa cuando se cultivan (Prockop, 1997), expresan marcadores de superficie específicos tales como SH₂, SH₃, SH₄, CD29, CD44, CD49_{a,b,c,e,f}, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106, CD120a, CD124, CD166 (Phinney y Prockop, 2007) también expresan moléculas VCAM-1, LFA-3, y HLA MHC clase I que sugieren la habilidad de estas células para interaccionar con células T (Klyushnenkova y cols., 2005), las MSC no expresan marcadores típicos de las HSC como son el CD34, CD45, CD14 ó c-kit (Prósper y Verfaillie, 2003).

Se ha demostrado que las MSC son necesarias para el mantenimiento y expansión de las HSC (Pecora, 2001), también se ha demostrado, y esto es muy importante para el enfoque de nuestra tesis, que las MSCs son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos funcionales (Prockop, 1997), pudiendo una misma célula, como demostró en 1999 el grupo de investigación de Osiris Therapeutics dirigido por el Dr. Mark Pittenger, diferenciarse en osteoblastos, condroblastos, adipoblastos y mioblastos (Pittenger y cols., 1999).

También se ha reportado la posibilidad de diferenciación de las MSC a células derivadas del neuroectodermo basándose en la adquisición de marcadores asociados con las neuronas como la nestina (Phinney e Isakova, 2005), la proteína ácida gliofibrilar, el neurofilamento de cadena pesada y la tubulina β -III (Crigler y cols., 2006).

No obstante algunos autores dudan de la capacidad de transdiferenciación de las MSC a células nerviosas alegando que la adquisición de los marcadores asociados a neuronas, anteriormente citados, podría ser debida a artefactos del cultivo “*in vitro*” (Neuhuber y cols., 2004). Se ha observado que la exposición a agentes estresores, como detergentes, aumentos de Ph y suero salino de alta molaridad, inducen la aparición de un fenotipo similar al de las neuronas en MSC, fibroblastos y queranocitos (Lu, Blesch y Tuszynski, 2004).

Se ha comprobado, mediante estudios proteómicos y con microarray, que el conjunto de genes modulados en las MSC después de su diferenciación neurogénica es distinto del expresado en el tejido neural (Choi y cols., 2006).

Se ha informado también de su capacidad para diferenciarse, en cocultivos “*in vitro*”, hacia células epiteliales, siendo esta diferenciación debida al fenómeno de la plasticidad, en un pequeño porcentaje de células, y por fusión celular, en el mayor porcentaje (Spees y cols., 2003).

Algunos autores las consideran como pluripotenciales (Wagner y Ho, 2007), mientras que otros no les reconocen capacidad para diferenciarse en tejidos derivados del endodermo y las consideran como multipotenciales (Jiang, 2002; Koç y Lazarus, 2001). Las MSC constituyen un modelo muy útil en aplicaciones clínicas tanto en medicina regenerativa como en terapia génica (Prósper, 2003).

Células población lateral. SP (side population), estas células se han aislado tanto en la médula ósea como en el músculo (Asakura y cols., 2002) mediante su identificación por medición de la fluorescencia producida empleando rodamina 123 (Asakura y Rudnicki, 2002). Estas células producen una muy débil fluorescencia, debido a que tienen la capacidad de eliminar muy rápidamente el citofluorocromo de

Hoechst 33342, presentando un patrón característico en las técnicas de citometría de flujo (FACS), a este hecho se debe su nombre de población lateral (Eaker y cols., 2004).

Se piensa que son células troncales muy primitivas, ya que expresan el transportador ABCg2 (ATP binding cassette) (Scharenberg, Harkey y Torok-Storb, 2002), también presentan subpoblaciones que son CD34⁺ y CD34⁻ (Pearce y cols., 2004) y que podrían dar lugar a diferentes tipos de células especializadas e integrarse en distintos tejidos “*in vivo*”, incluyendo tejidos no hematopoyéticos (Asakura y Rudnicki, 2002).

Células progenitoras multipotenciales adultas. MAPCs. Recientemente se han generado en la comunidad científica nuevas expectativas por la posibilidad de que algunas células troncales pudieran tener propiedades de diferenciación muy similares a las de las ES. Estas células denominadas MAPCs se han aislado en la médula ósea, tanto murina (Jiang y Vaessen 2002) como humana (Jiang y cols., 2002), mediante cultivos a largo plazo en condiciones especiales (Daley, Goodell y Snyder, 2003) y muestran una capacidad de proliferación “*in vitro*” de más de 120 pases celulares sin aparente envejecimiento, ya que mantiene unos niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo (Prósper y Verfaillie, 2003).

Estas células no expresan CD34, CD44, MHC I, MHC II, CD45, y c-kit, expresan niveles bajos de Flk-1, Sea-1 y Fhy-1, y altos de CD13, SSEA-1, las murinas, (Zeng, Cao y Huard, 2006), SSEA-4, las humanas, (Jiang y cols., 2002) que son antígenos embrionarios específicos (Zeng, Cao y Huard, 2006), al igual que en las ES, en las MAPCs se detecta la activación de los factores de transcripción Oct-4 nanog y Rex-1,

factores necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado (Verfaillie y Pera, 2002; Ulloa-Montoya y cols., 2007) .

“*In vitro*” estas células muestran la capacidad de diferenciarse rápidamente en múltiples tipos celulares, según las condiciones del cultivo (Xu y cols., 2008) derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias (Prósper y Verfaillie, 2003), habiéndose demostrado por experimentos de clonaje que es una única célula la capaz de diferenciarse a células de cualquiera de las tres capas embrionarias.

No hay evidencias concretas de que estas células existan como tales en tejidos normales, siendo obtenidas mediante laboriosos cultivos a largo plazo de células del estroma de la médula ósea mantenidas en condiciones especiales. Estas células, al ser obtenidas de médula ósea autóloga, no producirán reacción inmunológica de rechazo, tampoco se ha observado con ellas potencial teratogénico, con lo cual abren nuevas perspectivas no solo a su posible utilización terapéutica sino también para el mejor conocimiento de la biología de las células troncales. Actualmente los mayores limitantes que se plantean para su estudio son las condiciones tan especializadas y laboriosas que se requieren para su cultivo (Jiang y cols., 2002).

Células ovales. Entre las células presentes en la médula ósea se puede encontrar una población con las características de las células ovales hepáticas, a las cuales se les atribuye una capacidad generativa bipotencial, pudiendo transformarse en hepatocitos y en células epiteliales del árbol biliar (Theise y cols., 2000; Petersen, 2001).

Se ha reportado una pequeña subpoblación de células CD 34+, Lin- que es la que posee esta propiedad similar a la de células ovales hepáticas (Theise y cols., 2000). Se plantea que la contribución de las células de la médula ósea a la regeneración

hepática pudiese estar relacionada con la infusión hepática de células ovales localizadas en la médula ósea (Miyazaki y cols., 2004).

A tenor de la gran cantidad de estudios sobre la heterogenicidad de las poblaciones de AS presentes en la médula ósea se han acumulado algunas evidencias, mediante evaluación del quimerismo que se puede producir en algunos órganos al realizar transplantes alogénicos de células u órganos, de que las citadas células podrían contribuir a la homeostasis de tejidos no hematopoyéticos (Theise y cols., 2000; Daley, Goodell y Snyder, 2003; Phinney y Prockop, 2007).

De todas estas poblaciones de células troncales tienen, para nosotros, especial interés las MSC por su demostrada capacidad para diferenciarse a células de tejidos mesodérmicos funcionales y por estar perfectamente establecidos los protocolos para su obtención, cultivo y diferenciación, habiéndose realizado la mayoría de los estudios sobre MSC con células obtenidas de la médula ósea.

Es sabido que existen MSC similares a las de médula ósea situadas fuera del microambiente del tejido óseo (Phinney, 2002), de hecho sabemos que muchos tejidos mesodérmicos contienen poblaciones celulares indiferenciadas para su mantenimiento y reparación, así se han aislado células con estas características de diversos tejidos tales como el periostio (Stich y cols., 2008), membrana sinovial (Ju y cols., 2008), músculo esquelético (Koç y Lazarus, 2001; Buckingham y Montarras, 2008), dientes de leche (Kerkis y cols., 2006), sangre periférica (Gascard y cols., 2008) y tejido adiposo (Zuk y cols., 2002).

En nuestra línea de investigación han despertado grandes expectativas las células halladas en el tejido graso. Entre estas se encuentra una población con características de célula mesenquimal multipotencial (Zuk y cols., 2002), son las llamadas:

5.5. Células troncales del tejido graso.

En el tejido graso del adulto se han encontrado células de origen mesenquimal que poseen potencial para diferenciarse en células de varios linajes mesodérmicos (Zuk y cols., 2001), como el osteogénico (Xu y cols., 2005), el condrogénico (Lee y cols., 2004), el miogénico (Zuk y cols., 2002) y el adipogénico (Kern y cols., 2006; Bieback y cols., 2008), cuando crecen en un medio de cultivo celular apropiado. Además se ha notificado que podrían diferenciación a células secretoras pancreáticas (Timper y cols., 2006), hepáticas (Seo y cols., 2005), y células neurogénicas (Safford y cols., 2002), aunque este último aspecto es objeto de controversia, al igual que sucede con las MSC (Neuhuber y cols., 2004), debido a la posibilidad de que estos hallazgos sean debidos a artefactos del procedimiento de cultivo (Schäffler y Büchler, 2007).

No existe consenso en la literatura científica respecto a la nominación de estas células, así aparecen con nombres tales como ADAS, (Adipose-derived adult stem), ATSC (adipose tissue-derived stromal cell), PLA cell (procesed lipoaspirate cell), AMC (adipose mesenchymal cell), ASC (adipose stem cell) ó ADSC (adipose tissue-derived stromal cell) refiriéndose todos estos nombres a las mismas células mesequimales.

Morfológicamente las ADSC en cultivo tienen la apariencia de fibroblastos, expandiéndose fácilmente, son adherentes y crecen en monocapa, presentando bajos niveles de senescencia (Zuk y cols., 2001).

Expresan una amplia serie de marcadores de superficie, así son positivas para CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 (Lee y cols., 2004), también Stro-1 (solo las humanas) y HLA ABC (Gronthos y cols., 2001), no expresando marcadores hematopoyéticos, CD11, CD14, CD34, CD45, CD79_α, c-kit (CD117), consecuente con un origen no hematopoyético (Bieback y cols., 2008), tampoco expresan HLA-DR, antígeno de tipo II del sistema

HLA, lo que sugiere que estas células podrían emplearse en transplantes homólogos (McIntosh y cols., 2006).

Esta expresión fenotípica es similar a la expresada por las MSC obtenidas de la médula ósea; en lo que respecta a su expresión génica, esta también es similar a la de las MSC siendo las diferencias menores del 1% (Lee y cols., 2004; Bieback y cols., 2008), estos datos sugieren que las ADSC y las MSC procederían de un precursor común (De Ugarte y cols., 2003; Lee y cols., 2004); no obstante se aprecian pequeñas diferencia en el fenotipo entre las ADSC y las MSC, así estas expresan fuertemente el CD106 y las ADSC no y viceversa con el CD49d (Im, Shin y Lee, 2005).

También se han encontrado diferencias, entre ADSC y MSC, en la expresión génica (Lee y cols., 2004; Gronthos y cols., 2001), así entre los genes que presentan una mayor expresión en las ADSC que en las MSC se encuentran el DKK-1 el cual codifica una proteína que inhibe la señal Wnt, la cual regula la diferenciación y la proliferación de las células troncales (Miller, 2002). También muestran una mayor expresión, en las ADSC, los genes inhibidores del ligando 1 del DNA, que se asocian con la proliferación y diferenciación en muchas líneas celulares. Estas diferencias encontradas en el nivel de expresión de estos genes podrían explicar la mejor proliferación de las ADSC frente a las MSC (Lee y cols., 2004).

Las ADSC poseen una mayor habilidad para mantenerse y proliferar en cultivos celulares (Lee y cols., 2004); este hecho unido a su más fácil obtención, a su mayor disponibilidad y abundancia; un gramo de grasa produce $8,6 \pm 1,4 \times 10^4$ células (Halvorsen y cols., 2001), ó de 100 ml de lipoaspirado se obtienen entre 1, 1 y 1,5 millones de células (Hattori y cols., 2004); a que su número no desciende en la grasa con la edad (Morizono y cols., 2003); y a su posible capacidad para camuflar su antigenicidad (Puissant y cols., 2005), las convierte en una atractiva fuente de células

troncales mesenquimales para su uso en terapia celular e ingeniería de tejidos (McIntosh y cols., 2006).

5.6. Perspectivas sobre el uso terapéutico de las células troncales.

El conocimiento de las células troncales ha despertado una enormes expectativas, bien como materia prima para la terapia regenerativa de enfermedades hasta ahora incurables como la enfermedad de Parkinson o la diabetes (Kabelitz y cols., 2008), o bien como vehículo de terapia génica (Morizono y cols., 2003), sin embargo es mucho lo que todavía nos queda por aprender sobre ellas. La investigación básica tiene aún un largo camino por recorrer y son muchas las preguntas acerca de la biología de estas células que esperan respuesta.

En primer lugar tenemos que ser capaces de establecer el genotipo y el fenotipo de estas células para saber realmente qué son. Además se debe profundizar en el estudio de las células que conforman el nicho o microambiente que proporciona el soporte para el mantenimiento y diferenciación de las células troncales en el organismo.

En segundo lugar tenemos que saber cuál es exactamente la función encomendada a estas células, si son un reservorio de “potenciales de diferenciación” dependiente de las necesidades de su entorno o si tienen la función de células directoras manteniéndose ellas indiferenciadas pero estimulando la diferenciación de las células de su entorno.

Además debemos profundizar en el conocimiento de los factores que regulan los procesos de renovación y proliferación. Tenemos que encontrar respuesta a preguntas como ¿qué mecanismos inducen en condiciones normales el proceso de diferenciación, y cuál es la verdadera potencialidad de las diferentes poblaciones de

células troncales?, ¿Cuáles son los nichos naturales de estas poblaciones celulares y cómo podemos acceder a ellos?, ¿hasta qué punto podemos manipular genéticamente estas células para utilizarlas con propósitos terapéuticos?

Será necesario un enorme esfuerzo de investigación básica antes de que se puedan aplicar las células troncales en protocolos terapéuticos de manera rutinaria y segura.

6. ESTRATEGIAS DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS.

6.1. Introducción.

Varios son los métodos utilizados en la ingeniería de tejido óseo (Laurencin y cols., 1996; Langer y Vacanti, 1993; Logeart y cols., 2005; Vacanti, 2006;), uno de los más utilizados consiste en el cultivo de células en matrices tridimensionales biodegradables, porosas, y tratadas con moléculas de señalización que se implantan en la zona a reparar esperando que induzcan y dirijan el crecimiento del nuevo tejido (Langer y Vacanti, 1993; Hardingham, Tew y Murdoch, 2002).

Otro tipo de estrategia consiste en la inyección directa de células o de moléculas de señalización en el lugar a regenerar (Zhang y cols., 2008).

A la hora de elegir la mejor estrategia con la que se plantea regenerar el tejido óseo deberemos de tener presente que el diseño del hueso está regido por una serie de factores que es fundamental conocer, además será imprescindible el conocimiento de todas las sucesivas fases que se producen en el normal desarrollo y mantenimiento del tejido óseo, así como en el proceso de regeneración ósea tras una lesión para poder seleccionar el tipo de materiales, matrices, fuentes de células y factores de crecimiento más adecuados para su uso en cada caso concreto.

6.2. Bases fisiológicas de la regeneración ósea.

El hueso es el único tejido, a excepción del tejido embrionario y del hígado, capaz de regenerarse consiguiendo la *restitutio ad integrum*, de hecho podríamos considerar al hueso como un tejido en continua regeneración por el proceso de remodelación constante al que está sometido y en el cual juegan un importante papel complejos mecanismos bioquímicos entre las células, las proteínas de la matriz ósea y la regulación hormonal del organismo. A continuación vamos a describir los componentes esenciales del hueso: células, matriz orgánica y fase mineral.

6.2.1. Histofisiología ósea.

6.2.1.1. Las células óseas.

En el hueso coexisten diversos tipos de células localizándose bien en el propio hueso, como los osteoblastos, los preosteoblastos, los osteocitos, los osteoclastos, los preosteoclastos y células linfoides, o bien en el estroma conjuntivo de la médula ósea como las células troncales hematopoyéticas, las células troncales mesenquimales, adipocitos, macrófagos, mastocitos y células endoteliales.

Algunas de estas células sufren procesos de diferenciación, que comienzan a ser conocidos, pasando por diversos estadios, en función de la tarea que les es asignada en cada fase del desarrollo óseo (Friedenstein, 1976; Yamaguchi, Komori y Suda, 2000).

La diferenciación osteoblástica.

La diferenciación osteoblástica está controlada por genes de la familia Hedgehog, siendo los más conocidos el Ihh (indian hedgehog) y el Shh (sonic hedgehog), siendo

también esencial el factor de transcripción Cbfa-1 (core-binding factor a-1) también llamado Runx 2 (Ralston, 2007) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP_s) que son los reguladores más potentes conocidos de la diferenciación osteoblástica (Yamaguchi, Komori y Suda, 2000).

A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en su membrana celular unas proteínas específicas, son los llamados marcadores de diferenciación. La primera señal de diferenciación osteoblástica es la expresión de Cbfa-1 siendo en el preosteoblasto donde adquiere su máxima expresión (Yamaguchi, Komori y Suda, 2000); de forma temprana se expresan, en el citoplasma de las células osteoprogenitoras, el colágeno tipo I, la osteopontina (OPN) y la fosfatasa alcalina (ALP), más tardíos son los marcadores de diferenciación del preosteoblasto al osteoblasto: la sialoproteína ósea (BSP), y la osteocalcina (OCN) que aparecen cuando se inicia la mineralización, la expresión de estas proteínas se utiliza como marcador osteogénico en estadios finales de diferenciación osteoblástica.

El osteoblasto.

Es una célula grande (20-30 μm), de forma poliédrica, basófila, con aparato de golgi y retículo endoplásmico rugoso extensos, procede de las células troncales mesenquimales embrionarias de la médula ósea, periostio, endostio, y pericitos perivasculares (Canfield y cols., 2000).

Emite procesos citoplasmáticos hacia la matriz, comunicándose con los osteocitos y con los osteoblastos vecinos por proteínas transmenbrana, como la conexina 43 (Civitelli y cols., 1993) en concreto e integrinas, permitiendo el paso de mensajeros como el calcio, citoquinas y prostaglandinas.

Los osteoblastos expresan característicamente la fosfatasa alcalina y se encargan de la síntesis de las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz ósea, de dirigir la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuyen a la mineralización de la matriz osteoide gracias a la fosfatasa alcalina, median en la reabsorción ósea y sintetizan factores de crecimiento (Simonet y cols., 1997). Tras su periplo vital, que dura de 1 a 10 semanas, desaparecen, bien por apoptosis o bien por transformarse en células limitantes de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos, (el 15% aproximadamente), constituyendo estos dos tipos de células estadios de diferenciación más avanzados (Aubin y Liu, 1996).

El osteocito.

Es una diferenciación del osteoblasto cuando este queda atrapado en la matriz mineralizada. Tiene forma estrellada y es la célula más abundante en el hueso, se encuentra situado en el interior de lagunas u osteoplasmas comunicándose entre sí, mediante procesos citoplasmáticos, a través de los conductos calcóforos, de esta forma, se organizan formando un sincitio de células interconectadas, mediante uniones gap (Lanyon, 1993), que representa una única estructura.

Participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero su función principal es controlar el remodelado óseo detectando las variaciones de presión producidas por la fuerza de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción (Fernández-Tresguerres, A, 2006). Es el estadio final de la diferenciación osteoblástica y es incapaz de renovarse, expresa los mismos marcadores de membrana que los osteoblastos, teniendo como marcador específico el CD44, que lo expresan fuertemente, mientras que no se expresa en los osteoblastos (Fernández-Tresguerres y cols., A, 2006).

El osteoclasto.

Es una célula grande, (100 μm), multinucleada, rica en mitocondrias y vacuolas, que contiene fosfatasa ácida tártaro resistente (TRAP) encargada de la defosforilación de las proteínas y que se utiliza como marcador de la actividad de los osteoclastos, también presentan receptores para la calcitonina. Los osteoclastos proceden de las células troncales hematopoyéticas llamadas Unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM).

Los osteoclastos poseen dos especializaciones de membrana, un borde en cepillo, donde se produce la reabsorción ósea, y una zona clara rica en microfilamentos, con integrinas que le sirve de anclaje a la matriz, estas integrinas del osteoclasto; principalmente la $\text{Av}\beta_3$, que es una proteína transmembrana cuyo extremo intracelular esta unido al citoesqueleto de actina y cuyo extremo extracelular reconoce la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD), existente en el colágeno y en otras proteínas de la matriz osteoide (Fernández-Tresguerres y cols., A, 2006), a la que se une y a través de ella se adhiere a la superficie ósea expuesta creando un medio hermético periféricamente sellado en el cual, desde vesículas secretoras de los osteoclastos, se liberan ácidos como el cítrico y el láctico, generados a partir de la anhidrasa carbónica II que cataliza la reacción entre el anhídrido carbónico y el agua formando ácido carbónico que es inestable y se disocia liberando iones H^+ que son bombeados al espacio subclástico creándose un ambiente de extrema acidez en el que se disgregan los cristales de hidroxiapatita.

Fermentos proteolíticos como la cisteinproteinasa ácida, la catepsina K, colagenasas, metaloproteinasas neutras, glucuronidasa etc..., formados en el citoplasma del osteoclasto, destruyen la fracción orgánica de la matriz ósea produciéndose la reabsorción ósea (Mundy, 1993).

Es sabido que para que se produzca la osteoclastogénesis son imprescindibles los osteoblastos, así en las primeras fases de la osteoclastogénesis para poder formarse las células gigantes multinucleadas es imprescindible la presencia del factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos, además, como se verá posteriormente, la función de los osteoclastos en la reabsorción está regulada por los osteoblastos (Boyle, 2003).

6.2. 1.2 La matriz orgánica.

También llamada sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo, está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno, y la consideraremos, aparte de cómo el sustrato fundamental donde se deposita el calcio y fósforo del organismo, como una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en el mantenimiento de la integridad y función del tejido óseo (Young, 2003). Las proteínas que forman la matriz orgánica se clasifican en:

El colágeno.

El colágeno forma el 90% de la matriz extracelular, constituida sobre todo por colágeno de tipo I (95%) y del tipo V (5%) observándose pequeñas trazas de colágeno de tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y de colágeno tipo XII, cuya formación está relacionada con el estrés mecánico. En la molécula de colágeno encontramos la secuencia aminoácida RGD, la cual es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas, también encontramos los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, este último es un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno (Robey y cols., 1993), se utiliza la medida de la hidroxiprolinuria para cuantificar la intensidad de la reabsorción ósea (Schönau y Rauch, 1997).

Las fibras de colágeno se ordenan y estabilizan por la formación de puentes de hidrógeno entre aminoácidos y mediante puentes de piridinolina entre la hidroxilisina y la lisina. Es de destacar que el colágeno no tiene afinidad por el calcio, por lo cual no está implicado en el depósito mineral, siendo otras proteínas de la matriz las implicadas en este depósito.

Las proteínas no colágenas.

Las proteínas no colágenas más significativas son:

Los proteoglicanos.

Estos constituyen el 10% de las proteínas no colágenas de la matriz orgánica del hueso, son macromoléculas altamente glicosiladas que pertenecen a la familia de las glicoproteínas. Constan de un centro proteico con una ó varias cadenas de glucosaminoglucanos (GAG), unidos al centro proteico por enlaces covalentes, que presentan grupos sulfato y grupos de ácido urónico. Según la naturaleza de sus cadenas de GAGs se pueden clasificar en proteoglicanos: heparán sulfato, donde el GAG está formado por ácido hialurónico más N-acetil-glucosamina; y dermatán sulfato, de molécula más pequeña, que incluye la decorina y el biglicano (DeAngelis, 2002).

Los proteoglicanos presentes en hueso son:

1.- *El hialuronano.*

2.- *El condroitinsulfato*, ambas son del tipo heparán sulfato, siendo moléculas de gran tamaño que intervienen en las fases iniciales de morfogénesis ósea.

3.- *El biglicano.*

4.- *La decorina*, estos 2 últimos son moléculas pequeñas que aparecen en las fases más avanzadas de la formación ósea (Fernández-Tresguerres y cols., A, 2006).

Las proteínas con ácido gamma-carboxi-glutámico.

Este ácido es un aminoácido que liga el calcio y que necesita de la vitamina K para su síntesis. De este grupo de proteínas se encuentran dos en la matriz orgánica del hueso (Fernández-Tresguerres y cols., A, 2006).

La osteocalcina (OCN) pequeña proteína, con tres restos del aminoácido ligador del calcio ácido γ -carboxi-glutámico, que es sintetizada por los osteoblastos y las plaquetas con el concurso de las vitaminas D y K, y cuyos niveles plasmáticos se relacionan con el número y la actividad de los osteoblastos, se la considera un marcador bioquímico de la osteogénesis,

La proteína de la matriz con ácido γ -carboxi-glutámico.

Las glicoproteínas.

Las principales glicoproteínas que encontramos en la matriz orgánica ósea son:

A) *La osteonectina*, que tiene una gran afinidad por el colágeno tipo I, el calcio y la hidroxiapatita, y que supone el 25% de las proteínas no colágenas, interviniendo en la regulación de la adhesión de las células a la matriz y siendo necesaria para la mineralización normal del hueso (Fernández-Tresguerres y cols., A, 2006).

B) *La fosfatasa alcalina* específica del hueso, que es una enzima liberadora de fosfato inorgánico, esencial para la mineralización, a partir de los esteres fosfóricos, se la considera un muy buen marcador de la actividad osteoblástica. Es una de las

isoenzimas de la fosfatasa alcalina, que se diferencian por su composición en carbohidratos. Aproximadamente el 50% de la fosfatasa alcalina circulante procede del hueso (Seibel, 2003).

C) *Las proteínas con el tripéptido RGD*, también llamadas SIBLINGS (small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) son fundamentalmente cinco, la osteopontina; la fibronectina; la trombospondina; la sialoproteína ósea; y la vitronectina; siendo fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, su secuencia Arg-Gly-Asp es reconocida por las integrinas de osteoblasto y osteoclastos, ($\alpha v \beta 3$), actuando también como receptores de superficie de las células ósea facilitando su adhesión a la matriz (Fedarko y cols., 2004).

Las proteínas plasmáticas.

Las proteínas plasmáticas que se encuentran en la matriz orgánica ósea, en mayor proporción que en el plasma, son *la albúmina* y *la α_2 -SH-glicoproteína*, y están probablemente relacionadas con la calcificación del osteoide (Fernández-Tresguerres y cols., A, 2006).

Los factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento son polipéptidos sintetizados en el hueso o procedentes de otros lugares como el hígado o las plaquetas que intervienen en la diferenciación, proliferación y crecimiento celular. Ya fueron revisados en un apartado anterior.

6.2.1.3. La fase mineral.

La fase mineral representa el 65% del peso óseo, está formada por calcio, fosfato y carbonato en forma de cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$ y en menor proporción magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que se supone que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización mientras que proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben (Fernández-Tresguerres y cols., A, 2006).

6.2.2. El remodelado óseo.

El hueso, como es bien sabido, es un tejido en constante formación y reabsorción; lo que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación ósea y la homeostasis del metabolismo fosfocalcico; este fenómeno se denomina remodelado óseo y se produce durante toda la vida, presentando en el ser humano un balance positivo en la formación hasta el final de la tercera década de la vida, momento en el cual se alcanza el pico máximo de masa ósea, la cual se mantiene en un balance formación/reabsorción equilibrado hasta el final de la quinta década de la vida, a partir de la cual se produce un balance negativo en la formación, comenzando la pérdida de masa ósea.

Microscópicamente el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas denominadas unidades básicas multicelulares (BMU) que tienen una vida media de entre 2 y 8 meses, estando la mayor parte de ese tiempo ocupado en la formación ósea, queremos destacar que el proceso comienza siempre por la reabsorción sucediéndose posteriormente la formación. En el esqueleto humano existen unos 35 millones de BMUs, activándose entre 3 y 4 millones anuales, con lo cual se calcula

que el esqueleto humano se renueva cada 10 años (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006).

6.2.2.1 Fases del remodelado óseo.

El proceso de remodelado parte siempre, como se ha señalado anteriormente, de un hueso perfectamente formado y comienza por el fenómeno de la reabsorción, se puede dividir este proceso en las siguientes fases (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006):

- ✓ Fase quiescente. El hueso mineralizado se encuentra en reposo protegido por la membrana endóstica y la capa de células limitantes, por una serie de factores desconocidos, en un momento dado comienza la activación de esa zona ósea, pasando a la siguiente fase.
- ✓ Fase de activación, en la cual comienza a retraerse la capa de células limitantes y a digerirse la capa endóstica por la acción de colagenasas quedando expuesta la superficie mineralizada, la cual atrae, desde los vasos próximos, a los osteoclastos, los cuales se adhieren a la superficie mineralizada dando paso a la siguiente fase.
- ✓ Fase de reabsorción en la que los osteoclastos, por el mecanismo anteriormente explicado, van disolviendo la matriz mineral y descomponiendo el osteoide, siendo este proceso finalizado por los macrófagos, lo que permite la liberación de los factores de crecimiento presentes en la matriz principalmente el TGF β y también el PDGF e IGF tipo I y II, estos factores, entre otras acciones, actúan como quimiotácticos sobre las células osteoprogenitoras iniciándose la fase siguiente.

- ✓ Fase de formación, por la acción de los factores de crecimiento liberados en la destrucción de la matriz osteoide, que actúan como quimiotácticos, además de como estimuladores de la proliferación (Lind, 1995) , los preosteoblastos se agrupan en la zona, estimulándose su proliferación y comenzando a sintetizar una sustancia cementante sobre la que se adherirá el tejido neoformado y comenzando a expresar BMPs responsables de su diferenciación, al poco tiempo los osteoblastos comenzaran a sintetizar osteoide que ira rellenando la laguna horadada y dando paso a la última fase.
- ✓ Fase de mineralización, que consiste en la aposición de minerales, calcio y fósforo fundamentalmente, en la sustancia osteoide, esta fase comienza a los 30 días del depósito de la sustancia osteoide y finalizando a los 90 días en el hueso trabecular y sobre los 130 días en el cortical, pasados los cuales el hueso vuelve a la fase de reposo o quiescente.

6.2.2.2. Factores reguladores del remodelado óseo.

Existen múltiples factores reguladores del remodelado óseo, estando todos ellos relacionados entre sí, clásicamente se ha incidido en el estudio de la regulación hormonal, sin embargo cada vez es más evidente el papel preponderante, en el crecimiento y remodelado óseos, de los factores producidos localmente, tanto en el propio hueso como en los tejidos que lo rodean, estos factores pueden actuar en forma autocrina y/o paracrina o modulando a los factores endocrinos. Estos factores son producidos por las propias células óseas, las células del estroma y las células del sistema inmune y hematológico.

Los factores que interviene en el remodelado actúan con distinta intensidad según el lugar donde se producen, así en el hueso trabecular hay íntimo contacto con las células de la médula ósea, por lo cual predominaran los factores paracrinos, mientras

que en el hueso cortical, más distante de la médula ósea, será más lógico que la modulación obedezca a factores endocrinos.

Los factores reguladores del remodelado se pueden clasificar en:

Factores genéticos.

Los factores genéticos son los que determinan entre el 60% y el 80% de la masa ósea (Ralston, 2007), esto explica que la raza negra posea más masa ósea que la raza blanca y esta a su vez más que la raza amarilla, o también el que las hijas de mujeres con osteoporosis tengan mayor predisposición a padecerla.

Factores mecánicos.

Se sabe que las fuerzas de tensión, como las producidas por la acción de la musculatura esquelética o las producidas por dispositivos mecánicos como los empleados en el movimiento ortodóntico de las piezas dentarias, favorecen el desarrollo óseo mientras que las fuerzas de compresión producen reabsorción ósea, como se puede apreciar en los pacientes portadores de prótesis dentales mucosoportadas o en la zona de compresión que se produce en el movimiento ortodóntico de las piezas dentarias (Tzannetou y cols., 2008). Esto es debido a que las fuerzas de tensión en el hueso son detectadas por la red de osteocitos, esta estimulación de la red de osteocitos les induce a producir mediadores como las prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I que estimulan la actividad de las células osteoformadoras (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006).

Factores vasculo-nerviosos.

El aporte vascular es imprescindible para el desarrollo óseo pues aporta células, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas etc. Siendo este el primer paso en la

osificación y reparación ósea. Así mismo la inervación, tanto del sistema autónomo como del sensorial, es necesaria para el normal desarrollo fisiológico del hueso.

Factores nutricionales.

Los factores nutricionales son muy interesantes por el hecho de que podemos modificarlos fácilmente, es sabido el papel que el aporte de calcio en la dieta juega en la prevención de determinados trastornos óseos, también se sabe que ciertos hábitos como el consumo de alcohol, exceso de sal, tabaquismo, consumo de cafeína son osteopénicos (Fernández-Tresguerres y cols., A, 2006).

Factores hormonales.

Las hormonas son mensajeros sistémicos con efecto endocrino (actúan a distancia de donde se han producido) actuando también sobre la regulación y la síntesis de los factores locales que intervienen en el metabolismo celular, (efecto autocrino y paracrino), las más importantes en la fisiología ósea son:

A) *Las hormonas tiroideas*, las cuales desencadenan dos acciones contrapuestas sobre el hueso, así estimulan la síntesis de osteoide y su mineralización, estimulando el reclutamiento, maduración y actividad de las células óseas, y favoreciendo la síntesis de IGF-I, pero también tienen efecto contrario al aumentar el número y función de los osteoclastos y produciendo una aceleración de los ciclos del remodelado óseo con predominio de la resorción (Riancho-Moral y González-Macías, 2004).

B) *La PTH* (parathormona), secretada por las glándulas paratiroides, controla la calcemia, actuando directamente en el hueso y en el riñón, aumentando la reabsorción de calcio e indirectamente en el intestino al estimular la síntesis de 1,25 dihidroxcolecalciferol.

Es la hormona hipercalcemiante por excelencia, no obstante en los últimos años se ha descrito un papel estimulador de la osteogénesis a través de la síntesis de IGF-I, IGF-II y de TGF β y a través de la disminución de la apoptosis de los osteoblastos, teniendo estos efectos cuando se infunde la hormona de forma intermitente, mientras que su administración de forma continua estimula la reabsorción a través de la síntesis del factor favorecedor de la osteoclastogénesis RANKL, por parte de los osteoblastos (Riancho-Moral y González-Macias, 2004).

C) La vitamina D o calcitriol o 1,25 dihidrocolecalciferol, producida, fundamentalmente en la piel, por la acción de la radiación ultravioleta de la luz solar sobre el 7 dehidrocolesterol, al cual le rompe el anillo B formando provitamina D₃ que se isomeriza a vitamina D₃ uniéndose en la piel a la proteína ligadora de vitamina D (DBP) que la transporta vía sanguínea hasta el hígado donde se metaboliza a 25 (OH) colecalciferol que posteriormente se transforma en 1, 25 (OH)₂ colecalciferol para poder ejercer actividad biológica, transformación que ocurre en el riñón por la acción de la PTH.

Actúa mineralizando el hueso al favorecer la absorción intestinal de calcio y fosfatos y así mantener los niveles normales de calcemia. También actúa sobre los osteoblastos promoviendo su diferenciación y regulando la producción, por parte de estos, de proteínas tales como el colágeno, la fosfatasa alcalina y la osteocalcina, también induce en la membrana citoplasmática de los osteoblastos el RANKL, de esta manera el calcitriol regula tanto la formación como la reabsorción óseas (Riancho-Moral y González-Macias, 2004).

Todas estas acciones biológicas se llevan a cabo por la unión del calcitriol al receptor de la vitamina D (VDR), el cual, además de en las células epiteliales intestinales y en los osteoblastos, se encuentra distribuido por todo el organismo, por

este hecho la vitamina D actúa en la regulación de la secreción hormonal, en la regulación de la función inmune y en la proliferación y diferenciación celular.

D) *La calcitonina* es secretada por las células C o parafoliculares del tiroides al ser estimuladas por varios factores, entre ellos el aumento de la calcemia. La calcitonina ejerce su acción uniéndose a receptores específicos de membrana (RCT), siendo el osteoclasto la células más rica en RCT_s, actúa inhibiendo la reabsorción ósea al reducir la actividad de los osteoclastos y el reclutamiento de sus precursores, acción transitoria pues estos parece ser que se vuelven insensibles a la calcitonina a los pocos días de estar expuestos a ella. También actúa a nivel del túbulo renal inhibiendo la reabsorción de calcio (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006).

E) *Los andrógenos* tienen efecto anabolizante a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos, además actúan como mediadores en el pico de hormona de crecimiento (GH) producido en la pubertad (Riancho-Moral y González-Macias, 2004).

F) *Los estrógenos* tienen un importante papel en el desarrollo esquelético en la adolescencia, producen un doble efecto en el metabolismo óseo, por un lado aumentan el número y función de los osteoblastos, y por otro lado disminuyen la reabsorción al aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG). Se describen receptores estrogénicos tanto en los osteoblastos y osteocitos como en los osteoclastos (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006).

G) *La progesterona* tiene efecto anabolizante directo por acción sobre los osteoblastos e indirecto al competir con los glucocorticoides por los receptores osteoblásticos (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006).

H) *La insulina* estimula la osteogénesis al aumentar la síntesis de IGF-I por parte del hígado (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006).

I) *Los glucocorticoides* a dosis altas inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos y suprimen los factores críticos de la diferenciación osteoblástica BMPs y Cbfa-1 produciendo un efecto catabólico óseo. Sin embargo se describe una acción osteogénica, al favorecer la diferenciación osteoblástica, a dosis fisiológicas (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006).

J) *La hormona de crecimiento* (GH) actúa directamente sobre los osteoblastos estimulando su actividad hacia la síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno, e indirectamente favoreciendo la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos a través del aumento en la síntesis de IGF-I y II por parte de los osteoblastos y del hígado (Riancho-Moral Y González-Macias, 2004).

En la actualidad se considera que la GH tiene también efecto autocrino y paracrino pues casi todas las células del organismo, osteoblastos incluidos, pueden sintetizarla (Fernández-Tresguerres y cols., B, 2006).

Factores locales.

Los factores locales son producidos en el microambiente óseo, por las propias células óseas o por las células de su microentorno, son del tipo de prostaglandinas, óxido nítrico, citoquinas, factores de crecimiento etc...., destacando dentro de los factores locales las propias proteínas de la matriz osteoide, los factores de crecimiento y las citoquinas.

A) *Los factores de crecimiento*, como hemos mencionado anteriormente, son polipéptidos que modulan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación celulares,

además de los anteriormente citados debemos nombrar:

a1- El factor estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)

que es fundamental para la osteoclastogénesis, estando asociado a la patogenia de la osteopetrosis.

a2- El factor estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por

los osteoblastos y células del estroma medular, es necesario para la formación de células gigantes multinucleadas que intervendrán en las primeras fases de la osteoclastogénesis, sin embargo carece de actividad sobre la función de los osteoclastos.

a3- El factor de necrosis tumoral (TNF), que “*in vitro*” estimula la reabsorción ósea.

B) *Las proteínas de la matriz*, además de las funciones anteriormente citadas, actúan como moduladoras de los factores de crecimiento, siendo su concentración en la matriz mil veces mayor que la de estos.

C) *Las citoquinas* son polipéptidos sintetizados por las células linfocíticas y monocíticas, que juegan un importante papel en múltiples funciones celulares, como la respuesta inflamatoria, la inmunológica y la hematopoyesis, destacan por su efecto en el hueso:

c1- La interleuquina 1 (IL-1), que estimula la reabsorción osteoclástica directamente, al aumentar la proliferación y diferenciación de los preosteoclastos y al inhibir la apoptosis de los osteoclastos, e indirectamente a través de la síntesis de prostaglandinas.

c₂- La interleuquina 4 (IL-4) inhibe la reabsorción y estimula la proliferación, diferenciación y activación de varios tipos celulares, disminuye la síntesis de citocinas como IL-1, IL-6, y del TNF, lo que le confiere efecto antiinflamatorio.

c₃- La interleuquina 6 (IL-6) se produce en respuesta a la PTH, IL-1 y 1, 25 (OH)₂ D₃ y su efecto es estimular la reabsorción ósea, actuando en etapas iniciales de la osteoclastogénesis.

c₄- La interleuquina 11 (IL-11) se produce en la médula ósea e induce la formación ósea a través de las BMPs y estimulando la formación de osteoblastos.

c₅- Las prostaglandinas (PG), que in vitro favorecen la reabsorción ósea, siendo localizadas en el líquido crevicular en casos de periodontitis con destrucción ósea. La más implicada en la reabsorción es la PGE₂, estando también implicadas la PGE₁, PG G₂ y la PGH₂.

6.2.2.3. El sistema RANKL / OPG / RANK.

Actualmente sabemos que las células estromales de linaje osteoblástico están esencialmente implicadas en la función y diferenciación osteoclástica a través del contacto célula a célula (Suda y cols., 1999).

Se ha demostrado la presencia de un factor en la membrana de las células osteoblásticas, perteneciente a la superfamilia de ligandos del TNF, llamado RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa-B) (Boyce y Xing, 2007; Boyce y Xing, 2008), se trata de una proteína transmembrana, tipo citoquina, de 317 aa, expresada por las células estromales de la médula ósea, osteoblastos, condrocitos, células del mesénquima, periostio, células endoteliales y células T, habiéndose

encontrado el RNAm del RANKL también en cerebro, corazón, riñón, músculo esquelético y piel.

Su producción es mayor en las células indiferenciadas del estroma y se va reduciendo progresivamente a medida que madura el fenotipo osteoblástico (Riancho-Moral y González-Macias, 2004; Boyce y Xing, 2008).

El promotor del gen RANKL contiene elementos que responden a los glucocorticoides, a la vitamina D y al factor esencial de transcripción osteoblástica Cbfa-1 o RUNX₂.

Las acciones del RANKL son la estimulación de la diferenciación y de la fusión de las células precursoras de los osteoclastos, la activación de los osteoclastos maduros y la prolongación de su vida útil. Los efectos del RANKL están mediados por su unión a un receptor específico al que activan, este es el RANK (receptor del activador del factor nuclear Kappa-B) (Boyce y Xing, 2007; Boyce y cols., 2007) cuya expresión está limitada a los osteoclastos, células B y T, células dendríticas y fibroblastos. Se trata de una proteína transmembrana de 616 aa_s que al unirse con su ligando, RANKL, activa una cadena de eventos intracelulares que llevan a la diferenciación y activación de los osteoclastos.

Así el sistema RANKL / RANK es crucial para la inducción de la formación y la activación de los osteoclastos, siempre que haya suficientes cantidades de CSF-1 en el microambiente óseo (Muñoz-Torres y González-Macias, 2004; Boyce y Xing, 2007).

Además del RANK existe otro receptor para el RANKL conocido con el nombre de osteoprotegerina, (OPG) (Muñoz-Torres y González-Macias, 2004; Boyce y cols., 2007; Boyce y Xing, 2007, Boyce y Xing, 2008), o factor inhibidor de la osteoclastogénesis, se trata de un receptor proteico soluble, que no posee dominio

transmembrana, siendo un polipéptido de 401 aa_s expresado por una gran variedad de células, como son las células cardiacas, pulmonares, intestinales, renales, hematopoyéticas, inmunológicas etc..., y sobre todo las células de la línea osteoblástica, que tienen mayor producción cuanto mayor es su grado de diferenciación (Boyce y Xing, 2007).

La OPG segregada por los osteoblastos tiene la capacidad de unirse al RANKL, de los propios osteoblastos, neutralizándolo, se trata de un receptor señuelo competidor del RANK, expresado por los osteoclastos, impidiendo la interacción RANKL/RANK (Boyce y cols., 2007).

Actúa inhibiendo la diferenciación y fusión de las células precursoras osteoclásticas. También inhibe la activación de los osteoclastos maduros y posibilita su apoptosis, todo lo cual se traduce en una disminución de la reabsorción ósea (Boyce y Xing, 2008).

Los factores que regulan la relación entre el RANKL y la OPG (ambos expresados por los osteoblastos) determinan la relación entre el grado de reabsorción y el de síntesis ósea, la expresión diferencial de estas proteínas parece que desempeña un papel preponderante en la regulación del remodelado óseo (Boyce y cols., 2007).

Queremos destacar que mientras la expresión de RANKL y OPG está regulada por diversos factores, cuyo resumen podemos ver en la tabla 1, la expresión del RANK en las células osteoclásticas es estable, con una muy pequeña regulación por agentes osteotrópicos (Boyce y Xing, 2007; Boyce y cols., 2007; Boyce y Xing, 2008,).

Tabla 1. Efectos de diferentes factores sobre la expresión de OPG y de RANKL.

FACTOR	OPG	RANKL
TNF alfa	Estimula	Estimula
IL-1	Estimula	Estimula
IL-6		Estimula
IL-4	Inhibe	
IL-11	Inhibe	Estimula
TGFbeta	Estimula	Inhibe
BMP	Estimula	
Estrógenos	Estimula	Inhibe
Glucocorticoides	Inhibe	
PG E2	Inhibe	Estimula
PTH	Inhibe	Estimula
Calcitrol	Inhibe	Estimula

6.3. La regeneración ósea.

No todos los tejidos tienen la capacidad de poder regenerarse, normalmente ante un daño tisular la mayoría de los tejidos sufren un proceso de reparación, restaurándose el tejido sin conservar su arquitectura tisular original y sin mantener, en

esa zona de tejido reparada, la funcionalidad inicial, el resultado final del proceso de reparación es la cicatrización, la cual normalmente presenta unas cualidades inferiores a las del tejido original.

En algunos tejidos, sin embargo, se produce un mecanismo por el cual el proceso de restauración finaliza con un tejido indistinguible, tanto desde el punto de vista morfológico como desde el funcional, del tejido original, este proceso es la llamada regeneración, siendo el tejido óseo unos de los escasos tejidos donde, mediante el proceso del remodelado óseo, se produce la regeneración constantemente.

Existen grandes parecidos entre los mecanismos de la embriogénesis y los de la regeneración, por este motivo vamos a hacer una revisión del proceso de desarrollo durante el crecimiento y modelado óseo.

Aunque todos los huesos derivan de condensaciones del mesénquima, de temprana aparición en el periodo embrionario, el tipo de proceso que experimentan para su formación u osificación puede ser de dos formas, intramembranoso o endocondral, generando ambos procesos una microestructura ósea idéntica.

6.3.1. La osificación intramembranosa.

En la osificación intramembranosa, durante el periodo embrionario, grupos de células mesenquimales se agrupan, por la acción de factores de crecimiento locales del tipo FGF y BMPs y de los factores de transcripción cbfa-1 y osterix (Yang y Karsenty, 2002), formando condensaciones fibrocelulares muy vascularizadas en las cuales las células están unidas por largas prolongaciones, mientras que en los espacios intercelulares se depositan haces de colágeno orientados al azar.

Posteriormente se produce en una zona un aumento de células mesenquimales y fibras formando una banda de matriz eosinófila más densa, cuya superficie se cubre de células que se agrandan y adquieren forma cuboidea o cilíndrica permaneciendo unidas por prolongaciones cortas, estas células se van volviendo más basófilas diferenciándose a osteoblastos que segregan matriz osteoide. Este conjunto de células y fibras recibe el nombre de espícula ósea y constituye el núcleo de osificación primario.

Irradiando desde el núcleo se van formando nuevas espículas y rápidamente entran en conexión formando un entramado. Por la acción de los osteoblastos las espículas se van transformando en trabéculas, donde se van depositando sales de calcio, debido al engrosamiento trabecular los osteoblastos quedan atrapados en lagunas, convirtiéndose en osteocitos conectados a través de canalículos con los osteoblastos de la superficie.

El número de osteoblastos se mantiene por la proliferación y diferenciación de las células mesenquimales. En el espacio entre las trabéculas queda tejido vascular interpuesto que se transforma en médula ósea hematopoyética. El tejido conjuntivo que rodea al hueso en formación se transforma en el periostio y los osteoblastos que quedan en la superficie se transforman en células indiferenciadas osteoprogenitoras y en células de revestimiento (Baron, 2003).

La característica de la osificación intramembranosa es que las células mesenquimales indiferenciadas se diferencian directamente a células de linaje osteogénico, osificación directa. Este tipo de osificación lo encontramos en los huesos planos del cráneo, cara, maxilar, y parcialmente en la mandíbula y clavícula.

6.3.2. La osificación endocondral.

La osificación endocondral se caracteriza por ser un proceso de osificación que se produce en dos etapas, la condrogénesis y posteriormente la osteogénesis.

Comienza con una condensación del mesénquima, de tipo celular o blastema, en la cual las células mesenquimales proliferan y se diferencian a precondroblastos y condroblastos, probablemente bajo el influjo de factores locales parecidos a los de la osificación intramembranosa, que van a formar matriz cartilaginosa, formándose cartílago hialino que modela la forma del futuro hueso. Además alrededor del modelo cartilaginoso se desarrolla una membrana, llamada pericondrio, que recubre el cartílago.

Los condroblastos van quedando embebidos en su propia matriz cartilaginosa diferenciándose a condrocitos, los cuales continúan proliferando, esto se traduce en un crecimiento en longitud del modelo cartilaginoso, es el denominado crecimiento intersticial (desde dentro).

El crecimiento en grosor del cartílago se produce por la aposición de matriz, desde la periferia, por nuevos condroblastos que derivan de células del pericondrio, es el llamado crecimiento por aposición. Con el crecimiento del cartílago los condrocitos se hipertrofian, probablemente por acumulo de glucógeno en su interior, y sufren un proceso de apoptosis, liberando al medio el contenido de su citoplasma, esto modifica el pH de la matriz, este cambio activa la calcificación de la matriz cartilaginosa, además al morir dejan huecos en la matriz que tienden a fusionarse formando pequeñas cavidades.

Al mismo tiempo las células mesenquimales del pericondrio se diferencian en osteoblastos y se disponen formando una fina lámina ósea que circunda la diáfisis,

formando el collar óseo primario (por osificación intramembranosa). Despues de un intervalo variable, según el hueso, pequeñas masas celulares erosionan el hueso perióstico del collar óseo primario y destruyen el cartílago adyacente. Algunas de estas células invasoras forman vasos sanguíneos y establecen la circulación en el hueso, (arteria nutricia), otras células se diferencian hacia osteoblastos, otras constituyen los precursores de los elementos hematopoyéticos y de los osteoclastos.

El proceso de destrucción se extiende rápidamente hacia los extremos óseos, los osteoblastos comienzan a secretar la matriz osteoide y se empiezan a formar trabéculas óseas, estas conforman el llamado centro de osificación primario; mientras el proceso de osificación se extiende los osteoclastos van destruyendo la matriz cartilaginosa formándose la cavidad medular del hueso.

Cuando el proceso destructivo del cartílago y la osificación endocondral y perióstica se aproximan a la epífisis, cesa la osificación perióstica quedando la superficie externa cubierta por cartílago, este será el constituyente del cartílago articular.

También se forma una zona de cartílago donde las células condrogénicas se multiplican e hipertrofian disponiéndose en columnas, formando la placa epifisaria de crecimiento. Esta es la responsable del crecimiento en longitud del hueso, crecimiento que cesa cuando la placa se osifica completamente al alcanzar la edad adulta (Baron, 2003).

Este tipo de osificación se denomina también osificación indirecta y forma los huesos de las extremidades, pelvis y columna vertebral.

Como señalamos anteriormente el mecanismo de la regeneración ósea es muy parecido al de formación, por este motivo se va a exponer a continuación el proceso

de reparación cuando se produce una lesión ósea.

6.3.3. La reparación de la fractura ósea.

Las fracturas curan en virtud de un proceso biológico, desarrollado en el tejido óseo, cuya finalidad es reconstruir la continuidad anatómica y funcional del hueso, mediante la formación de nuevo tejido óseo. El complejo mecanismo por el que se reparan las fracturas está íntimamente relacionado con el proceso de osteogénesis anteriormente visto.

En principio el tejido óseo puede repararse biológicamente mediante dos procesos distintos:

A) *La reparación ósea primaria*, esta se da con muy poca frecuencia y se produce sin la formación previa de un tejido de granulación en la zona lesionada. Ocurre solo bajo circunstancias muy particulares, no debiendo existir nunca un espacio fracturario a llenar. En estas circunstancias se produce una activación de los osteoclastos que agrandan los conductos de Havers de la cortical ósea para que sirvan de acomodo al nuevo hueso.

Los capilares de los extremos óseos junto con osteoblastos y osteoclastos saltan el mínimo defecto óseo iniciando la osteogénesis. Este mecanismo de reparación se produce, por citar unos ejemplos, en la curación de las fisuras y en los procesos de fijación de una articulación mediante artrodesis (Pera, 1996).

B) *La reparación ósea secundaria*, esta es la habitual, llega a la curación del hueso mediante la formación de un tejido de granulación osteogénico y de un callo de fractura provisional. Se trata de un proceso continuo que para su mejor comprensión se divide en dos estadios.

En un primer estadio predominan los fenómenos inflamatorios y la proliferación de un tejido de granulación con capacidad osteogénica, apareciendo en este focos de cartílago hialino, de tejido fibroso y de hueso inmaduro.

En un segundo estadio se forma un callo fracturario provisional que posteriormente sufrirá un proceso de remodelación ósea hasta formar hueso maduro (Pera, 1996).

El primer estadio comienza con la producción de una hemorragia, por rotura de los vasos sanguíneos del hueso y tejidos circundantes, con la consiguiente formación de un hematoma que envuelve al foco de lesión ósea, la coagulación de la sangre del hematoma origina una malla de fibrina que sirve de entramado para la proliferación de yemas vasculares y la migración celular. Esta degradación de la sangre desencadena un fenómeno inflamatorio aséptico, con un gran infiltrado de leucocitos, principalmente neutrófilos, y más tarde de macrófagos que fagocitarán los desechos necróticos, también aparecen células indiferenciadas del estroma medular óseo, del periostio y del tejido conjuntivo adyacente, que invaden el coágulo a través de la malla de fibrina.

Al mismo tiempo se está produciendo, en toda esta zona, una proliferación de la microcirculación, consecuencia de todo esto es la formación de un tejido de granulación con capacidad osteogénica, en este tejido de granulación se encuentran histiocitos, otras células mononucleadas, osteoclastos y células mesenquimales progenitoras, las cuales comienzan a diferenciarse a osteoblastos, condroblastos y fibroblastos.

Entre el séptimo y décimo día aparecen en el tejido de granulación áreas de tejido fibroso, islotes de cartílago hialino y zonas con hueso inmaduro, formado por un proceso de osificación intramembranosa.

En este momento comienza el segundo estadio, durante el cual se rellenara totalmente la zona de fractura y se producirá la unión de los extremos fracturarios. Esta unión se consigue, si las condiciones mecánicas y biológicas son favorables, por la extensión directa de la formación de hueso inmaduro, entreverado con focos de cartílago hialino que terminará osificando por mecanismo endocondral. Estos focos cartilaginosos hialinos aparecen en zonas de isquemia relativa y en zonas sometidas a micromovimiento. Esta vía es la llamada osificación directa.

Si las condiciones anteriormente citadas son desfavorables se forma un callo de tejido fibroso que posteriormente se osificara con las características de hueso inmaduro, es la llamada osificación indirecta.

Tanto la osificación directa como la indirecta producen el mismo resultado, hueso inmaduro, la diferencia estriba en la velocidad a la que se forma, siendo esta más rápida en la osificación directa.

Posteriormente el hueso inmaduro va sufriendo un engrosamiento de las espículas óseas neoformadas y la precipitación de sales cálcicas, los osteoblastos y los osteoclastos comenzarán los procesos de modelado y remodelado, que están gobernados por las tensiones y cargas que soporta el hueso, transformándose el hueso en hueso maduro (Pera, 1996).

6.3.4. Estado actual de las terapias de regeneración ósea.

Todo el proceso de regeneración ósea, tanto natural como inducida terapéuticamente, se basa en la adecuada combinación de los tres elementos claves fundamentales, los osteogénicos que son las células osteocompetentes, los osteoconductores que serán las matrices aplicadas y los osteoinductores, entre los que se encuentran todos los factores proteicos anteriormente revisados.

Para poder potenciar e incluso iniciar el proceso de regeneración ósea, en la actualidad, las aproximaciones terapéuticas se basan en la actuación sobre uno o varios de los factores componentes del hueso.

Es clásica la administración de sustancias que forman parte del hueso como el Ca, solo o asociado a la vitamina D, o posteriormente la administración de sustancias que influyan en la bioquímica de la regulación ósea, como son las estatinas, de las que en 1999 Mundy y col. comunicaron en *Science* que aumentan la síntesis de BMP-2, o los bifosfonatos, con alta afinidad por el mineral óseo y que por un mecanismo no bien definido inhiben la actividad de los osteoclastos (Migliaccio, 2007).

También se ha intentado estimular el proceso natural de reparación ósea mediante la aplicación de factores de crecimiento derivados de las plaquetas (Marx y cols., 1998) o proteínas morfogéneticas (Boyne y cols., 2005).

Otra forma de potenciar la curación ósea es mediante la implantación de materiales bioactivos bien de clase B, osteoconductores como la hidroxiapatita o el fosfato tricálcico, o bien de clase A, osteoconductores y osteoinductores como los vidrios bioactivos (Jones, Lee y Hench, 2006).

A pesar de la variabilidad de vías desde las que se puede abordar la regeneración ósea, el patrón de oro en reconstrucción ósea sigue siendo el injerto autólogo de hueso pues aporta las células osteoformadoras (Salgado, Coutinho y Reis, 2004; Samartzis y cols., 2005; Tressler y cols., 2011).

Consideramos que el aporte de células osteoformadoras es fundamental, pues como hemos visto anteriormente, además de formar el entramado de la matriz osteoide, ellas son capaces de sintetizar factores solubles de señalización y diferenciación que a su vez les inducen a la formación de hueso. Este hecho ha

desarrollado un amplio espectro de investigaciones con células de diversos orígenes y diferentes formas de aplicación.

6.3.5. Estado actual de la investigación en regeneración ósea.

Se ha descrito la diferenciación “*in vitro*” en cultivos estáticos, de ES hacia osteoblastos, tanto a partir de la generación de cuerpos embrioides (Kawaguchi, 2006) como sin la necesidad de su generación (Duplomb y cols., 2007).

Es conocida la capacidad de diferenciación osteogénica en cultivo estático “*in vitro*” de las MSC_s obtenidas de la médula ósea (Haynesworth y cols., 1992; Bruder y cols., 1997; Pittenger y cols., 1999; Kadiyala y cols., 1997). Se ha investigado también su capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación en cultivos estáticos interactuando con distintos tipos de matrices, tanto poliméricas, como cerámicas y de materiales compuestos (Kakudo y cols., 2008; Ng y cols., 2008; Xu y cols., 2009; Ode y cols., 2010; Brammer y cols., 2010; Laranjeira y cols., 2010).

En el año 2001 se notificó la presencia de células troncales mesenquimales en la grasa (Zuk y cols., 2001), las ADSC, las cuales se han utilizado en multitud de estudios experimentales por su gran disponibilidad (Morizono y cols., 2003; Hicok y cols., 2004). Se especula con su posible pluripotencialidad (Zuk, 2010). Se han realizado múltiples experimentos de diferenciación osteogénica de las ADSC_s en cultivos estáticos, tanto con matrices como sin ellas (Zuk y cols., 2002; Xu y cols., 2005; Kern y cols., 2006; Leong y cols., 2008; Marino y cols., 2010), obteniéndose unos resultados similares a los obtenidos con las MSC.

Se postula que los cultivos estáticos en placas ven limitado el crecimiento celular cuando se emplean matrices de un grosor superior a las 300μm, pues por encima de este grosor se ve disminuida la difusión de nutrientes, oxígeno y metabolitos (Botchwey

y cols., 2003). Se ha investigado con diversos sistemas para el cultivo celular “*in vitro*” en constructos de tamaño superior a 300 μ m, siendo los más empleados los frascos flasks sometidos a agitación continua (Sikavitsas y cols., 2002), los biorreactores rotatorios (Botchwey y cols., 2001) y los biorreactores de perfusión (Yu y cols., 2004).

Se han reportado estudios sobre regeneración ósea en modelos “*in vivo*” mediante la implantación, en zonas ectópicas, de matrices sembradas con células mesenquimales (Kuznetsov y cols., 1997; Matsushima y cols., 2009; Ozeki y cols., 2010) y de matrices impregnadas con células y BMP (Na y cols., 2007; Jeon y cols., 2008;).

Se han realizado estudios sobre el grado de osificación tras la implantación de células mesenquimales sembradas en matrices tridimensionales en zonas ortópicas tales como la mandíbula (Schliephake y cols., 2001; He y cols., 2007), la calota (Koob y cols., 2010) y los huesos largos (Bruder y cols., 1998; Zhang y cols., 2010; Niemeyer y cols., 2010).

Un problema asociado a la ITO “*in vivo*” es el conseguir que las células permanezcan vitales dentro del constructo implantado, la neovascularización siguiente a la implantación tiene una importancia crítica para la supervivencia, integración y funcionalidad del implante celular. Se han realizado diversos experimentos para fabricar constructos prevascularizados, tanto “*in vitro*” (Fedorovich y cols., 2010) como “*in vivo*” (Fedorovich y cols., 2010; Seebach y cols., 2010; Wang y cols., 2010; Tavassol y cols., 2010).

En la búsqueda de procedimientos de regeneración ósea mediante ingeniería de tejidos, que se puedan aplicar en clínica humana con predictibilidad de resultados, se debería de actuar sobre los pilares claves de la ITO, haciendo especial hincapié en el conocimiento del papel que juegan las células precursoras, debiendo descubrir la

combinación óptima que nos permita la mayor y más rápida regeneración posible en cada caso particular.

Con esta finalidad desarrollamos el presente trabajo de investigación.

II.- JUSTIFICACIÓN

La pérdida de masa ósea, tanto a nivel local como a nivel general, osteoporosis, presenta, desde hace años, una prevalencia en aumento en el mundo desarrollado (WHO., 1994). Esta patología es preocupante por su elevada incidencia, por las complicaciones derivadas de ella y por su elevado coste social y económico (Díaz Curiel y cols., 2004). Este importante problema de salud pública empeorará en el futuro por el progresivo envejecimiento de la población que caracteriza a las sociedades desarrolladas.

En lo que respecta al tratamiento de la pérdida generalizada de masa ósea, la osteoporosis, mediante el tratamiento farmacológico, (terapia hormonal sustitutiva, calcitonina, bifosfonatos), aún no somos capaces de restaurar hueso de buena calidad pero si de conseguir que la pérdida de masa ósea se retrase lo más posible.

Respecto a las pérdidas localizadas de masa ósea, por ejemplo en los huesos maxilares edéntulos, las terapias convencionales basadas en los diferentes tipos de injertos óseos (Misch y Ditsh, 1993) y en la distracción ósea (Ilizarov, A, B, 1989) logran buenos resultados clínicos, pero siempre a expensas de la capacidad osteogénica del paciente, siendo su tejido óseo el que aporta las células osteocompetentes.

En los últimos 15 años se ha producido un importante progreso en el campo de la investigación con las células madre que ha llevado a la aparición de una nueva especialidad médica, la denominada medicina regenerativa (Stocum, 2001), la cual ha despertado un gran interés por el conocimiento íntimo de los mecanismos genéticos, bioquímicos y celulares mediante los que se forman los tejidos y los órganos , con el fin de recrear estos mecanismos en la reparación de los tejidos dañados, e incluso de intentar la reconstrucción de órganos mediante la llamada ingeniería de tejidos (Heineken y Skalar 1991; Langer y Vacanti, 1993).

Como se menciona en la introducción, uno de los tejidos candidatos a ser tratado mediante medicina regenerativa y técnicas de ingeniería de tejidos es el tejido óseo (Fodor, 2003; Salgado, Coutinho y Reis, 2004).

A lo largo de la introducción se ha expuesto la diversidad de estudios que se están llevando a cabo para conseguir la formación de tejido óseo en aquellas situaciones donde el hueso es incapaz de regenerar por sus propios medios. No obstante, en el momento actual, no se encuentra en las revisiones de la bibliografía consenso sobre un protocolo válido, con resultados predecibles y que posibilite una aplicación clínica generalizada.

Se ha reportado en 2009 el primer procedimiento, en humanos, basado en el empleo de ADSCs junto con BMP2 para la reparación de grandes lesiones maxilofaciales, habiéndose intervenido a más de 20 pacientes con una tasa de éxito mayor del 90% (Mesimäki y cols., 2009).

Sin embargo entre la comunidad científica existe una gran discrepancia sobre los procedimientos para la elaboración de los constructos (Kuznetsov y cols., 1997; Schliephake y cols., 2001; Botchwey y cols., 2001; Sikavitsas y cols., 2002; Botchwey y cols., 2003; Yu y cols., 2004; Jeon y cols., 2008; Matsushima y cols., 2009; Ozeki y cols., 2010), el tipo de células a utilizar (Kadiyala y cols., 1997; Mizuno y cols., 2003; Hicok y cols., 2004; Kawaguchi y cols., 2006; Duplomb y cols., 2007;) y los tipos de materiales más adecuados para la ITO (Kakudo y cols., 2008; Ng y cols., 2008; Xu y cols., 2009; Ode y cols., 2010; Brammer y cols., 2010; Laranjeira, Fernandes y Monteiro, 2010), encontrándose incluso resultados contrapuestos con el uso de una misma sustancia (Na y cols., 2007; Mesimäki y cols., 2009; Chou y cols., 2010; Zuk y cols., 2011).

A la vista de esta disparidad de procedimientos utilizados, consideramos que existen múltiples razones que justifican la realización de este trabajo de investigación, en un intento de desarrollar un protocolo de regeneración ósea sencillo y predecible, basado en la utilización de células madre que mejore los resultados obtenidos con los procedimientos actualmente utilizados, y que pueda ser de aplicación clínica en un futuro cercano.

III.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Y

OBJETIVOS

Como se ha mencionado en la introducción, en el mundo desarrollado se está produciendo un considerable aumento de la incidencia y de la prevalencia de las patologías asociadas a la pérdida de masa ósea, tanto localizada como generalizada.

La pérdida ósea localizada se hace especialmente relevante, en el territorio maxilofacial, a la hora de rehabilitar los maxilares edéntulos mediante implantes osteointegrados.

En la actualidad las técnicas para la promoción ósea localizada se basan, principalmente, en el empleo de diversos tipos de injertos, siendo el patrón de referencia (*gold standard*) el injerto de hueso autólogo (Salgado, Coutinho y Reis, 2004).

El injerto de hueso autólogo es osteogénico, aporta células osteocompetentes; es osteoinductivo, su matriz extracelular es rica en proteínas de señalización; y es osteoconductor, obviamente su estructura es idéntica a la del hueso a regenerar.

No obstante el uso de injertos de hueso autólogo presentan algunos inconvenientes (Tressler y cols., 2011) como son:

- El causar morbilidad en la zona donante.
- El proporcionar una cantidad limitada de material de injerto.
- El suministrar poca cantidad de células osteocompetentes viables.
- El prologar el tiempo de la intervención quirúrgica.

Si analizamos el mecanismo de acción de todos los tipos de injertos empleados en la actualidad veremos que el proceso de regeneración se encomienda, mayoritaria y principalmente, a las células con capacidad osteogénica existentes en los tejidos del propio paciente, actuando nuestros tratamientos como simples facilitadores de la tarea de estas células.

Pensamos que las células son el pilar básico de la regeneración, pues son ellas las encargadas de crear el tejido. Ellas forman la matriz extracelular que les sirve a su vez de soporte. También sintetizan los factores solubles de señalización presentes en la matriz extracelular los cuales a su vez influyen sobre ellas.

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que la aplicación, en la zona a regenerar, de gran cantidad de células, vehiculizadas en un medio que facilite su implantación, proliferación y diferenciación, podría aumentar la velocidad del proceso de regeneración ósea y la cantidad de tejido regenerado, en comparación con los procedimientos empleados en la actualidad.

Esta hipótesis nos plantea cuestiones del tipo de:

¿Qué clase de células implantar?. Ya hemos mencionado en la introducción todos los requisitos que tiene que cumplir la estirpe celular a implantar (Yang y cols., 2001). Nosotros nos hemos decantado por las células troncales mesenquimales procedentes del tejido adiposo. Las razones de esta elección se basan en:

- a) La gran disponibilidad de tejido adiposo en los mamíferos.
- b) Su fácil accesibilidad causando una mínima morbilidad.
- c) El excelente ratio de células por cantidad de tejido que presenta la grasa.
- d) La evidencia científica sobre su capacidad de proliferación y diferenciación.

La siguiente cuestión que nos planteamos es ¿cuál es el vehículo más adecuado para la implantación de estas células en el hueso?. Mantenemos la hipótesis de que, además de reunir los requisitos citados en la introducción, el vehículo de soporte

celular se tiene que poder aplicar en la práctica clínica mediante un procedimiento sencillo, asequible y fácilmente reproducible.

Para corroborar estas hipótesis nos hemos marcado como **objetivo principal** de esta tesis, el desarrollo de un modelo de regeneración ósea basado en la implantación de células madre mesenquimales. Siendo dicho modelo extrapolable a la práctica clínica diaria.

Para la conseguir este objetivo es necesario desarrollar los siguientes **objetivos secundarios**:

- Conocer el comportamiento biológico de estas células en cultivo, su capacidad de proliferación y de diferenciación.
- Establecer su perfil morfológico y fenotípico en el cultivo.
- Desarrollar una matriz tridimensional adecuada para la implantación celular *“in vivo”*.
- Estudiar el efecto de los implantes celulares desarrollados, en el tratamiento de lesiones óseas localizadas, en el modelo de experimentación animal.
- Comparar los resultados terapéuticos obtenidos mediante el método experimental desarrollado y los obtenidos mediante el injerto de hueso autólogo.

IV.- MATERIAL

Y

MÉTODOS

1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

Para realizar este trabajo de investigación se han utilizado 7 conejos, 4 machos y 3 hembras, albinos New Zealand, (*Oryctolagus cuniculus*), con una edad promedio de 2 meses en el momento de obtener el material biológico y de 5 meses en el momento del sacrificio. Se mantuvieron en jaulas independientes a temperatura ambiente y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. El peso promedio en el momento del sacrificio fue de 2,5 kg.

2. MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1. Obtención del tejido adiposo.

Siguiendo el protocolo aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal referencia PI 22/10, se procede bajo anestesia general con isofluorano, (Isovet®, Braun vetcare S.A), y en ambiente estéril a la lipectomía del tejido graso subcutáneo interescapular y abdominal. Una vez obtenidas las piezas de grasa se depositan en un tubo falcon de 50 ml con 30 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium, (DMEM) (Gibco®, Invitrogen), que contiene 7 sales minerales, 14 aminoácidos, 9 vitaminas, 1gr/l de glucosa, 0,5 gr/l de L-glutamina, 0,0150 gr/l de rojo fenol y 0,11 gr/l de piruvato, suplementado con penicilina, 100 U/ml y estreptomicina, 100 µg/ml, y con suero bovino fetal, (SBF) (Invitrogen) al 10 % y se conserva en frío, un máximo de 6 horas, hasta procesar la grasa. (Figura 7).



Figura 7. Aspecto de la grasa recién obtenida del animal de experimentación.

2.2. Obtención de las ADSCs.

Con el tejido adiposo obtenido se utilizan 2 metodologías diferentes para la obtención de las ADSCs:

2.2.1. Mediante disgregación enzimática.

Se realiza para obtener la fracción vasculostromal de la grasa, (FVS), en la cual se encuentran las células madre mesenquimales. Para el procesado de la grasa se ha seguido el procedimiento descrito por la Dra. Patricia Zuk, con algunas modificaciones (Zuk y cols., 2002).

Material.

- Centrifugadora (Eppendorf 5810R)

- Cabina de flujo laminar (Holteen HBB2460)
- Incubador orbital (New Brunswick, Innova 40)
- Contador celular Cell Coulter (Beckman.Coulter, Hialech Florida)
- Cámara de Neubauer (Blau Brand, Germany)
- Pinzas de Adson (Carl Martin)
- Tijera quirúrgica (Carl Martin)
- Tubos falcon de 50 ml
- Placas de cultivo
- Mallas de filtro Millipore (Becton Dickinson)
- Micropipeta y puntas de pipeta estériles.
- Buffer fosfato salino. PBS (Sigma)
- Suero bovino fetal. SBF (Invitrogen)
- Dulbecco´s Modified Eagle Medium bajo en glucosa y con glutamina. DMEM (Invitrogen)
- Penicilina y Estreptomicina 100X. P/S. (Gibco)
- Colagenasa tipo I (Sigma)

Preparación de los materiales.

Preparación de la colagenasa tipo I.

Se toma una alícuota de 50 mg de colagenasa tipo 1 6X (sigma) y se mezcla con 11 ml de PBS, una vez mezclada si filtra por una malla millipore de 0,22 μ m, después se activa, justo antes de utilizarse, poniéndola a 37º durante una hora en el baño María.

Preparación del medio de cultivo.

Se toma una botella de Dulbecco's Modified Eagle's Medium bajo en glucosa y con glutamina (Invitrogen) y extraemos 50 ml de medio.

Se descongela una alícuota de 50 ml de SBF (Invitrogen), se vierte en una jeringuilla de 50 ml, a la que previamente se ha colocado en la punta un filtro millipore de 0,22 μ m, y se filtra directamente en la botella de DMEM. Debemos de tener en cuenta que para filtrar los 50 ml de SBF necesitaremos 3 ó 4 filtros debido a su rápida saturación.

Tras el filtrado se añade con una pipeta una alícuota, previamente descongelada, de 5 ml de solución antibiótica conteniendo 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina.

Una vez preparado el medio, DMEM completo, se pueden hacer varias alícuotas de 50 ml, en tubos falcon. Estas se pondrán a atemperar a 37º C, también se puede atemperar toda la botella de 500 ml si no queremos alicuotar.

Método.

Fragmentación de la grasa.

Se realizara dentro de la cabina de flujo laminar. Con una pinza de Adson estéril cogeremos los pedazos de grasa obtenidos en la cirugía y con la tijera quirúrgica procederemos a trocearlos, en una placa de cultivo, en fragmentos lo más pequeños posibles.

Lavados con PBS.

Una vez troceada la grasa se coloca en un tubo falcon de 50 ml que se llena con PBS hasta alcanzar la señal de 40 ml, lo cerramos y lo volteamos varias veces con la mano para lavar la grasa, seguidamente aspiramos el PBS con una pipeta pasteur, se tiene que tener mucho cuidado para no obstruirla por aspiración de la grasa. Este paso se repite 3 veces.

Digestión enzimática de la grasa.

Tras el lavado de la grasa fragmentada se procede su digestión enzimática con la colagenasa tipo I que una hora antes hemos activado.

En el tubo falcon donde hemos hecho los lavados aspiramos todo el PBS quedando en el fondo la grasa, con una pipeta añadimos un quinto del volumen de la grasa de colagenasa tipo I, previamente activada, cerramos el falcon y lo colocamos en el incubador orbital a 37º C y 200 rpm durante 1 hora (Figura 8).



Figura 8. Digestión enzimática de la grasa en el incubador orbital.

Inactivar la colagenasa.

Transcurrida al menos una hora en el incubador orbital se procede a inactivar la colagenasa añadiendo en el tubo falcon SBF. La cantidad de SBF a añadir será de un décimo del volumen de grasa digerida.

Se centrifuga a 300 G durante 5' a temperatura ambiente, quedándose la grasa en la parte superior del tubo, se decanta con cuidado y después se aspira con la pipeta pasteur el líquido restante, hay que tener muchísimo cuidado en no aspirar el pellet que queda en el fondo del tubo.

Obtención de la fracción vasculo estromal.

El pellet que queda en el fondo del tubo se lava con 50 ml de PBS, (figura 9), se procede a disgregarlo con una micropipeta y se centrifuga nuevamente a 300G 5', de esta manera se logrará separar la fracción vasculo-estromal de los adipocitos.

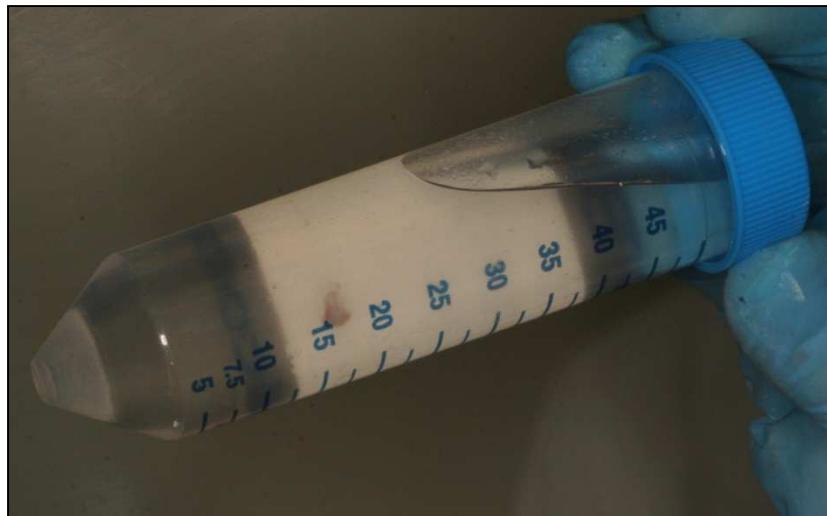


Figura 9. Disgregación en PBS del pellet formado por las células de la fracción vasulo estromal de la grasa.

Se aspira el sobrenadante dejando en el fondo el pellet adherido.

Se resuspende nuevamente el pellet en 5 ml de DMEM con 10% de SBF y penicilina/ estreptomicina, (DMEM completo). En el caso de tener varios tubos se junta el contenido todos en un solo tubo y se procede al filtrado en otro falcon de 50 con una malla de nylon de 40 μ m, (figura 10), al terminar de filtrar lavamos el filtro con igual volumen de medio que el volumen filtrado y se vuelve a centrifugar a 300 G durante 5 minutos.

Tras el centrifugado se aspira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 5 ml de solución buffer de lisis de eritrocitos, (solución de cloruro amónico NH₄Cl 160 mMolar), durante 5 minutos a 37° C, pasados estos se neutraliza el cloruro amónico con 10 ml de DMEM completo, se vuelve a centrifugar a 300 G durante 5 minutos a temperatura ambiente y se aspira el sobrenadante con cuidado de no llevarse el pellet.

Finalmente se resuspende el pellet en 10 ml de medio de cultivo, DMEM completo, procediendo a realizar el contejo celular.



Figura 10. Filtrado de la fracción vasculo estromal con una malla de nylon de 40 μm .

Contaje celular.

El procedimiento de conteo celular se puede realizar por dos procedimientos:

A) *Mediante equipos automáticos de conteo celular.*

Como el Cell Coulter (Beckman Coulter) basado en el principio de Coulter, descrito por Wallace H. Coulter en 1945. Se fundamenta en la medida de los cambios en la impedancia (resistencia) eléctrica que se produce cuando una partícula no conductora, en suspensión, en un electrolito atraviesa un orificio en el que hay una diferencia de potencial conocida. El cambio en la impedancia está determinado por el tamaño de las partículas (células), el número de pulsos eléctricos indica la cantidad de células que atraviesan el orificio. El sistema nos proporciona el número de células y su distribución por tamaño. Este procedimiento de conteo reduce el error estadístico en unas 10 veces respecto a los métodos microscópicos.

Método.

Con una micropipeta se cogen 150 μ l de la suspensión celular homogenizada y se colocan en un eppendorf de 2 ml. Se colocan 10 ml de solución de Isotone[®] en el vaso de contaje y se añaden 100 μ l de los 150 μ l de la suspensión celular, se agita suavemente para homogenizar la mezcla, con mucho cuidado para no provocar burbujas de aire, y se procede al contaje. (Figura 11). Una vez que nos da la concentración de células en el vaso de contaje se debe de calcular el número de células en la suspensión, teniendo presente la dilución. El aparato nos dice la cantidad de células que hay en 100 μ l, de suspensión celular, disueltos en 10 ml, al multiplicar por 100 se obtiene la cantidad de células presentes en 1 ml, se multiplica por el número de ml de suspensión celular y se obtiene el número total de células.

NT= Contaje coulter x 100 x ml de suspensión celular.

Siendo:

- NT número total de células.
- Contaje Coulter el nº de células en 100 μ l
- 100, el factor de dilución.
- Ml de suspensión, la cantidad de medio en donde hemos disgregado el pellet celular.



Figura 11. Contador celular automático Cell Coulter en funcionamiento. En la pequeña pantalla superior se puede observar el paso de las células. En la pantalla inferior aparece el número de células contadas.

B) Mediante métodos de contaje con microscopio óptico.

En estos métodos se emplean las cámaras de contaje, en nuestro caso se ha utilizado la cámara de Neubauer o hemocitómetro, (figura 12), la cual consiste en un portaobjetos con una o dos depresiones en el centro que forman uno o dos cuadrados (según sea simple o doble) de 3×3 mm en los cuales se encuentran 4 cuadrados, formados a su vez por 16 cuadrados más pequeños, de 1 mm^2 de área. (Figura 13). Al colocar un cubreobjetos este queda separado del fondo de cada cuadrado 0,1 mm de lo que resulta un volumen de $0,1 \text{ mm}^3$ en cada cuadrado.

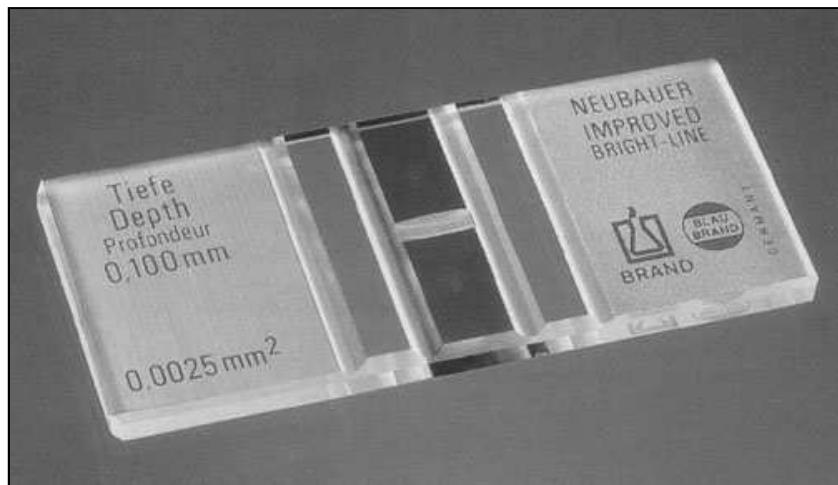


Figura 12. Cámara de Neubauer con doble cámara.

Para realizar el conteo se cogen 15 μ l de suspensión celular homogenizada (para una cámara doble) y se llena la cámara, con el microscopio se cuentan las células que hay en cada uno de los 4 cuadrados y se promedia, el resultado es el nº de células presentes en 0,1 mm^3 .

Si se aplica la fórmula $C = c \times f \times 10^4$ se obtiene la cantidad de células en 1ml.

Siendo:

- C, células en 1 ml

- c, promedio de células por cuadro, es decir cel. en 0,1 mm^3

- f, factor de dilución, si se ha diluido la suspensión.

Una vez se sabe el nº de células en 1 ml para saber el nº total solo hace falta multiplicar por el nº de ml de suspensión celular que se tienen.

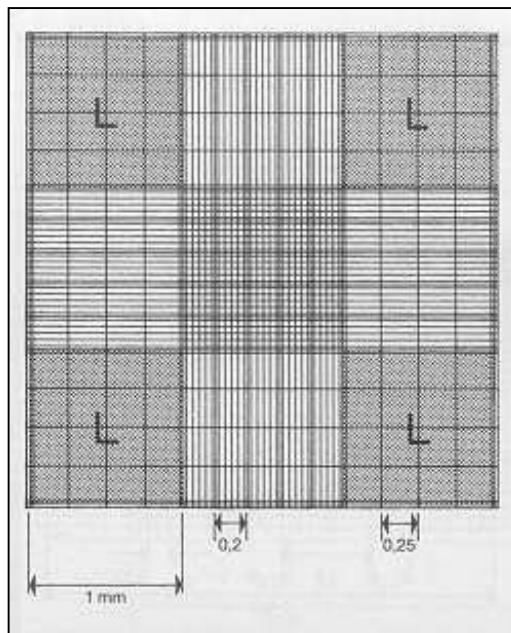


Figura 13. Cámara de Neubauer, donde L corresponde a los 4 campos de 1 mm^2 donde se realiza el recuento. Cada uno está formado por 16 cuadrados de $0,25 \times 0,25 \text{ mm}$.

Una vez se sabe el número de células obtenidas de la grasa procesada se procederá a la siembra de las células en la placa de cultivo.

Otra opción que tenemos para la obtención sin tener que procesar la grasa es mediante:

2.2.2. Mediante explantes de tejido adiposo.

Presenta como ventajas el evitar la manipulación química de la grasa, sus inconvenientes son el ser un procedimiento más lento y el no poder cuantificar el número de células que se obtienen por unidad de grasa.

No se encuentran en la literatura científica descripciones del uso de este procedimiento para la obtención de ADSC_s .

Material.

- Pinza Adson
- Tijera quirúrgica
- DMEM completo
- Placa de cultivo

Método.

Se toma con la pinza un fragmento de grasa y se trocea con la tijera sobre una placa de cultivo, (figura 14), se añaden 10 ml de DMEM completo y se introduce en el incubador a 37º C y 5 % de CO2, al cabo de 3 ó 4 días se revisa la placa con el microscopio de contraste de fases y se aprecia como aparecen células adheridas al plástico de la placa y otras con aspecto de adipocitos flotando.

Cuando se considera que hay suficiente número de células adheridas se puede retirar la grasa y cambiar el medio, de esta manera se eliminarán todos los detritus y las células flotantes.

La grasa retirada puede colocarse en otra placa de cultivo y se podrá obtener otro cultivo primario.

Hay que tener la precaución de retirar la grasa cuando haya suficiente densidad de células adheridas, en caso contrario las células proliferarán muy lentamente o no proliferarán.

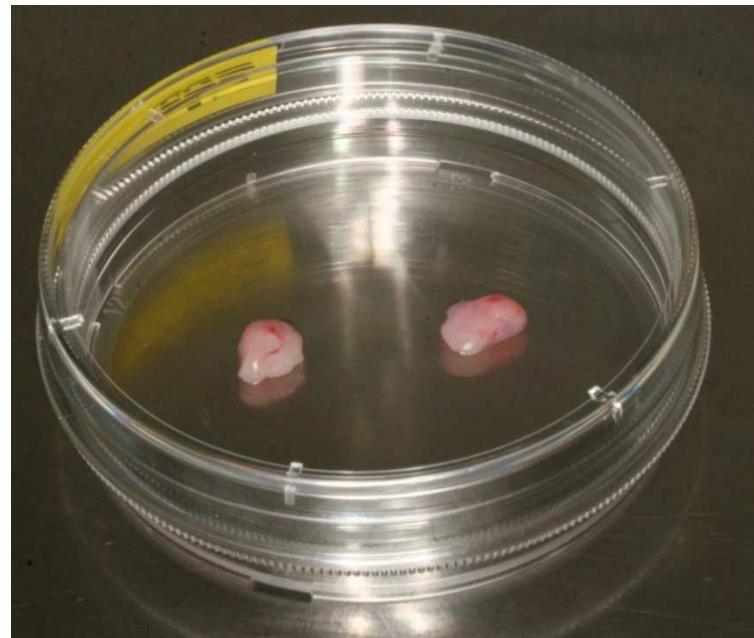


Figura 14. Preparación de los explantes de grasa en una placa de cultivo de 60 mm., antes de añadir el medio de cultivo.

3. EXPANSIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR

3.1. Siembra y cultivo primario.

Tras la obtención y el contaje de las células se procede a su siembra en la placa de cultivo para realizar el cultivo primario (aquel cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo).

La siembra se realiza a una densidad de 3×10^4 cel. / cm^2 . El tamaño de la placa estará en función de la cantidad de células que se vayan a sembrar, como medio de cultivo se empleará DMEM completo, la placa se introducirá en un incubador a 37°C y 5% de CO₂.

A las 24 horas de la siembra se procede a la aspiración de la mitad del medio de cultivo, con el fin de eliminar las células muertas y los detritus celulares del sobrenadante, se deja la otra mitad del medio para no eliminar los factores de crecimiento segregados por las células tras la siembra. El medio aspirado se repone con DMEM completo atemperado a 37°C y se introduce la placa en el incubador en las condiciones estándar. Se inspeccionará el cultivo primario cada 2 días para ver como proliferan las células y para ver su consumo de los nutrientes del medio.

3.2. Pasaje o repique del cultivo.

Una vez que el cultivo primario alcanza la confluencia, entre los 5 y 10 días, se procede a realizar el primer subcultivo mediante el repique o pasaje del cultivo primario, (transferencia o trasplante de células de un recipiente de cultivo a otro. Es sinónimo de subcultivo), a partir de esta resiembra “*in vitro*” obtenemos una línea celular que se define como el o los linajes celulares que se origina/originan a partir de un cultivo primario en el momento del primer subcultivo exitoso. Implica que los cultivos de la misma consisten en el/los linajes de células presentes originalmente en el cultivo primario.

Material.

- Placas de cultivo
- PBS
- DMEM bajo en glucosa y con glutamina completo (SFB + P/S)
- Tripsina + EDTA 0,05% (Gibco)

Método.

Con una pipeta pasteur conectada a la manguera de vacío se aspira todo el medio de cultivo, luego se procede a.

Lavar y aspirar la placa con PBS, se realiza 3 veces, de esta manera se eliminan los detritus y se permeabiliza el cultivo para mejorar la acción de la tripsina.

Se añade con la micropipeta 1 ml de tripsina + EDTA, para placas de 100, atemperado a 37°C. Con movimientos ondulantes nos aseguramos de que la tripsina humedece toda la superficie de la placa, después.

Se introduce la placa en el incubador a 37°C y 5 % CO₂ durante 5 minutos para que actúe la tripsina. Pasados estos se saca la placa del incubador y.

Se golpea suavemente en los bordes a la vez que la vamos girando, para despegar las células. Se comprueba en el microscopio de contraste de fases que las células se han despegado. En el caso de que esto no suceda se golpea un poco más y/o se vuelve a meter la placa en el incubador 2' más.

Una vez que hemos comprobado que están despegadas las células se inactiva la tripsina añadiendo 9 ml de DMEM completo, (para placas de 100), y pipeteando reiteradamente para disgregar los acúmulos celulares y despegar las que aún permanezcan adheridas. Hay que tener cuidado al lavar la placa de no hacer espuma ni salpicar la suspensión celular fuera de la placa.

Una vez disgregadas las células se transfieren con una pipeta a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugan a 300 G 5' a T° ambiente.

Tras la centrifugación se aspira con una pipeta pasteur todo el medio, con mucho cuidado de no aspirar el pellet celular adherido al fondo.

Una vez aspirado todo el líquido se resuspende y homogeniza el pellet en DMEM completo y se procede al recuento celular.

Finalmente se transfiere, con una micropipeta, a las placas de cultivo nuevas la cantidad de células deseada para la siembra, se añaden 10 ml de DMEM completo a 37°C, se agita cada placa en forma de X e Y griega, para distribuir uniformemente las células en a placa y se introducen las placas en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. Al cabo de unas 2 horas las células se habrán adherido a la placa y comienzan a proliferar.

Para la expansión de las ADSC_s de conejo hemos repicado, de forma habitual, cada placa de 100 en 4 placas nuevas.

3.3. Congelación y descongelación.

Una vez se ha expandido la línea celular, para poder tener células de reserva se procede a conservarlas mediante su congelación, por este procedimiento se pueden mantener en condiciones para su posterior cultivo durante 1 mes si se han congelado a -80°C o indefinidamente si se congelan en nitrógeno líquido a -192°C.

Congelación.

El proceso de congelación se debe de realizar lentamente con el fin de evitar la formación de cristales de agua intracelulares con el consiguiente daño celular. El dispositivo donde se colocan los tubos de congelación, criocooler, contiene alcohol

isopropílico el cual baja la temperatura 1ºC por minuto cuando está en el congelador de - 80º C. (Figura 15).

Material.

- SFB
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- Filtro millipore 0,22 µm
- Criotubos
- Criocooler
- PBS
- Tripsina + Edta 0,05 %
- DMEM completo

Método.

Primero se prepara el medio de congelación mezclando un 10% de DMSO con un 90% de SFB. Tras mezclarlos se filtra la solución con una malla millipore de 0,22 µm.

Se despegan las células de la placa igual que en el proceso de pasaje, previamente a la obtención del pellet se hace el recuento, una vez hecho este y obtenido el pellet, en vez de resuspenderlo en medio para la resiembra.

Se resuspenden las células en el medio de congelación, se pondrá 1 ml de medio de congelación por cada criotubo que se vaya a congelar. Podemos congelar a la concentración células/ml que deseemos pero siempre de 1 ml en 1 ml. No olvidarse de etiquetar cada criotubo con la fecha, tipo celular, nº de células y nº de pase, el etiquetado y preparado de los criotubos se realizará previo a la suspensión de las células en el medio de congelación, pues este es citotóxico.

Cuando se han llenado los criotubos se colocan en el criocooler y se lleva lo más rápido posible al congelador de -80°C, en este se deja 24 horas y pasadas estas se colocan los criotubos en la caja de congelación, que se podrá mantener, como máximo, 1 mes a -80°C o se pone en nitrógeno líquido si se quieren mantener más tiempo.

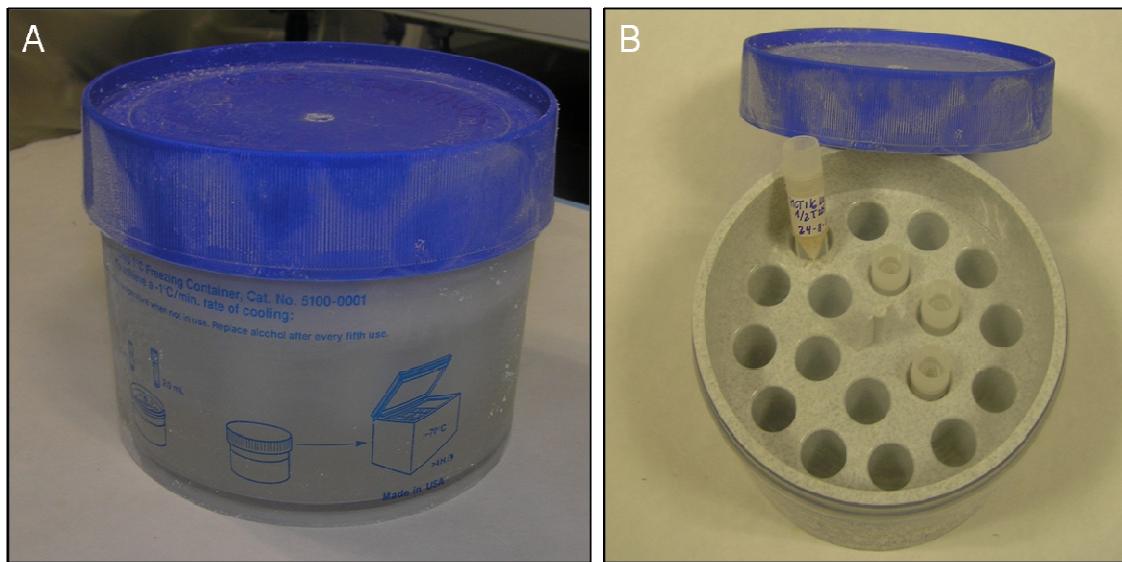


Figura 15. A) Criocooler utilizado para congelar las células. B) El criocooler abierto mostrando los pocillos donde se deben de introducir los criotubos

Descongelación.

La descongelación, al contrario que la congelación, conviene hacerla lo más rápida posible para evitar que las células sufran grandes cambios de volumen y estallen.

Método.

Previamente al inicio del procedimiento se debe de tener preparado un tubo falcon de 15 ml con 9 ml de DMEN a 37°C. Se saca del nitrógeno líquido el criotubo y se descongela en el agua caliente a 37°C, agitándolo suavemente con la mano hasta que no esté el medio cristalizado.

Una vez descongelado, se saca del agua caliente y se pulveriza con alcohol de 70° antes de introducirlo en la campana de flujo laminar, dentro esta se abre y se aspira con una micro pipeta de 1 ml, después se vierte gota a gota, en el falcon que hemos preparado previamente, golpeando suavemente para que se diluyan las gotas, cuando se ha vertido todo se cierra el tubo falcon y con mucha suavidad se volteá 2 ó 3 veces. En esta fase hay que ser muy cuidadoso dada la extrema fragilidad de las células recién descongeladas.

Se lleva la suspensión celular a la centrifugadora y se pone 5' a 300 G a T° ambiente, pasados estos se aspira el sobrenadante con cuidado de no llevarse el pellet del fondo.

Se resuspende el pellet con DMEM completo y se procede a la siembra en las placas de cultivo y se introducen en el incubador a 37°C y 5% de CO₂.

Pasadas 24 horas se aspira el medio, se hace un lavado con PBS y se pone medio nuevo. Con este procedimiento se eliminan las células muertas y los detritus.

4. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Las técnicas de cultivo celular se han convertido en herramientas fundamentales para la investigación pues nos permiten el control preciso del medio ambiente celular ya que en los cultivos se utilizan parámetros conocidos y controlables. Es muy importante conocer la cinética de crecimiento de los cultivos celulares para poder predecir cómo va a evolucionar un cultivo y de esta manera controlar la población celular con el fin de poder trabajar con ella.

Las células aisladas cultivadas en un volumen finito de medio de cultivo apropiado utilizan los nutrientes disponibles con la mayor eficiencia y rapidez posible, sintetizando sus componentes celulares y dividiéndose en cuanto consiguen duplicar su masa y su material genético. El tiempo que tarda una célula en hacer todo lo anterior es lo que se denomina **tiempo de generación**, este tiempo puede variar, para un mismo tipo celular, según sean las condiciones del medio de cultivo, sobre todo la concentración de nutrientes.

Cuando se realiza un cultivo celular estático o cerrado, el crecimiento del cultivo consta de varias fases (figura 16):

1) La fase latencia. Tras la siembra el crecimiento celular ocurre después de un cierto tiempo en el que las células se adaptan a las condiciones del medio y ponen en marcha su maquinaria metabólica para poder crecer. Se trata de un periodo de ajuste metabólico de duración variable, suele ser mayor cuanto mayor sea el cambio en el ambiente celular. Al final de la fase de latencia comienza una aceleración del crecimiento que nos lleva a la siguiente fase.

2) La fase exponencial o logarítmica. La mayoría de las células se dividen mediante fisión binaria, o bipartición, formando dos células hijas iguales. Así, una población que

comienza como una célula (2^0), se incrementa a dos células (2^1), luego a cuatro células (2^2), ocho células (2^3), 16 células (2^4), y así sucesivamente de forma exponencial. La fase log tiene lugar casi siempre cuando las células están en un ambiente favorable, pero no puede continuar indefinidamente, en un cultivo cerrado se puede ver frenado por la limitación de los nutrientes y/o por la inhibición del crecimiento celular por contacto, pasando a.

3) La fase estacionaria en la que no hay aumento neto de células, lo que no significa que no se dividan algunas, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros.

4) La fase de muerte en la que el número de células vivas disminuye debido a la muerte de las células, generalmente por lisis, es también una función exponencial aunque en muchos casos la velocidad de muerte es mucho más lenta que la velocidad de crecimiento exponencial.

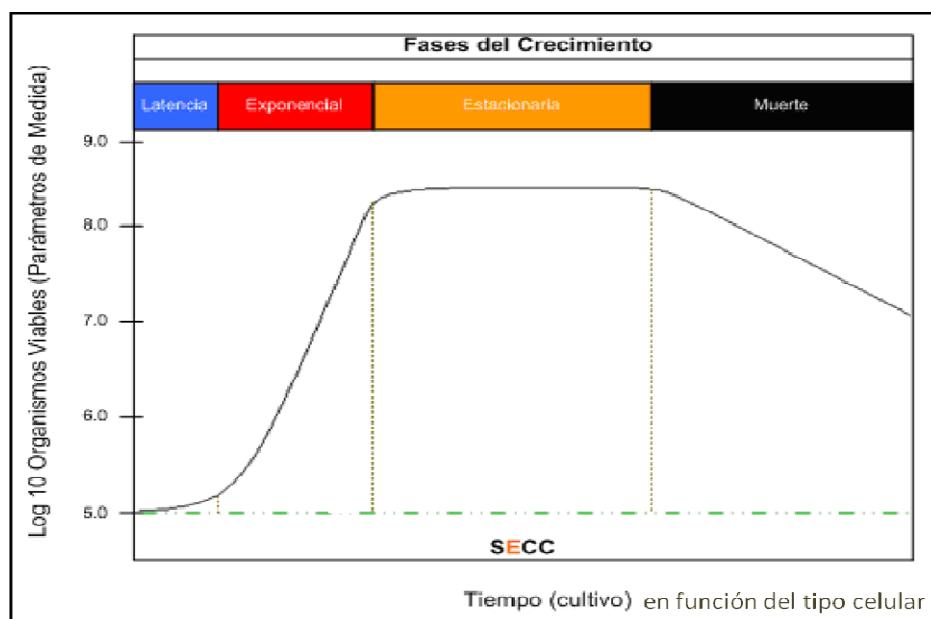


Figura 16. Gráfica de las fases de crecimiento celular. Gráfica obtenida de “Microbiología” de Brock y Madigan, 1993. Pág. 151.

En nuestro estudio, dada la inexistencia de antecedentes bibliográficos sobre la cinética del crecimiento de los cultivos de ADSCs de conejo, se considera imprescindible realizar el estudio de la biodinámica de cultivo de nuestras líneas celulares, para poder manejarlas, por este motivo se realiza el siguiente estudio.

4.1. Estudio de la velocidad de crecimiento del cultivo.

La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células por unidad de tiempo. En la fase de crecimiento exponencial la velocidad de incremento en el número de células es lenta inicialmente pero después se incrementa constantemente, si lo reflejamos mediante una curva de crecimiento exponencial expresada aritméticamente (n^o células/tiempo de cultivo) se ve que la pendiente se va incrementando progresivamente. Entre los datos experimentales necesarios para calcular el tiempo de generación, figuran los siguientes:

N_0 . El número de células iniciales.

N. El número de células al final de un intervalo dado.

t. El intervalo de tiempo.

Cada generación sucesiva duplicara la población. La relación entre el número de células y de generaciones se puede expresar en una serie de ecuaciones, así

$$N = N_0 \times 2^n \quad \text{Donde: } -N = n^o \text{ final de células.}$$

$-N_0 = n^o$ inicial de células y

$-n = n^o$ de generaciones.

Si se expresa la ecuación en término de n se deberán aplicar logaritmos neperianos

$$\log N = \log N_0 + n \times \log 2 \quad \text{donde podemos despejar } n = \log N - \log N_0 / \log 2$$

El tiempo de generación en la fase exponencial se calcula t / n , donde t es el tiempo transcurrido desde el inicio de la fase exponencial y su fin expresado en horas o en días.

El tiempo de generación es la constante de crecimiento, (velocidad de crecimiento), y es el tiempo en el que se tarda en duplicar la población celular.

Para la representación gráfica de la cinética de los cultivos se realizan curvas de crecimiento, expresando en el eje de abscisas el tiempo de cultivo, en horas o días, y en el eje de ordenadas el número total de células o el logaritmo del número de células.

Si se elige la representación del número de células respecto del tiempo se obtiene una curva con una determinada pendiente, si tomamos la expresión del logaritmo del número de células frente al tiempo se obtendrá una línea recta. (Figura 17)

Las ecuaciones exponenciales son muy difíciles de manejar gráficamente, por ello es mejor transformarlas en algo más sencillo de manejar gráficamente como puede ser una línea recta.

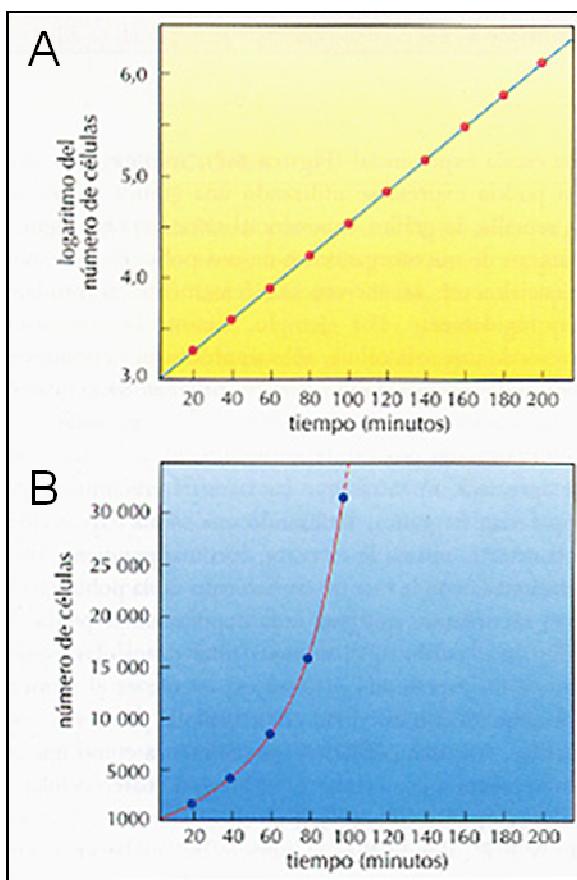


Figura 17. Representación gráfica de la fase exponencial del crecimiento celular. A) La expresión del logaritmo del número de células frente al tiempo es una línea recta. B) La representación del número de células frente al tiempo es una curva con una pendiente acusada.

Para nuestra investigación se realiza el estudio de la proliferación celular en diferentes pasos, es decir en células con diferentes grados de senescencia, y la proliferación con diferentes concentraciones de nutrientes en el medio.

4.1.1. Proliferación a distintos pasos.

Se realiza el estudio de la proliferación de la misma línea celular en el pase 1, en el 6 y en el 15, que corresponden a la primera, sexta y quinceava semanas de cultivo respectivamente.

Material.

- PBS

- Tripsina + Edta 0,05 %
- DMEM completo
- Placa de cultivo de 6 pocillos.
- Placa de cultivo de 100 mm.

Método.

Las células previamente expandidas en una placa de 100 mm se tripsinizan siguiendo el protocolo descrito para el repique, tras realizar su conteo se procede a la.

Siembra en una placa de cultivo de 6 pocillos a una densidad de $3,12 \times 10^3$ cel./cm² lo que supone 3×10^4 células por pocillo. También se siembran células en una placa de 100 mm para continuar la expansión de la línea celular

Cada 24 horas desde la siembra se tripsiniza un pocillo, procurando no elegir pocillos consecutivos, se procede al conteo mediante contador coulter y se anota el resultado en una tabla creada al efecto.

Una vez obtenidos los datos de toda la placa se confecciona las curva de crecimiento.

4.1.2. Proliferación a diferentes concentraciones de SBF.

Se prepara medio de cultivo DMEM bajo en glucosa y con glutamina, suplementándolo con penicilina y estreptomicina, se preparan 4 alícuotas de este medio, que se suplementan con SFB, una al 10%, otra al 5%, otra al 2,5% y la última al 1,25%. Se siembran 4 placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^4 células/pocillo

y cada una se cultiva con una de las alícuotas de medio preparadas. (Figura 18). Cada día se procede al recuento celular de un pocillo de cada una de las cuatro placas.

Se realiza la curva de crecimiento de cada placa y se comparan las velocidades de proliferación.

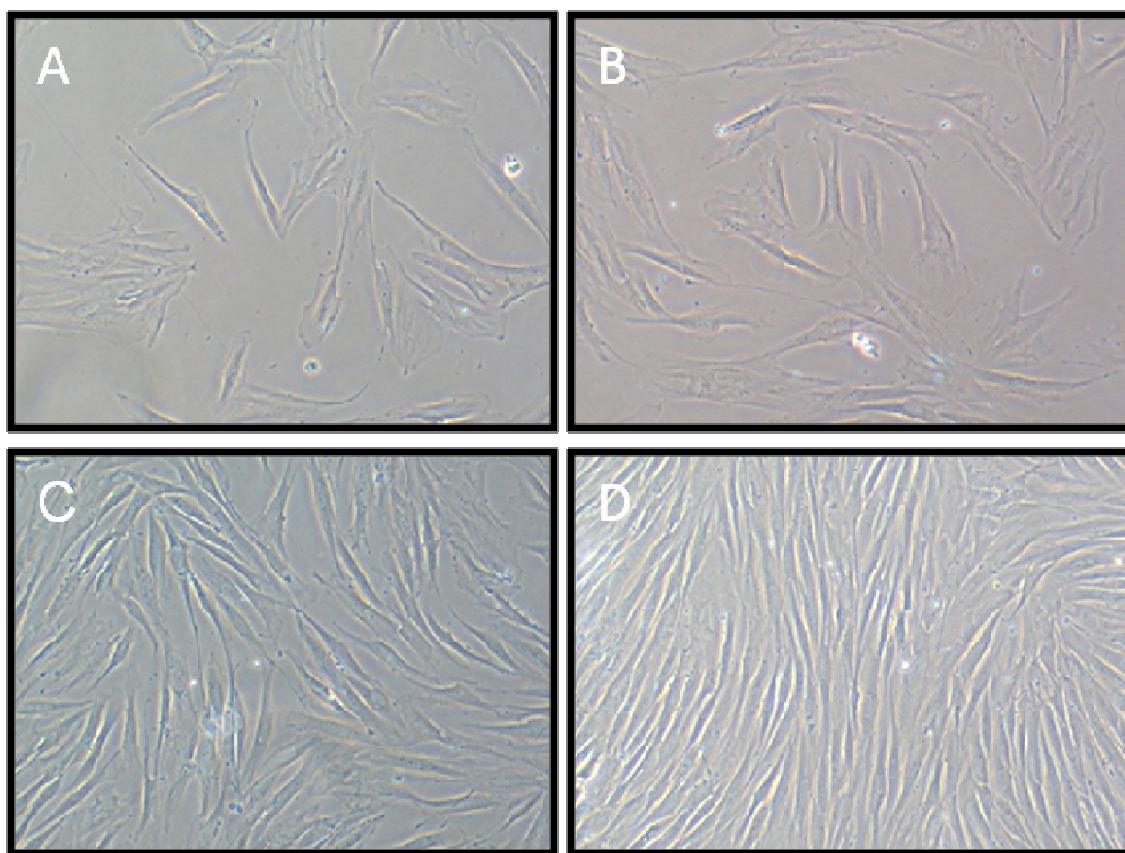


Figura 18. Cultivos, de la misma línea celular, al séptimo día desde la siembra. Cada cultivo tiene diferente concentración de suero bovino fetal en el medio de cultivo. A) Las ADSCs en DMEN con 1,25% de SBF. B) El medio de cultivo está suplementado con un 2,50% de SBF. C) Cultivo con 5% de SBF. D) Cultivo con el 10% de SBF.

4.2. Estudio de la viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular se realizó mediante la prueba de exclusión de la tinción con azul tripán. El azul tripán es un colorante aniónico del tipo azoico que puede penetrar en las células cuando tiene la membrana celular dañada, (no viables) y no las tiñe cuando están viables.

Al mismo tiempo que se realiza el conteo celular en el estudio de proliferación se procede al cálculo de la tasa de viabilidad celular, mediante la siguiente fórmula:

CV

Tasa viabilidad = ----- x 100 Donde:

CT

- CV= número de células vivas.

- CT= número total de células.

Material.

- Micropipeta y puntas.
- Tubos eppendorf.
- Azul tripán.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio óptico.

Método.

Se toma una alícuota de 25 µl de azul tripán y se coloca en un eppendorf.

Se toma una alícuota de 25 µl de la suspensión células y se mezcla con la de azul Tripán, homogeneizando la mezcla.

Se toman 12 μ l de la mezcla y se colocan en la cámara de Neubauer, procediendo al conteo del número de células viables, las cuales se ven blancas y brillantes, (figura 19), y al conteo del número total de células, blancas brillantes y azules.

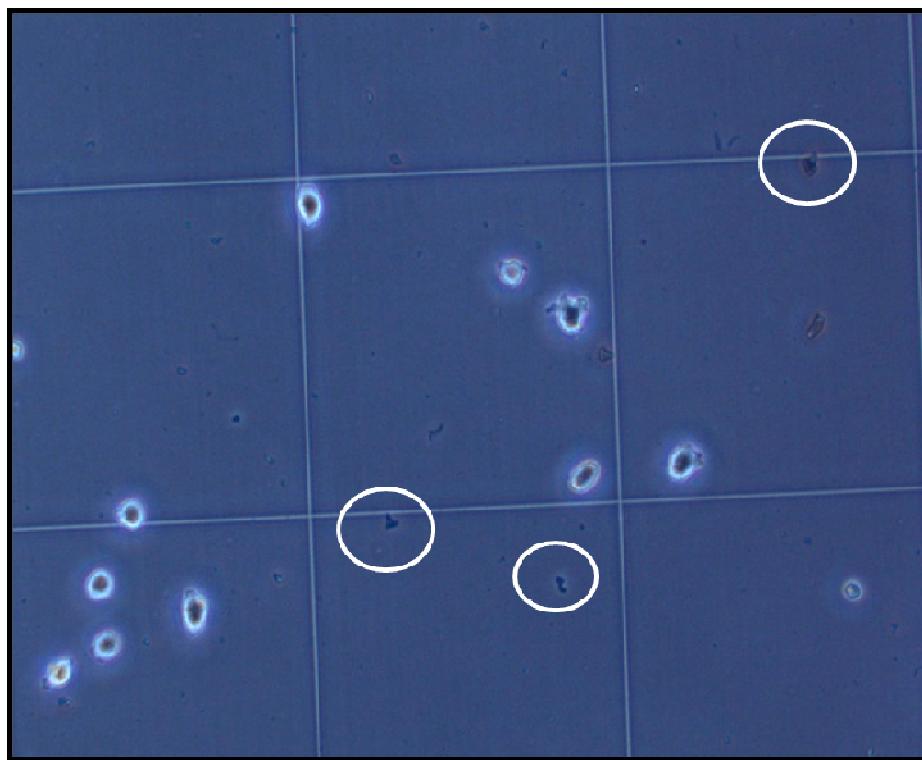


Figura 19. Las células viables, con la membrana celular íntegra, se ven con un halo blanco refringente, mientras que las células no viables, (círculos blancos), con la membrana celular dañada, se ven de color azul oscuro.

5. ESTUDIO DE LA CITOMORFOLOGIA.

Se realiza el estudio de la morfología celular, en el medio de cultivo, mediante su observación con el microscopio.

5.1. Microscopía óptica.

5.1.1. De células vivas

Mediante el microscopio de contraste de fases, se observa la morfología celular cuando las células están a poca densidad, en la placa de cultivo, y todavía no han establecido contactos intercelulares, (figura 20), también se observa su morfología cuando están en confluencia.

Se intentan establecer las características morfológicas que se repiten con más frecuencia y las formas básicas que adoptan en el cultivo.

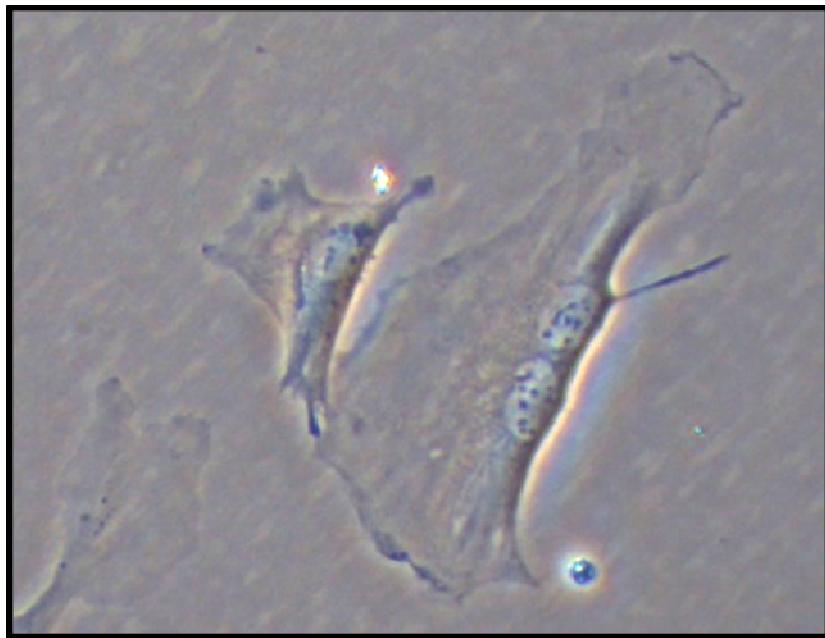


Figura 20. Cuando las células están en una confluencia muy baja se realiza la observación de su morfología.

También se intentan evidenciar los posibles cambios morfológicos producidos por el envejecimiento de la línea celular, el seguimiento se ha realizado hasta el pase 33.

5.1.2. De las células mediante tinción

Hematoxilina y eosina

Material.

- Solución de Hematoxilina de Mayer, (Sigma Aldrich).
- Etanol absoluto, (Panreac).
- Agua destilada.
- Eosina Amarillenta solución hidroalcohólica 1%, (Panreac).
- Xileno

Procedimiento.

Se aspira el medio de cultivo, se lava 3 veces con PBS, se aspira.

Se fijan las células con solución de formaldehído al 10% durante 15' a Tº ambiente.

Se aspira el fijador y se aclara con PBS.

Se añade la solución de hematoxilina de Mayer y se deja 15' a Tº ambiente.

Se aclara con agua corriente durante 15'.

Se aclara con agua destilada 30 segundos.

Se pone en alcohol de 95% (9,5 ml de agua destilada + 0,5 ml alcohol absoluto) durante 30 segundos, se aspira.

Se añade solución de eosina amarillenta hidroalcohólica al 1% durante 1' a Tº ambiente.

Se aclara con alcohol de 95% 2'.

Se aclara con alcohol absoluto 2'.

Se aclara con xileno 2', este último paso lo hacemos sacando el cubre de la placa, si no se ha hecho antes, pues el xileno reacciona con el plástico de la placa de cultivo.

Una vez hecha la tinción se observará en el microscopio como los núcleos celulares están teñidos de azul y el citoplasma está color violeta-rosáceo, (figura 21).

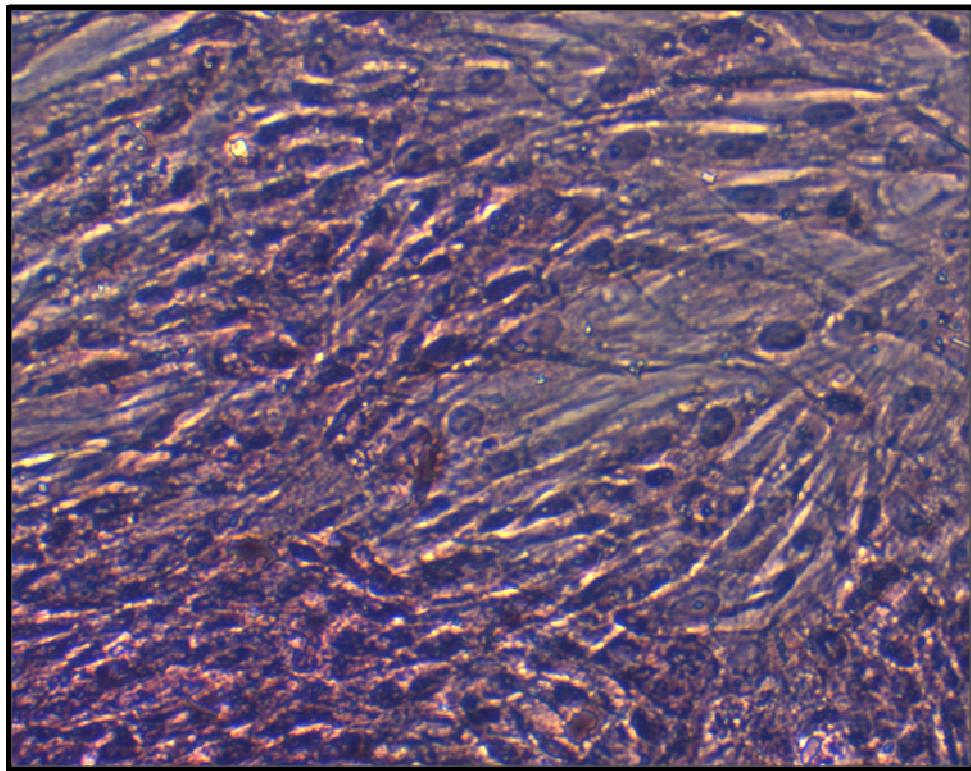


Figura 21. Tinción del cultivo con hematoxilina y eosina.

Azul de toluidina

El azul de toluidina es un colorante acidófilo derivado del tolueno que tiñe los componentes ácidos celulares, pudiendo comportarse como ortocromático, (tiñe de azul), como cuando tiñe los ácidos nucleicos o como metacromático, (tiñe de un color violeta-rojizo), como cuando se une a proteoglicanos y a heparán sulfato.

Material.

- Azul de toluidina, (Panreac Química SAU, Barcelona).
- Agua destilada

Preparación de la solución colorante.

La solución colorante se prepara al 1%, para ello se disuelven en un tubo falcon de 50 ml 0'5 grs. de azul de toluidina en 50 ml de agua destilada y se filtra la solución.

Procedimiento.

Se aspira el medio de cultivo, se lava 3 veces con PBS y se aspira.

Se fijan las células con solución de formaldehído al 10% durante 15' a Tº ambiente.

Se aplica la solución de azul de toluidina al 1% y se deja actuar 10' a Tº ambiente.

Se aspira el tinte y se aclara con agua destilada hasta obtener la saturación de color deseada, (figura 21).

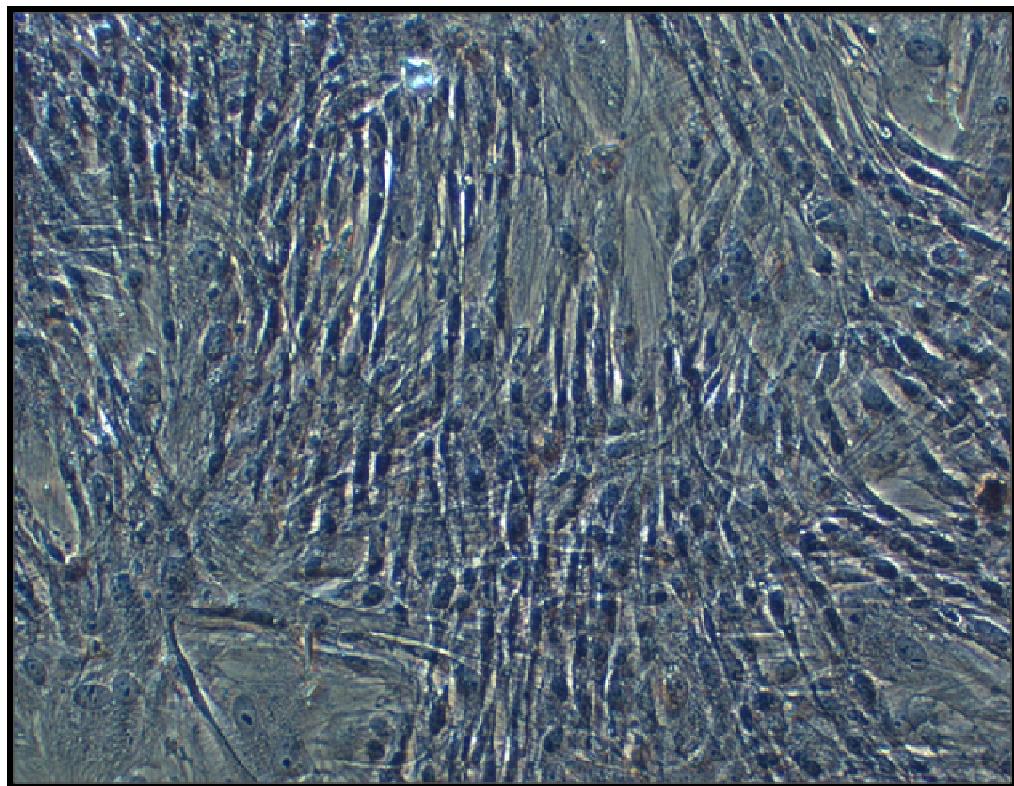


Figura 21. Tinción con azul de toluidina.

Inmunocitoquímica

Se tiñen los microfilamentos de actina del citoesqueleto celular mediante la faloidina, esta es un péptido bicíclico obtenido de las toxinas de la amanita faloides que tiene una alta selectividad con la actina. La faloidina se utiliza conjugada con un fluorocromo.

Material.

- Metanol
- Cloruro de amonio 1M
- Tritón X100
- Suero bovino fetal
- Alexa fluor® 488 phalloidin. (Invitrogen)

Preparación de las soluciones.

Tritón al 4%. Se toman 40μl de tritón X100 y se disuelven en 100 ml de PBS.

Solución del anticuerpo al 1/100. Se toman 30μl de Alexa fluor® Phalloidin y se mezclan con 150μl de suero bovino fetal y 2.850μl de tritón al 4%.

Procedimiento.

Se aspira el medio de cultivo de los pocillos que vamos a teñir y se lava con PBS 2 veces x 5'.

Se añaden 500μl/pocillo de metanol frio y se deja 5'a -20ºC.

Se retira el metanol y se lava con PBS 3 veces.

Se pone 1 ml/pocillo de PBS y se añaden 10μl/pocillo de cloruro de amonio, se deja actuar 5' y se aspira.

Se añade 1 ml de tritón al 4% en cada pocillo y se agita, (aspirando), con la micropipeta. Se repite 2 veces y se aspira.

Se cubren totalmente los cubreobjetos con la solución 1/100 del anticuerpo y se dejan incubar durante 1 hora en oscuridad.

Se lava 2 veces con tritón.

Se lava con PBS 2 veces, agitando (aspirando) fuertemente.

Se lava con agua destilada agitando con fuerza, (aspirando).

En este momento ya se puede proceder a la observación con el microscopio confocal, viéndose la morfología celular de color verde fluorescente. (Figura 22).

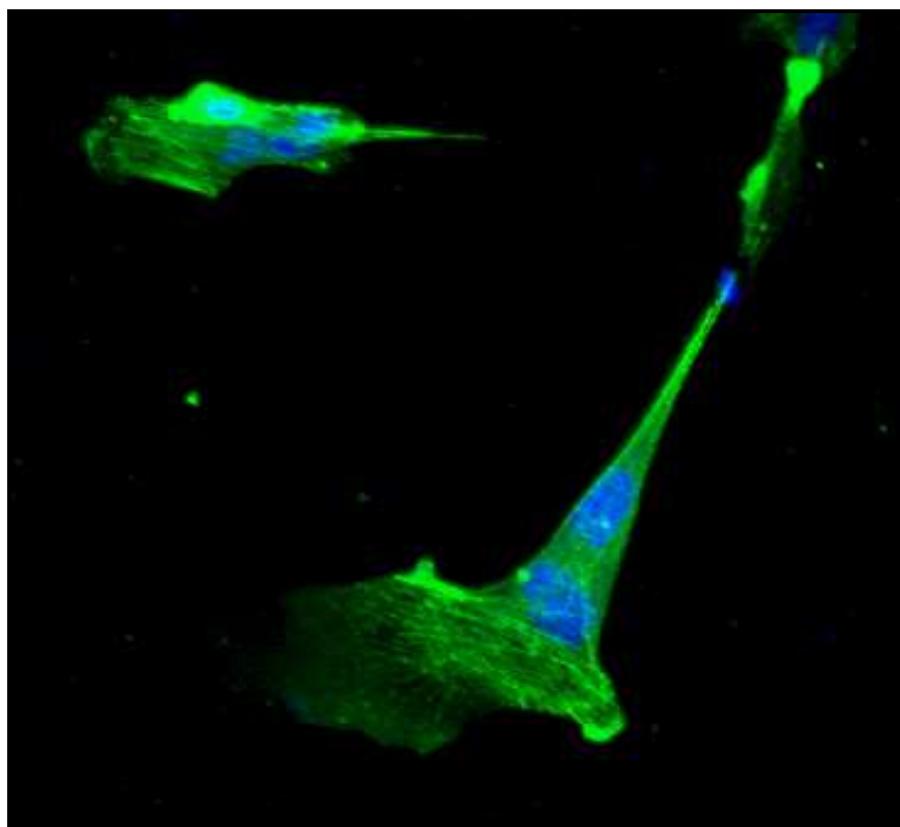


Figura 22. Inmunocitoquímica frente a la actina (verde). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

5. 2. Seguimiento del cultivo mediante microscopia de intervalos.

Para investigar la biodinámica de las células en el cultivo se ha empleado el sistema de microscopía multidimensional con control en tiempo real Leica AF6000 LX, (Leica Microsystems, Germany), con el cual se monitoriza el cultivo mediante la toma de fotografías a intervalos de tiempo previamente determinados. Este sistema consta de un microscopio, con una cámara digital, una cámara de incubación con control de Tº, CO₂ y humedad, y un programa informático de control y análisis, (figura 23).

Se ha realizado la filmación de 4 cultivos, 3 con medio de cultivo de expansión DMEM completo y 1 con medio α-MEM al que se le añade suplemento adipogénico (R&D System, Europe Ltd.) a alta concentración, 1,2 μ l de suplemento por ml de medio α-MEM, con la finalidad de sobreestimular al cultivo.

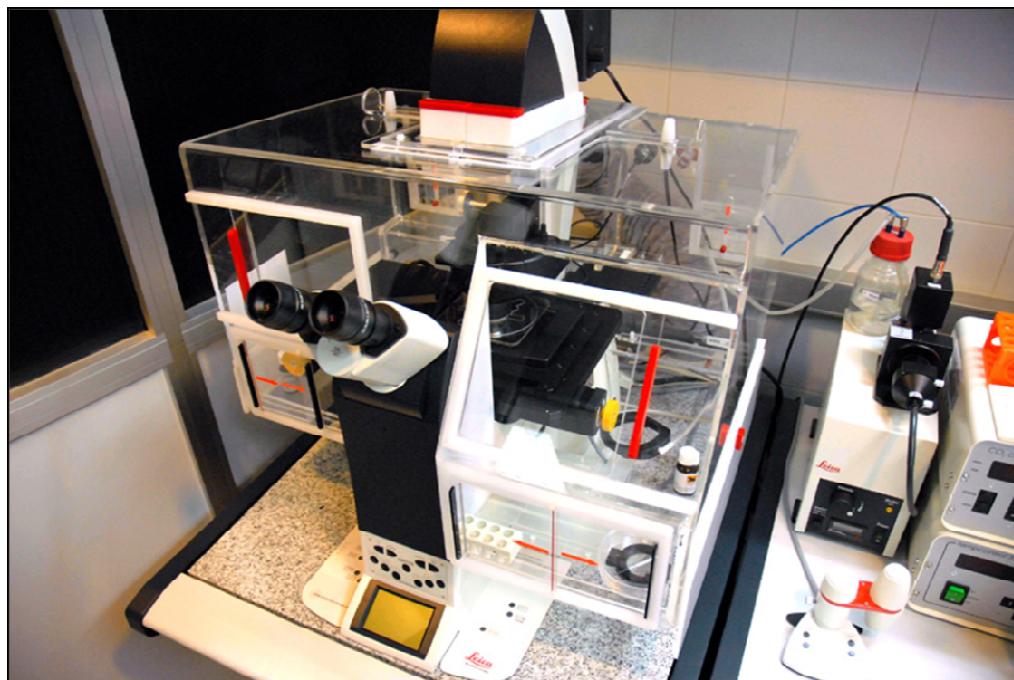


Figura 23. Sistema de microscopía multidimensional con control en tiempo real Leica AF6000 LX. Básicamente consta de un microscopio con una cámara fotográfica y un incubador para cultivos.

Hay que reseñar que los cultivos no se pueden realizar de forma simultánea, pues en el equipo solo se puede filmar una placa en cada experimento, esto obliga a realizar las filmaciones de una en una.

Es fundamental, una vez enfocada la zona de cultivo a filmar, no provocar el más mínimo desplazamiento de la placa para no perder el enfoque.

Material.

- Placas de cultivo para análisis de células vivas, de 35 mm. (Ibidi GmbH, Nunchen, Germany).
- Micropipetas y puntas desechables.
- Microscopio invertido DM16000B. (Leica Microsystems, Germany).
- Objetivo seco HC PL FLUOTAR 20X. (Leica Microsystems).
- Cámara de incubación para observación in vivo. (Leica Microsystems).
- Cámara CCD modelo ORKA 9100-02. (Hammatsu Photonics KK, Japan).
- Programa informático LAS AF. (Leica Microsystems).

Método.

Se siembran las células en una placa de 35 mm de diámetro para análisis de células vivas, para cada filmación. (Figura 24).

Se monitoriza, cada cultivo durante una semana, utilizando el sistema de microscopía Leica AF6000 LX, con la cámara de incubación ajustada a 37°C y 5% de CO₂, con el objetivo HC PL FLUOTAR 20X.

El medio de cultivo correspondiente se cambia cada 2 ó 3 días, se aspira el medio con una micropipeta y seguidamente se añade el medio correspondiente, también con una micropipeta. Hay que tener especial cuidado en no desplazar la placa de cultivo.

Las imágenes del cultivo se toman a intervalos de 10', con la cámara CCD ORKA 9100-02.

Estas imágenes posteriormente se analizan y procesan con el programa informático LAS AF, para realizar el montaje de los videos.



Figura 24. Placa de cultivo Ibidi para análisis de células vivas, de 35 mm y perfil bajo.

6. FENOTIPAJE.

No se ha encontrado un marcador de superficie específico de las MSC_s (Pittenger y Martin, 2004).

Las células mesenquimales se pueden caracterizar por la expresión de ciertos antígenos de superficie, como el CD29, CD44, CD71, CD90, CD105 y el CD166. Las MSC_s no expresan los marcadores hematopoyéticos CD14 y CD45 (Lee y cols., 2004).

En la tabla 2 se ve el fenotipo molecular actualmente aceptado para las MSC de origen humano. Se han consensuado los prerrequisitos fenotípicos mínimos para poder considerar a una célula como mesenquimal humana, estos son que exprese el CD73, CD90 y CD105 y sea negativa a los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y para CD11, CD14, CD19, HLA-DR y c-kit. (Dominici y cols., 2006).

Marcadores + de las ADSC ^s	Marcadores – de las ADSC ^s
CD 9	CD 11
CD 10	CD 14
CD 13	CD 19
CD 29	CD 31
CD 44	CD 34
CD 49	CD 45
CD 54	CD 79
CD 55	CD 80
CD 59	CD 117
CD 73	CD 133
CD 90	CD 144
CD 105	HLA-DR
CD 106	C-kit
CD 146	My-88
CD 166	STRO-1

Tabla 2. Perfil de consenso de la expresión de los marcadores de superficie de las ADSC_s humanas en cultivos in vitro. En color rojo se muestran los prerrequisitos mínimos de expresión que deben de cumplir las células para considerarse ADSC_s humanas.

Se realiza el fenotipaje, para la identificación de la población celular, mediante el estudio de los marcadores de superficie celulares, para esto nos valemos de técnicas de inmunofluorescencia con los fluorocromos isotianato de fluoresceína, FITC-A, y ficoeritrina, PE-A, y del citómetro de flujo separador celular FACSaria de DB. (Figura 25). Se estudian los marcadores CD13, CD15, CD19, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA AB, HLA-DR y c-kit, este último mediante tinción por inmunofluorescencia indirecta sobre cubreobjetos y visión microscópica.



Figura 25. Citómetro separador celular FACS Aria. Es digital y con una capacidad de adquisición de muestras de hasta 70.000 eventos por segundo. Posee láseres en estado sólido de 407, 488 y 633 nm. Y un novedoso sistema óptico en octógono.

Para realizar el fenotipado mediante citometría de flujo es aconsejable emplear un elevado número de células, entorno a 2×10^6 células. Estas se agrupan en un tubo falcon de 15 ml, con 10 ml del medio de cultivo.

Material.

- Puntas y pipetas serológicas.
- Tubos Eppendorf de 2 ml. 1 por marcador.
- Gradilla para los Eppendorf.
- Anticuerpos.
- Fluorocromos.
- PBS.
- Sytox blue®. (Invitrogen Life Technologies S.A.).

- FACSaria. (bd biosciences, BectonDickinson & Company).

Procedimiento.

Se centrifugan las células a 300 G, 5', se aspira el medio de cultivo, se lava una vez con PBS y se prepara la suspensión celular en PBS con EDTA 2nM en cantidad suficiente para hacer todos los marcadores.

Se colocan 50μl de la suspensión celular en cada tubo eppendorf, empleando un tubo distinto para cada marcador, recomendado, aunque se pueden solapar algunos anticuerpos en el mismo tubo, no recomendado.

Se añaden, en cada tubo, 5μl del anticuerpo deseado, este viene a una concentración de 0.1mg/ml.

Se deja incubar durante un cuarto de hora, en nevera a 4°C y en oscuridad.

Se centrifuga durante 7' a 290 G y se aspira el sobrenadante, con cuidado de no arrastrar el pellet.

Se lava con PBS, 500μl por eppendorf, se centrifuga 5'a300 G y se aspira el sobrenadante.

Se resuspende en 200μl de PBS y se añaden 0,5μl de tinte fluorescente Sytox blue, para marcar las células muertas.

Se incuba 5'a temperatura ambiente y en oscuridad y se llevan al citómetro de flujo. Este nos hará la lectura y nos dará una gráfica, la cual se puede imprimir. (Figura 26).

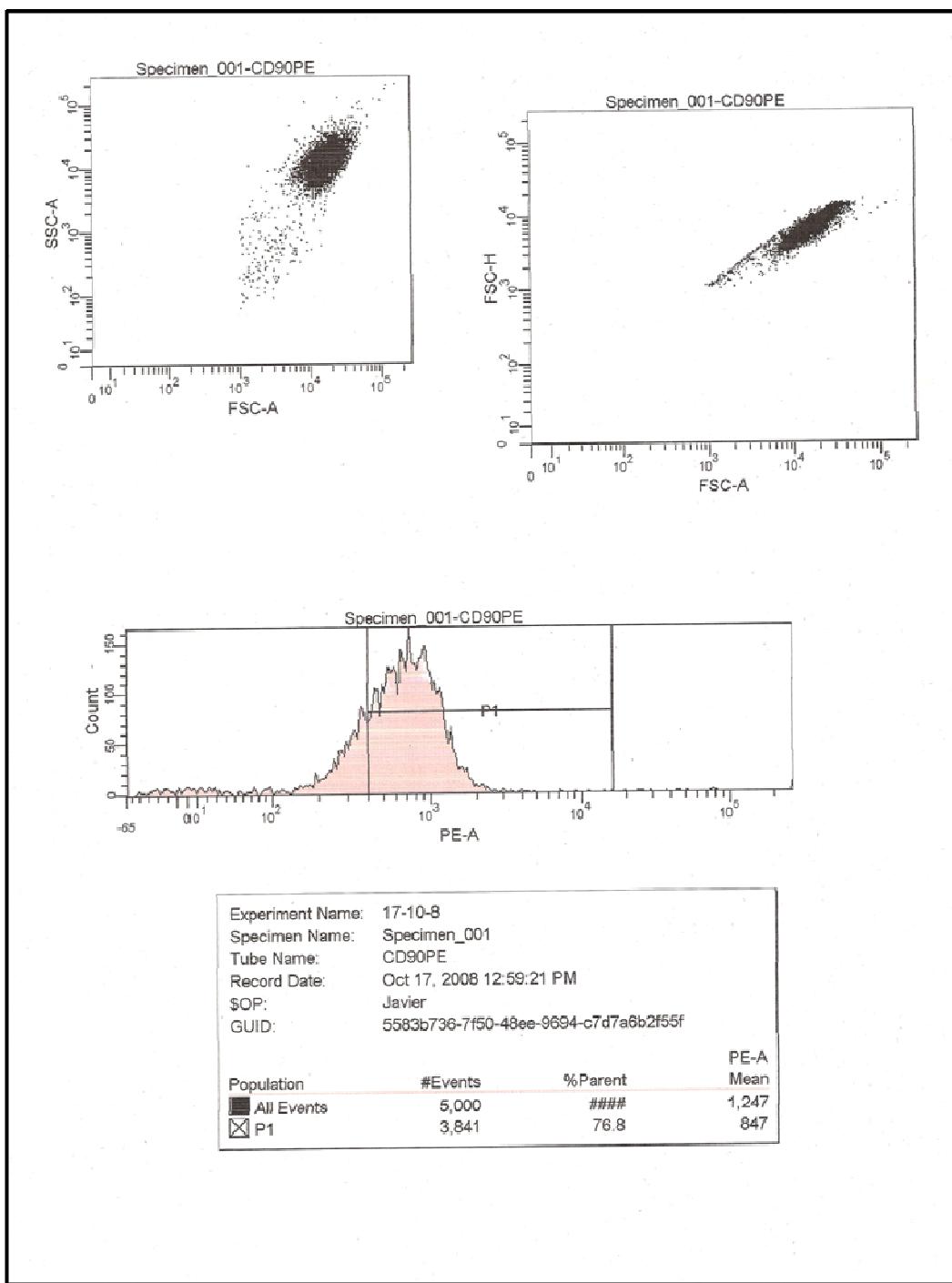


Figura 26. Ejemplo de una hoja de impresión del conteo con el citómetro de flujo. En este caso en concreto se trata de la del CD90.

7. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN.

Las ADSC_S tienen la capacidad de diferenciarse en distintos linajes mesodérmicos tales como adipocitos, osteocitos, condrocitos y miocitos (Pittenger y cols., 1999), también hay evidencias de que se pueden diferenciar en células de linajes no mesodérmicos como neuronas, (Safford y cols., 2002), y hepatocitos, (Seo y cols., 2005).

En la presente investigación se ha ensayado la diferenciación hacia linaje osteogénico, condrogénico, adipogénico y neurogenico con la finalidad de demostrar la pluripotencialidad de las ADSC_S de conejo.

7.1. Diferenciación osteogénica.

Material.

- Placas de cultivo de 12 pocillos.
- Cubreobjetos de 12 mm de diámetro.
- Tubos Falco de 15 y 50 ml.
- Pipetas serológicas y puntas.
- Medio de cultivo α-MEM con 10% de SBF, penicilina/estreptomicina y glutamina.
- Suplemento osteogénico stemXVivo 20X. (R&D Systems, Inc.).

Preparación del medio basal de cultivo.

Para poder llevar a cabo la diferenciación en una placa de 12 pocillos, (figura 27), dejando 4 de control sin diferenciar, se prepararán 200 ml de medio de cultivo, (sobrará un poco para posibles imprevistos), en 4 tubos Falcon de 50 ml que contendrán cada uno:

- 45 ml de medio basal α-MEM. (Invitrogen).
- 5 ml de SBF.
- 500 µl de la mezcla penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.
- Glutamina 2 mM/ml.

Se guardaran en refrigeración a 4°C hasta su uso.



Figura 27. Placa de cultivo de 12 pocillos.

Preparación del medio de diferenciación.

Se añadirán 2,5 ml de suplemento osteogénico stemXVivo; que contiene dexametasona, 1,25 dihidroxicolecalciferol, glicerofosfato-β, y ascorbato-fosfato en concentración desconocida, por decisión del fabricante propietario de la patente; a 50 ml del medio de cultivo anteriormente preparado.

7.1.1. Diferenciación en multicapa.

Se prepara una placa de 12 pocillos introduciendo en cada pocillo un cubreobjetos de 12 mm de diámetro, previamente esterilizado en autoclave y en etanol al 70%, la finalidad de colocar los cubreobjetos es poder obtener células en distintos tiempos de diferenciación sin alterar el cultivo.

Se obtienen las células mediante la tripsinización de una placa de expansión, resuspendiéndolas, al final del proceso, en el medio de cultivo anteriormente preparado.

Se siembran los pocillos a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células/cm², lo que viene a ser unas 130.000 células/pocillo.

Se añaden 2 ml/pocillo del medio de cultivo completo, (10% SBF + Penicilina/Estreptomicina + glutamina) y se introduce la placa en el incubador a 37°C y 5% de CO₂, se controlará diariamente el cultivo hasta que alcance el 70-80% de confluencia.

Una vez se alcanza la confluencia deseada se sustituye el medio de cultivo por medio diferenciador, se dejarán 4 pocillos con el medio de cultivo, son los que servirán de control de la diferenciación.

Cada 2-3 días se cambian los medios correspondientes y se observa con el microscopio de contraste de fases los cambios que se van produciendo en el cultivo. En función de estos se determina el grado de diferenciación.

7.1.2. Diferenciación en bola.

Se trata de una variante del procedimiento de diferenciación, desarrollada por nosotros, que presenta la ventaja de poder controlar visualmente el cultivo, sin necesidad de microscopio.

Para preparar el cultivo se necesita una suspensión celular muy concentrada, se toma una placa de 100 en confluencia y se recogen las células en 1 ml de medio, lo que viene a ser una concentración de 18×10^5 cel./ml.

En una placa de 12 pocillos se coloca un cubreobjetos, de 12 mm de diámetro, en cada pocillo, se siembra a una densidad de 13×10^4 cel./pocillo. La siembra se realiza con una micropipeta depositando unos 72 μ l de la suspensión celular con cuidado de que quede en forma de gota, el pocillo obviamente está sin medio de cultivo.

Una vez sembrados todos los pocillos se coloca la placa en el incubador a 37º y 5% de CO₂ durante 2 horas, con la finalidad de que las células se adhieran al cubreobjetos.

Pasadas las 2 horas en 8 pocillos se añaden, con mucho cuidado, 2 ml/pocillo de medio de diferenciación, los otros 4 pocillos se dejan de control añadiendo en cada uno 2 ml de medio sin suplemento osteogénico.

Los medios de cultivo se cambian cada 2 ó 3 días, a la vez que se monitorean los cultivos. A los 15-20 días se puede observar el progreso del cultivo a simple vista.

7.1.3. Comprobación de la diferenciación.

7.1.3.1. Actividad de la fosfatasa alcalina.

Se comprueba mediante la prueba citoquímica de tinción utilizando la técnica de los naftoles y la sal de diazonio. Como resultado de la actividad de la fosfatasa alcalina, ALF, se libera naftol AS-MX el cual es acoplado con la sal de diazonio formándose un pigmento insoluble visible.

Material.

- Sal Fast Blue RR. (Sigma-Aldrich)
- Solución de Naftol AS-MX fosfato 0,25% (Sigma-Aldrich)
- Solución de citrato concentrado 1,5 molar. (Sigma-Aldrich)
- Hematoxilina de Mayer (Panreac)

Preparación de los reactivos.

Solución de citrato. En un tubo falco de 50 ml se ponen 25 ml de agua destilada y se le añaden 500 µl de la solución de citrato concentrado 1,5 molar. Se conservará entre 2º y 8º C.

Solución fijadora. Se trata de acetona tamponada con citrato, en una proporción de 3 partes de acetona en 2 partes de solución de citrato. La solución de citrato previamente prepara se lleva a una temperatura entre 18º y 26º C, se ponen 8 ml en un tubo falcon de 50 ml y se le añaden 12 ml de acetona. La solución fijadora se prepara justo antes de su uso, desecharlo la que sobre después del procedimiento.

Solución de sal de diazonio. En un tubo falcon de 50 ml se ponen 48 ml de H₂O destilada y se disuelve a temperatura ambiente una capsula de sal Fast Blue RR, una vez disuelta se añaden 2 ml de naftol AS-MX fosfato mezclándolos bien.

Método.

Las células diferenciadas hacia linaje osteogénico expresan tempranamente fosfatasa alcalina. A los 10 días de comenzada la diferenciación se sacan de la placa de 12 pocillos 3 cubreobjetos, 2 de células diferenciadas y 1 de las de control, y se depositan en una placa de cultivo de 35 mm.

Se lavan con PBS los cubres, 3 veces.

Se fijan con solución fijadora que debe sobrepasar los cubres, hay que ponerla suavemente para evitar que estos floten, se deja actuar durante 30' a temperatura ambiente. Después se aspira la solución.

Se añade la solución de sal de diazonio, hasta cubrir los 3 cubreobjetos, y se la deja actuar durante 30' a temperatura ambiente y protegida de la luz. Pasados estos se aspira el tinte.

Se aclara con H₂O destilada, durante 2'. Transcurridos estos se aspira sin llegar a secar los cubres.

Se añade la solución de hematoxilina de Mayer durante 10'.

Se aclara con H₂O destilada durante 3' y se procede a la observación microscópica

7.1.3.2. Depósito de calcio.

Mediante citoquímica se comprueba que las células diferenciadas hacia osteoblastos depositan calcio en la matriz extracelular que van formando.

Tinción con rojo alizarina.

La alizarina es un colorante que se puede obtener de forma natural a partir de la raíz de la *rubia peregrina*, (figura 28), o de forma sintética calentando la antraquinona con hidróxido de sodio obteniendo la 1,2 dihidroxiantraquinona



Figura 28. Aspecto de la *Rubia peregrina*, planta de la que se obtiene la alizarina natural.

La alizarina en contacto con el calcio produce su quelación formando un compuesto birrefringente de color rojo. El tinte se prepara diluyendo la alizarina en polvo en agua destilada, en una proporción de 0,5 gr de polvo en 25 ml de líquido. Es fundamental ajustar a 4,2 el Ph de la dilución utilizando hidróxido de sodio. Una vez preparada a mezcla se filtra con una malla de 0,22 μm .

Método.

Entre los 18 y 25 días de cultivo, se sacan de la placa de cultivo los cubres que se van a teñir y se colocan en una placa de 35 mm, se procede a su:

Lavado con PBS 3 veces.

Se fijan con etanol al 70% durante 1 hora a -20° C, pasada esta se aspira.

Después se hacen 3 lavados con H₂O destilada, de 5' cada uno a T° ambiente.

Se añade la solución de rojo alizarina, dejándola actuar 10'. Seguidamente

Se lava con H₂O destilada y se procede a la observación microscópica.

Tinción de Von Kossa.

Esta tinción detecta los depósitos de Calcio o de sales cálcicas. Se basa en la sustitución de los iones de Ca⁺⁺ por iones de plata, los depósitos de Ca⁺⁺ se colorean de negro.

Material.

- Solución de nitrato de plata al 2%.
- Carbonato de Litio.Tampón amoniacial (Diapath).
- Tampón reductor (Diapath).
- Tiosulfato sódico (Diapath)

Método.

De una placa de cultivo se extraen los cubres que se van a teñir y se coloca cada uno en un pocillo de una placa de 6 pocillos, a continuación.

Se lava con PBS durante 1', pasado este.

Se fija con formaldehido al 10% durante 15', se aspira el fijador y

Se lava con PBS, 3 veces, después se aspira dejando humedad.

Se añade la solución de nitrato de plata y se deja 1 hora bajo luz UV o halógena intensa, una vez transcurrida la hora se hace.

Un lavado con H₂O destilada y se aspira.

Se añade la solución de carbonato de litio durante 10', luego se aspira.

Un lavado con H₂O destilada y se aspira.

Se añade el tampón amoniacal y se deja 1 hora en oscuridad.

Se lava con H₂O destilada 4 veces y

Se añade el tampón reductor durante 5'.

Se lava con H₂O destilada.

Se añade el tiosulfito sódico al 5%, dejándolo 5'.

Se lava con H_2O destilada y esta la opción de contrateñir con Kernechtol 5' o visualizar directamente.

7.1.3.3. Activación de los genes que gobiernan la síntesis de proteínas de la matriz ósea.

La actividad celular puede relacionarse con la expresión o la desactivación de ciertos genes, el nivel de expresión será proporcional al número de copias del RNAm de un gen determinado.

De esta manera en las ADSC_s indiferenciadas cuando sufren el proceso de diferenciación osteogénica se produce, por acción de la RNA polimerasa, la transcripción de la información contenida en algunos genes (DNA bicatenario) a los RNAm_s, (monocatenarios) los cuales una vez madurados saldrán del núcleo al citoplasma uniéndose a los ribosomas para dirigir la síntesis de las proteínas de la matriz ósea.

A partir del conocimiento del nivel de expresión de los genes de una célula podemos obtener datos relativos a la síntesis de las proteínas que caracterizan el estado diferenciado de todas las células, así podremos saber si el proceso de diferenciación se ha llevado a cabo.

Se ha utilizado la técnica de Northern blotting para obtener el RNA purificado por electroforesis en gel de agarosa, que posteriormente se identifica mediante sondas específicas. Su principal inconveniente es la necesidad de cantidades importantes de RNA, no siendo efectivo cuando la cantidad de RNA es limitada.

Esto se solventa mediante el empleo de la técnica de la PCR, (polymerase chain reaction), la cual permite la ampliación selectiva de un fragmento de DNA específico,

uno de sus inconvenientes es el que la medición se realiza al final del proceso y no se puede cuantificar.

Mediante la PCR cuantitativa ó en tiempo real se resuelve el problema de la cuantificación. Esta técnica acopla la transcripción inversa y la PCR convencional, así se expresan los niveles de RNA_m interpretado como DNA_c , (DNA complementario), generado por transcripción inversa y que se amplifica por la reacción en cadena de la polimerasa. Aquí el proceso de detección y amplificación se producen de manera simultánea, la cuantificación se realiza por la medición de la fluorescencia emitida por los agentes intercalares, con un fluorocromo, que se añaden en el procedimiento. Para poder llevar a cabo esta técnica los termocicladores utilizados tienen que incorporar un lector de fluorescencia. (Figura IV. 23)



Figura 29. A) Termociclador serie GeneAmp que incorpora un lector de fluorescencia. B) Placa P96 colocada para su lectura.

Material.

Como reactivos específicos se utiliza el Kit Cells to cDNA II-Ambion, (AB Applied Biosystems. Foster City. CA. EEUU). El cual produce DNA_C, partiendo de pequeñas cantidades de células, sin necesidad de aislar el RNA, así en su procedimiento se puede agregar el lisado celular a la reacción de síntesis de DNA_C.

Este Kit contiene:

- Tampón de lisado celular II.
- DNasa tipo I.
- Tampón de transcriptasa reversa 10X.
- M-MLV transcriptasa reversa.
- Inhibidor de RNasa.

También se empleará:

- PBS
- Placas de PCR. P96 Costar Flat Bottom
- Vortex.
- Minicentrífuga.
- Termociclador Serie GeneAmp. Applied Biosystems Foster City. CA. EEUU
- Micropipetas y puntas para PCR
- Solución de dioxinucleótidos de trifosfato, (dNTPs). Biotools B&M S.A
- Oligodecámeros ó cebadores. Oligo dT
- NaOH 0,1M
- Solución HCL 0,1M
- Colorante fluorescente Hoechst 33258
- DNA calf thymus. (D4522 Sigma-Aldrich)

Preparación de las mezclas de reacción.

Se preparan las mezclas para 10μl de DNA_c).

Mezcla I: 1μl de los cebadores apropiados. (oligodecámeros).

2μl de dNTPs.

Mezcla II: 1μl de tampón RT 10X

0,5μl de M-MLV Retrotranscriptase

0,5μl de RNase Inhibitor

Método.

Se programa el termociclador a 75º C.

Se aspira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS frio.

Se lisan las células con el tampón de lisado celular. Este estará frio y la placa de cultivo tiene que estar sobre hielo. Tras el lisado se mezcla con la micropipeta y.

Se pasan 100μl a una placa de PCR limpia depositada sobre hielo procediendo a:

Inactivar las RNasas mediante la incubación a 75º C durante 15' en el termociclador previamente programado. Pasados estos se lleva la placa a hielo.

Se añaden 2μl de DNasa bovina de tipo I, en cada tubo, para evitar la interferencia con DNA contaminante en el RNA.

Se mezcla con un pulso en el vortex y se centrifuga, se recoge el lisado y.

Se incuba a 37º C 15' seguido de 5' a 75º C. Una vez incubado se procede a:

La síntesis de DNA_C. Para esto en una placa de PCR nueva se pondrán, por reacción, 5μl de solución de lisado celular y se le añaden 3μl de la mezcla I, (2μl dNTPs, 1μl de los cebadores apropiados).

Se mezclan y centrifugan y se incuba a 75ºC durante 3', transcurridos estos se lleva a hielo 2', para frenar la reacción.

Se añaden 2μl de la mezcla II, (1μl de 10 RT Buffer, 0,5μl de M-MLV retrotranscriptasa y 0,5μl RNase Inhibitor) y se incuba a 42ºC durante 60' y luego a 95ºC durante 10' para detener la acción de la enzima.

Seguidamente se procederá a la amplificación y cuantificación del DNA mediante la coamplificación de una concentración conocida de un DNA control con el de estudio, mediante una PCR relativa.

Se tomaran 200μl de la solución de extractos obtenidos en un tubo eppendorf.

Se añaden 400μl de NaOH 0.1M y se deja incubar 30'a Tº ambiente.

Se neutraliza la reacción con 400μl de disolución HCl 0. 1M (NaCl+NaH₂PO₄+ HCl)

En una placa P96 Costar Flat Bottom se ponen 100μl del colorante fluorescente Hoechst 33258 0.7μg/ml

Se añaden 100μl de la solución de extractos

Se añade por triplicado 100 μ l de patrón de DNA Calf thymus

Se leerá la fluorescencia de excitación a 360/40nm y de emisión a 460/40nm.

En nuestro caso se utilizó una placa de 12 pocillos de la cual se diferenciaron en linaje osteogénico 8 pocillos, de estos 4 se comenzaron a diferenciar 10 días después de los 4 primeros, los otros 4 se dejaron de control sin diferenciar.

Se investigó el nivel de RNA_m de la osteonectina y la expresión de RunX2, también llamado Cbfa 1, el cual codifica una proteína nuclear con un dominio Runt DNA-binding, (RUNX2), la cual es un factor de transcripción clave en la diferenciación de los osteoblastos. También se investigó el nivel del mensajero de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, (GAPDH), enzima que cataliza la glicólisis y es esencial para el funcionamiento de las células. Se utiliza como control endógeno normalizador, suponiéndose que su expresión se mantiene relativamente constante en las condiciones del ensayo.

7.2 Diferenciación condrogénica.

La diferenciación hacia linaje condrogénico se puede realizar mediante dos procedimientos diferentes lo cual condiciona el utilizar diferentes medios y materiales.

En nuestro trabajo se realiza el procedimiento clásico de formación de micromasa en tubo falcon y también el procedimiento de la diferenciación en placa, el cual tiene la ventaja de facilitar la realización de procedimientos citoquímicos de tinción.

7.2.1. Diferenciación en micromasa

Material.

- Tubos falcon de 15 ml
- Pipetas serológicas y puntas
- Medio de cultivo DMEM/F12, (Invitrogen), con glutamina y Penicilina / Estreptomicina.
- Suplemento condrogénico stemXVivo 100X (R&D Systems, Inc.).
- Suplemento Insulina, Transferrina y Selenio. ITS (R&D Systems, Inc.).
- Papel de aluminio.

Preparación del medio basal de cultivo.

Se preparan 50 ml de medio basal que serán suficientes para todo el procedimiento. Se mezclan en un tubo falcon de 50 ml:

DMEM/F-12. (Invitrogen), 49 ml

Suplemento Insulina, Transferrina y Selenio. ITS (R&D Systems, Inc.), 500µl

Solución Penicilina/estreptomicina y glutamina, 500µl a razón de 100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 3 mM/L glutamina.

Preparación del medio de diferenciación.

Para preparar el medio de diferenciación se añadirá al medio basal DMEN-F12, preparado anteriormente, el suplemento condrogénico stemXVivo 100X, el cual viene para diluir 1parte en 100 partes, y que contiene dexametasona, ascorbato-fosfato, prolina, piruvato y TGF-β3, en concentraciones desconocidas debido a secreto del propietario de la patente.

En un tubo falcon de 15 ml se colocan 7,5 ml del medio de cultivo anteriormente preparado y se le añaden 75 μ l del medio de diferenciación 100X, previamente atemperado a 37°C. El resto que no se use se guardará a 2°-4°C en oscuridad, debiéndose forrar el tubo con papel de plata. Se prepararán tubos sucesivos en función del número de diferenciaciones que estemos realizando.

Método.

Se tomarán 250.000 células mediante la trypsinización de una placa de cultivo y se colocarán en un falcon de 15 ml.

Se centrifuga a 300 G durante 5' y seguidamente se aspira el medio, cuidando de no aspirar el pellet.

Se resuspende el pellet en 1ml del medio basal DMEM/F-12 y.

Se centrifuga a 300 G, 5' y se aspira con cuidado el medio.

Se resuspende el pellet en 0,5 ml del medio de diferenciación condrogénico y

Se centrifuga a 300 G, 5', transcurridos estos se saca el tubo de la centrifuga, se forra con papel de aluminio y se introduce en el incubador a 37° C y 5% de CO₂, colocando los tubos en vertical en una gradilla. Se aflojarán los tapones de los falcon para permitir el intercambio de gases. No se aplica ningún tipo de movimiento.

Cada 2 ó 3 días se cambiará el medio diferenciador, aspirando con mucho cuidado para no dañar el pellet que se va formando, (figura 30), y añadiendo, también muy cuidadosamente, 0,5 ml del medio de diferenciación condrogénico fresco.

Entre 15 y 20 días la diferenciación se habrá producido.

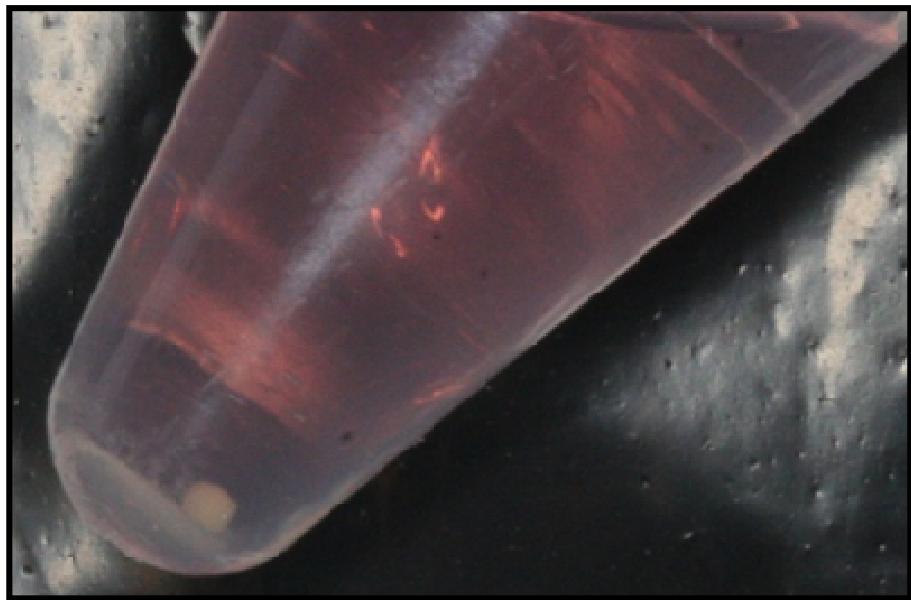


Figura 30. Cultivo de diferenciación a cartílago por el procedimiento de diferenciación en micromasa, en tubo.

7.2.2. Diferenciación en placa

Material.

- Placa de cultivo de 6 pocillos.
- Pipetas serológicas y puntas.
- DMEM bajo en glucosa y con glutamina (Invitrogen)
- SBF. (Gibco-Invitrogen)
- Penicilina/Estreptomicina (Gibco)
- Suplemento Insulina, Transferrina y Selenio. ITS. (R&D Systems, Inc)
- Suplemento condrogénico 100X StemXVivo (R&D Systems, Inc.)
- Papel de aluminio

Preparación del medio basal de cultivo.

En un tubo falcon de 50 ml se mezclan:

49 ml de DMEM bajo en glucosa y con glutamina.

500 μ l de suplemento ITS.

500 μ l de Penicilina/Estreptomicina.

Preparación del medio de diferenciación.

A los 50 ml del medio basal anteriormente preparado se les añade una ampolla, 0,5 ml, de suplemento condrogénico stemXVivo 100X, que contiene dexametasona, ascorbato-fosfato, prolina, piruvato y factor de crecimiento transformante β_3 .

Método.

Se toman 960.000 células mediante la trypsinización de una placa de cultivo de 100.

Se centrifugan a 300 G, 5' y se aspira cuidadosamente el medio.

Se resuspenden en 60 μ l de DMEM bajo en glucosa, con 10% de SBF, glutamina y penicilina/estreptomicina, homogeneizando la suspensión.

Se colocan 10 μ l de la suspensión en cada pocillo de una placa de 6 pocillos, cuidando de depositarlos en una sola gota en el centro de la placa.

Se introduce la placa en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante 90', para que se adhieran las células a la placa. Una vez transcurridos estos se saca la placa y.

Se añaden en 3 pocillos 3 ml/pocillo del medio diferenciador, con cuidado de no despegar las células recién adheridas.

En los otros 3 pocillos se añaden 3 ml/pocillo de DMEM bajo en glucosa, con glutamax, 10% de SBF y P/S. Estos se utilizarán como control.

Se envuelve la placa con papel de aluminio y se introduce en el incubador a 37°C y 5% de CO₂.

Cada 2-3 días se cambian los respectivos medios, produciéndose la diferenciación entre los 15-20 días. El cultivo se puede monitorizar por visión directa. (Figura 31).

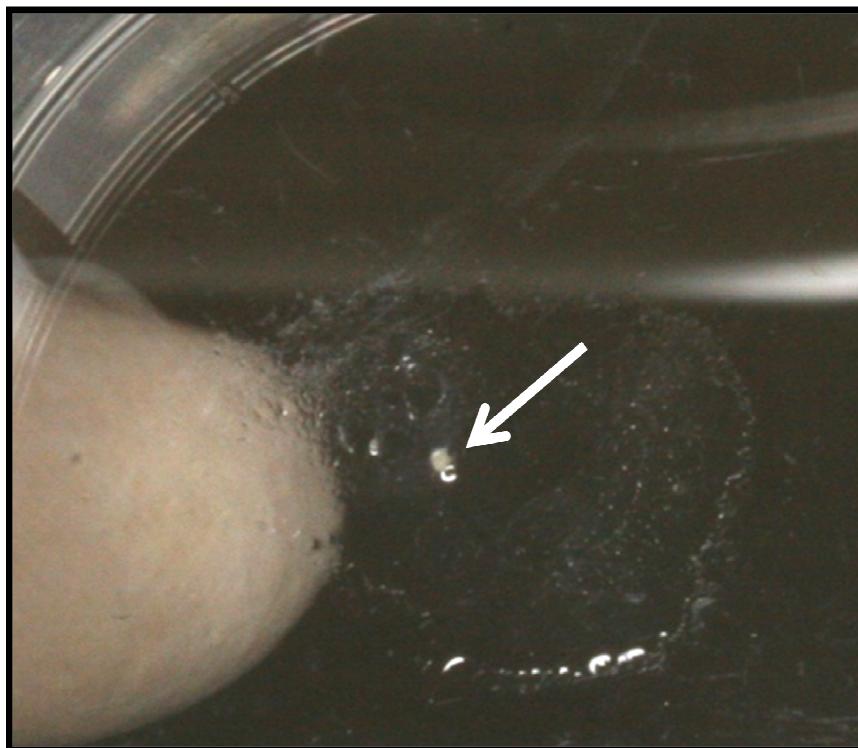


Figura 31. La flecha blanca señala el cultivo de diferenciación condrocítica en placa. Se ha aspirado el medio de cultivo

7.2.3. Comprobación de la diferenciación.

La comprobación de la diferenciación condrogénica se basa en la demostración de la secreción por parte de las células de mucopolisacáridos ácidos también llamados glucosaminoglucanos, que son aquellos mucopolisacáridos que en la posición 1, 2 glicol poseen grupos ácidos sulfato (condroitin sulfato) o carboxilo, en lugar de grupos alcohólicos.

Los glucosaminoglucanos sulfatados (condroitin sulfato) se unen a proteínas formando los proteoglicanos que son componentes fundamentales del tejido cartilaginoso.

Para colorearlos se utiliza la prueba citoquímica de tinción con azul alcián. La selectividad de la tinción con azul alcián es dependiente del pH, si se emplea en condiciones de pH entre 2,4 - 2,6, se colorean todos los mucopolisacáridos ácidos sulfatados, si se disminuye el pH hasta 0,5 solo se teñirán los mucopolisacáridos ácidos fuertemente sulfatados. Para nuestro procedimiento se utilizará la tinción a pH 2,5, la cual tiene un mayor espectro de tinción.

Preparación de la solución de tinción.

Para preparar 100ml de la solución de azul alcián a pH 2,5 se disolverá 1gr de polvo de azul alcián en 100ml de ácido acético al 3%, se mezcla bien y después se filtra con una malla millipore. La solución así preparada es estable durante dos semanas.

Método.

Se aspira el medio de diferenciación y se lava 3 veces con PBS.

Se fija con formaldehido al 10% neutralizado y estabilizado con metanol durante 20' a temperatura ambiente, transcurridos estos se realiza el.

Lavado con PBS y aspirado

Se cubre la preparación con la solución de azul alcián durante 30', transcurridos estos se aspira el tinte y.

Se lava con agua y se procede a la observación.

Los proteoglicanos y mucopolisacáridos ácidos azufrados se verán coloreados en azul claro.

Nos centraremos en las células cercanas a la bola, pues esta al ser gruesa no permite el paso de la luz para la observación microscópica y por lo tanto no aparece coloración, buscaremos también el que las células estén en varias capas, de este modo entre ellas hay depósito de la matriz extracelular en un grosor que permite el paso de la luz y por tanto la visualización de la tinción.

7.3. Diferenciación adipogénica.

Material.

- Placas de cultivo de 12 pocillos.
- Cubreobjetos de 12 mm de diámetro.
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml.
- Pipetas serológicas y puntas.
- Medio de cultivo α-MEM con 10% de SBF, penicilina/estreptomicina y glutamina.
- Suplemento adipogénico stemXVivo 100X. (R&D Systems, Inc.).

Preparación del medio basal de cultivo.

Para elaborar 101 ml, en dos tubos falcon de 50 ml, se mezclarán los siguientes ingredientes: α-MEM, 90 ml

SBF, 10 ml

Solución Penicilina-Estreptomicina-Glutamina 100X, 1 ml.

Se conservara refrigerado a 4°C.

Preparación del medio de diferenciación.

Se toma una ampolla, 0,5 ml, de solución de suplemento adipogénico 100X que contiene hidrocortisona, isobutilmetilxantina e indometacina, suficiente para suplementar 50ml de medio. Si se ha formado un precipitado en la ampolla de suplemento se deberá atemperar esta en el baño de agua a 37°C durante 5', se deberá de agitar enérgicamente hasta la disolución del precipitado.

Se añadirá 1μl de suplemento diferenciador por cada 1ml de medio basal α-MEM que se vaya a preparar. Se recomienda preparar medio de diferenciación para 1 ó 2 cambios de medio, volviendo a prepararlo fresco para los siguientes cambios.

Prepararemos 24 ml cada vez, en 2 tubos falcon de 15 ml, añadiendo 12 μl de suplemento adipogénico en cada tubo y mezclándolo suavemente. Una vez preparado se almacenará a 2°-4°C hasta su uso.

Método.

Se toman unas 750.000 células, por trypsinización de una placa de expansión de 100, y se resuspenden en 12ml de medio basal α-MEM.

En una placa de 12 pocillos se coloca 1 cubreobjetos estéril de 12 mm de diámetro en cada pocillo y se añade 1 ml de la suspensión celular en cada pocillo.

Se introduce la placa en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante toda la noche.

Al día siguiente, con las células en confluencia, se aspirará todo el medio y se añadirá 1 ml del medio de diferenciación en 8 pocillos, dejando 3, con el medio basal, para control. En el caso de que las células no estuviesen en confluencia se irá

cambiando el medio basal cada 2 ó 3 días hasta alcanzar la confluencia y comenzar la diferenciación.

Cada 3 días se cambiará el medio cuidadosamente para no dañar las células. A partir del día 7-10 comienzan a aparecer vacuolas en el citoplasma que puede ser monitorizadas con microscopía de contraste de fases.

El proceso de diferenciación adipocítica se producirá entre 15-20 días, pudiendo entonces procederse a su comprobación.

7.3.1. Comprobación de la diferenciación.

La diferenciación adipogénica se comprueba por la demostración, mediante tinción citoquímica, de la presencia de vacuolas de lípidos en el citoplasma celular, para esto se utiliza el aceite rojo O, el cual pertenece a la familia de los lisocromos que son sustancias coloreadas capaces de disolverse en los lípidos y alcoholes de baja concentración y que no se unen a otras sustancias celulares. Su característica es el ser más solubles en los lípidos que en el solvente en el que se encuentran en el momento de aplicarlos, (alcohol isopropílico), produciéndose la transferencia del colorante por solubilidad diferencial.

El colorante se prepara haciendo una solución del 0,5% de aceite rojo en una mezcla 60:40 de alcohol isopropílico: agua destilada. Se pondrán 0,25 gr de aceite en 50 ml de la mezcla de alcohol y agua, tras hacer la mezcla es obligado el filtrarla.

Método.

Se aspira el medio de los pocillos que vamos a comprobar y se lavan con PBS.

Se sacan los cubres lavados, con cuidado de no romper las células y se fijan con formaldehído al 10% durante 15'a temperatura ambiente.

Se aspira la formalina y se lava tres veces con PBS.

Se añade la solución de aceite rojo O al 0,5%, cubriendo los cubres, y se deja actuar 30'a 37°C, (se mete en el incubador), pasados estos se aspira el aceite y.

Se lavan una vez los cubres con agua, una sola vez.

Inmediatamente se visualiza al microscopio.

7.4. Diferenciación neurogénica.

La diferenciación neurogénica se ha realizado con el AvanceSTEM Neural Differentiation Kit, (Hyclone, Thermo Scientific). El fabricante recomienda realizar el procedimiento utilizando previamente a la diferenciación el medio de expansión AvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Basal Medium. En este caso se ha omitido el uso de este medio de expansión, siendo sustituido por el que utilizamos habitualmente.

Material.

- Placas de cultivo de 24 pocillos.
- Cubreobjetos de 12 mm de diámetro.
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml.
- Pipetas serológicas y puntas.
- Medio de cultivo DMEM bajo en glucosa con 10% de SBF, penicilina/estreptomicina y glutamina.
- AvanceSTEM Neural Differentiation Kit. (Hyclone, Thermo Scientific)

Preparación del medio de diferenciación.

Se toman del Kit de diferenciación neural de Hyclon, que consta de 450ml de Basal Neural Differentiation Medium y 50 ml de AvanceSTEM Stem Cell Growth Supplement, una alícuota de 45 ml del medio de diferenciación neural y otra de 5 ml del suplemento de crecimiento y se mezclan en un falcon de 50.

El medio de diferenciación contiene para la inducción neurogénica ácido valproico, hidroxianisol butilado (BHA), cloruro potásico, forskolin, hidrocortisona e ITS, en proporción bajo secreto de patente del fabricante, y viene sin antibióticos-antifúngicos, si se desea es optativo el añadirlos, en nuestro caso no se añaden al medio. El medio una vez preparado es válido para 8 semanas, debiéndose conservar entre 2º-8ºC.

Método.

La diferenciación neurogénica se produce rápidamente, entre 1 y 5 días, pudiéndose mantener recambiando el medio diferenciador.

Se toman las células, por el proceso habitual de tripsinización, de una placa de expansión de 100, se resuspenden en 5 ml de DMEM bajo en glucosa con 10% SFB, P/S y Glutamina y se recuentan.

En una placa de 24 pocillos se coloca un cubreobjetos estéril de 12 mm diámetro en cada pocillo.

Se siembra cada pocillo a una densidad de 2500 células/cm², lo cual viene a ser un 30 % de confluencia.

Se añaden 500µl/pocillo de medio basal DMEM completo y se introducen en el incubador durante 24 horas, para que se adhieran las células y adquieran su morfología habitual en cultivo, pasadas estas.

Se aspira el medio basal DMEM completo y se lava con PBS dos veces.

Se añaden 0,5 ml/pocillo de medio diferenciador neurogenico en 18 pocillos, en los 6 restantes se añaden 0,5 ml/pocillo de DMEM completo, estos se usan de control.

A los 2 días se cambia el medio y se monitorea el cultivo con el microscopio de contraste de fases, ya se apreciarán cambios citomorfológicos.

Pasados 2 días ya se habrá producido la diferenciación, se cambia el medio y si se quiere mantener el cultivo se irá cambiando el medio diferenciador cada 2 días.

El estado del proceso de diferenciación neurogénica se puede monitorizar en función de cómo va cambiando la morfología de las células, (figura 32).

Las células al diferenciarse van condensando su citoplasma alrededor del núcleo, al mismo tiempo van emitiendo prolongaciones citoplasmáticas semejantes a dendritas y axones, estas tienden a establecer contactos entre ellas, llegando a formar verdadera una red.

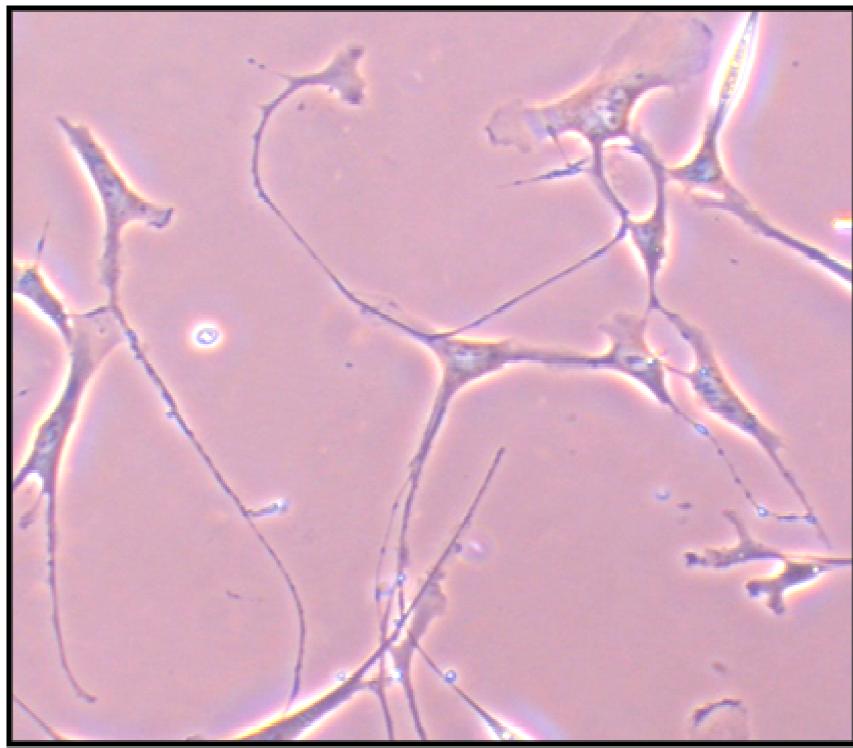


Figura 32. Cultivo de diferenciación neurogénica.

7.4.1. Comprobación de la diferenciación.

Para comprobar que se ha producido la diferenciación neurogénica se demostrará la producción por las células diferenciadas de ciertas proteínas características de las células nerviosas.

Se comprueba la presencia de nestina, perteneciente a la familia de proteínas de filamentos intermedios de tipo III y IV, involucrada en el crecimiento del axón, la cual se considera un marcador de neuronas primitivas. También hemos utilizado como marcador la tubulina β III neuronal la cual es constituyente de los microtúbulos que forman parte del citoesqueleto, también se considera marcador de neuronas. Otro marcador neuronal que hemos utilizado es la enolasa específica neuronal, (NSE), que se encuentra en las neuronas y en células neuroendocrinas, así como en algunos tumores.

Para caracterizar las células gliales hemos utilizado la proteína glifibrilar acídica, (GFAP), la cual es característica de los astrocitos y de las células ependimarias del SNC, formando parte de los filamentos del citoesqueleto, también se encuentra en las células de Schwann y no se encuentra en las neuronas ni en los oligodendrocitos.

Estas proteínas se han evidenciado mediante pruebas de inmunocitoquímica utilizando los siguientes:

Materiales.

- Metanol
- Tampón Citrato 10 mmol/L a pH 6,0 (Dako, Denmark).
- PBS
- Agua destilada
- Antiperoxidasa (Dako).
- Tritón X100 (Sigma).
- Albúmina sérica bovina. BSA (Sigma).
- Ac TuJ1 - ratón antihumano. (Dako).
- Ac Nestina 10c₂ - ratón antihumano. (Dako).
- Ac GFAP- conejo antihumano. (Dako).
- Ac NSE – ratón antihumano. (Dako).
- Ac Alexas 488 goat antiratón. (Invitrogen).
- Ac Alexas 488 goat anticoncejo. (Invitrogen).
- DRAQ5, para visualizar los núcleos celulares
- Pipetas serológicas y puntas

Método.

Se toma la placa de 24 pocillos con sus 24 cubres y se emplean todas las células, tanto las diferenciadas como los controles no diferenciados. La inmunocitoquímica se puede realizar sacando los 24 cubres o mejor trabajando en los pocillos, primero:

Se aspira el medio de diferenciación y se lava con PBS 3 veces.

Se fijan las células con metanol frío durante 5' a -20°C.

Se aspira el metanol y se lava con PBS 3 veces, se aspira este y.

Se realiza el desenmascaramiento de los antígenos con citrato, (1 ml de citrato en 9 ml de H₂O destilada) durante 20'. Pasados estos.

Se lava con PBS 2 x 5'.

Se seca y se bloquea la peroxidasa endógena con antiperoxidasa durante 20'.

Se aspira el bloqueante de la peroxidasa y se lava con H₂O destilada primero y luego con PBS 2 veces x 5'.

Se realizan 2 lavados de 15' cada uno con tampón permeabilizante bloqueante de anticuerpos inespecíficos, el cual se compone de PBS+Tritón X100+ BSA (Albumina sérica bovina).

Se añade el anticuerpo primario correspondiente y se deja incubar, a T° ambiente, hasta el día siguiente, máximo 24 h.

Se lava 3 veces, 5', con PBS y.

Se añade el anticuerpo secundario específico, incubándolo 90' a Tº ambiente y en oscuridad, pasados estos.

Se realizan 3 lavados de 5' cada uno con PBS, se aspira y se procede a.

La tinción de los núcleos con DRAQ5.

La observación se realiza con microscopio de fluorescencia, viéndose los casos positivos de color verde fluorescente mientras que en los controles no se aprecia fluorescencia.

8. LAS MATRICES TRIDIMENSIONALES.

Las distintas matrices para ingeniería de tejidos se encargan de proporcionar soporte para el mantenimiento y la proliferación celulares, así mismo deben de aportar señales para que las células conserven su expresión génica o la dirijan hacia un determinado linaje. También deben de reproducir la morfología estructural del tejido a reparar.

Con base en la secuencia de fenómenos que se producen en el proceso de reparación de las lesiones óseas, consideramos que puede ser adecuado el empleo de la fibrina autóloga como matriz tridimensional en ingeniería de tejido óseo, (ITO).

8.1 Matriz de fibrina autóloga.

La fibrina es una globulina insoluble, filamentosa, elástica, de color blanco que se forma a partir de una proteína plasmática soluble, el fibrinógeno, el cual por la acción de la trombina forma unos monómeros que rápidamente se convierten en polímeros solubles, fibrina S, y en unos pocos segundos se convierten en insolubles, fibrina I.

Estos polímeros forman una red tridimensional con unos nudos de unión constituidos por agregados de plaquetas, (figura 33), los cuales por la acción de la trombostenina contenida en las plaquetas provocan la retracción del coágulo.

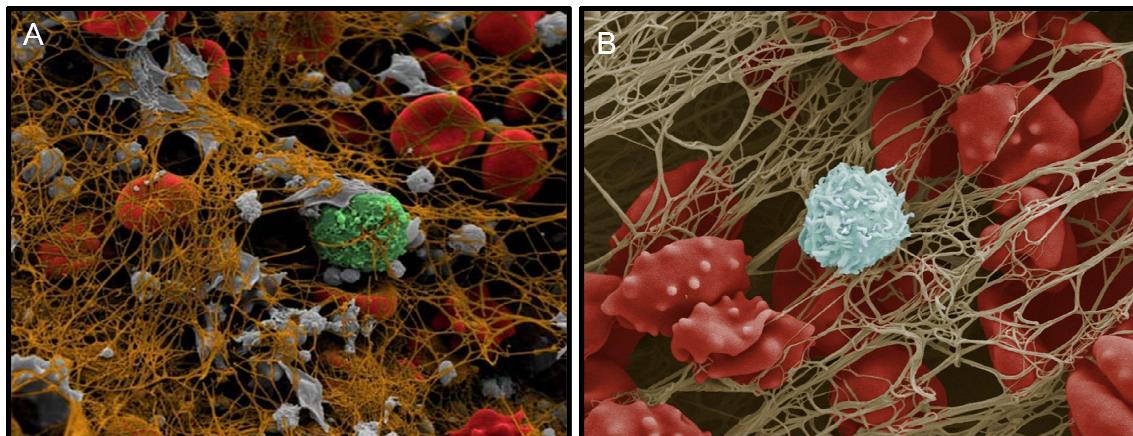


Figura 33. Imágenes SEM cedidas por la Escuela de Medicina de la Universidad de Pensilvania. A) La estructura tridimensional de la red de fibrina en color marrón, los hematíes atrapados en la red se ven en rojo, en el centro, en verde, se puede ver un leucocito y en gris las plaquetas agregadas. B) A mayor aumento la estructura tridimensional de la fibrina y las plaquetas en color rojo, se aprecia el comienzo de su activación por la emisión de pseudópodos que rompen el glicocalix, en el centro en azul se ve un leucocito.

Obtención de la fibrina.

La fibrina autóloga se obtiene a partir del plasma sanguíneo del modelo animal de experimentación, en este plasma se encuentran el fibrinógeno y todos los factores de la coagulación.

Material.

- Tubos vacutainer con citrato sódico para extracción sanguínea. (Becton Dickinson)
- Agujas de extracción con aletas 21G. (Terumo Europe N.V)

- Centrifugadora (Eppendorf 5810R)
- Solución de cloruro cálcico.
- Pipetas y puntas serológicas.

Método.

Paso 1: Obtener sangre del animal de experimentación. Se realiza la extracción de la sangre en una vía suficientemente grande, se recomienda puncionar en las patas posteriores, en concreto en la vena safena externa. Es preferible depilar la pata para acceder mejor a la vía. La obtención de sangre de conejo presenta el problema de la obstrucción de la aguja de punción debido a la rápida coagulación de la sangre, se soluciona llevando las agujas llenas de solución de citrato sódico al 3,8 %.

Así previa depilación y desinfección de la pata del animal se coloca un compresor elástico para ingurgitar la vena y se inmoviliza al animal.

Se punciona con la aguja totalmente rellena de solución de citrato sódico, en cuanto vemos que entra sangre.

Se pincha en el vacutainer comprobando que entra la sangre en el tubo. Cuando ya no entra sangre se retira la aguja y se agita el tubo para que se mezcle bien la sangre con el citrato sódico, así se evitara que comience el proceso de coagulación.

Paso 2: Obtención de plasma sanguíneo. Por centrifugado de la sangre a 300 G x 5', se repite el centrifugado 3 veces. Tras el centrifugado se ven 3 fracciones en el tubo, una roja en el fondo del tubo que corresponde a los hematíes, otra blanca muy fina justo encima de la roja y que corresponde a la serie blanca, y una tercera, encima de la blanca que corresponde al plasma y las plaquetas.

Se aspirará el plasma y las plaquetas con cuidado de no aspirar la serie roja.

El plasma sanguíneo obtenido contiene el fibrinógeno y los factores de la coagulación que lo transformaran en fibrina insoluble, la reacción no se produce debido al secuestro del Ca^{++} que produce el citrato.

Para obtener la fibrina se aportará el calcio que falta. Una vez obtenido el plasma rico en plaquetas este se puede activar inmediatamente o si se prefiere se puede conservar largo tiempo en refrigeración entre 2°C - 4°C. Se tendrá presente que en el plasma conservado las plaquetas se habrán lisado.

Formación de la matriz de fibrina y siembra celular.

Al ser el plasma un líquido adoptará la forma del recipiente que lo contiene, este hecho puede ser de utilidad a la hora de conformar la forma de la matriz, bastará con construir un recipiente con la forma del constructo que deseamos formar.

Para el cultivo y expansión celular se deposita 1ml de plasma en una placa de cultivo de 60 y se añaden 2 ml de solución de cloruro cálcico, si no se cubre toda la superficie de la placa con la mezcla se puede añadir un poco de PBS, seguidamente se introduce la placa en el incubador a 37°C, en 3 minutos tendremos toda la superficie de la placa cubierta de fibrina.

Si observamos al microscopio la matriz de fibrina se verá como una estructura granulosa, (figura 34).

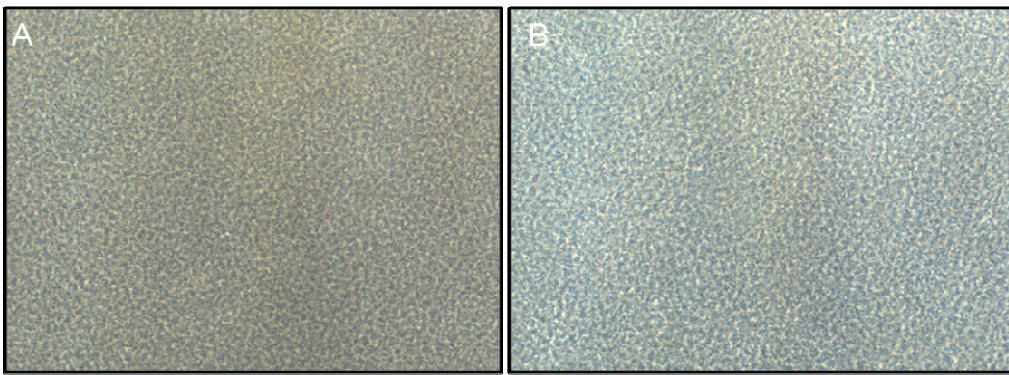


Figura 34. A) Matriz de fibrina conformada en un pocillo de una placa de 12 pocillos. B) La matriz en una placa de 35 mm. En ambas se ve el típico aspecto granuloso

Las células se pueden incorporar a la matriz por dos procedimientos, (figura 35):

- 1.- Siembra sobre la matriz ya constituida. Una vez formada la matriz se siembran las células del mismo modo que cuando se hace sobre una placa de cultivo. Las células se depositan sobre la matriz.
- 2.- Se resuspenden las células en el plasma y seguidamente se activa con el cloruro cálcico, al coagular las células quedan englobadas en la matriz.

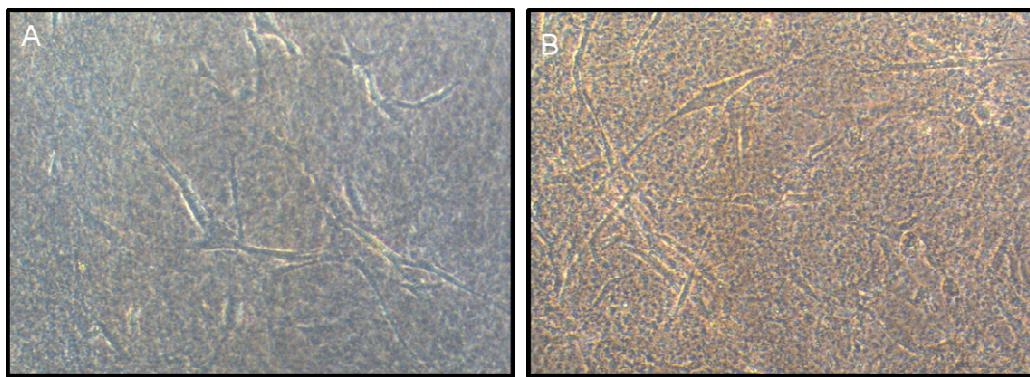


Figura 35. A) Las células sembradas sobre la matriz. B) Las células sembradas al tiempo que se coagula la matriz. Se aprecia que la distribución celular es similar en ambos procedimientos.

Objetivación del cultivo.

Visión microscópica directa.

La monitorización del cultivo en la matriz se realizará por visión microscópica directa con el microscopio de contraste de fases, la visualización cuando hay poca densidad celular puede ser difícil por la confusión a la que induce el entramado de la fibrina.

Tinciones.

Para la objetivación de las células en la matriz se realizan 2 tipos de tinciones que no colorean la fibrina.

Azul de metileno

El azul de metileno es un colorante catiónico que tiñe de azul las estructuras celulares cargadas negativamente, basófilas, como los ácidos nucleicos. El procedimiento de tinción consiste en:

- ✓ Aspirar el medio de cultivo y lavar con PBS 3 veces.
- ✓ Se fija con formaldehído al 10% durante 20'.
- ✓ Se aspira el fijador y se lava 3 veces con PBS.
- ✓ Se añade la solución de azul de metileno y se la deja 15' a Tº ambiente.
- ✓ Se aspira el colorante y se lava con agua corriente.

Una vez realizada la tinción se puede proceder a la observación de forma inmediata o diferida, se verán las células en tono azul sobre fondo blanco.

Faloidina.

La faloidina se utiliza conjugada con un fluorocromo, el alexas fluor 488, y tiñe los microfilamentos de actina del citoesqueleto celular, debido a su alta selectividad por la actina. El procedimiento para la tinción es similar el que se ha citado anteriormente para la inmunocitoquímica. .

La observación se realiza mediante un microscopio confocal, este permite la toma de múltiples imágenes que luego se pueden montar secuenciadas dando la impresión de una imagen tridimensional.

8.2. Matriz de hidroxiapatita.

La hidroxiapatita o hidroxiapatito, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es un mineral compuesto por fosfato cálcico cristalizado, es el componente inorgánico mayoritario de los huesos y supone el 99% del calcio total corporal y el 80% del fósforo total corporal. El 65% del peso óseo corresponde al hidroxiapatito.

Es un material ampliamente usado en clínica para la regeneración ósea por su elevada biocompatibilidad y su similitud con la estructura ósea.

Se puede obtener de origen natural, bien a partir de hueso, generalmente bovino, equino o porcino, tratado con procedimientos químicos y térmicos, o bien a partir del coral *Porites porites* por transformación hidrotermal del carbonato cálcico que forma su exoesqueleto. También se puede obtener de forma sintética. (Figura 36).

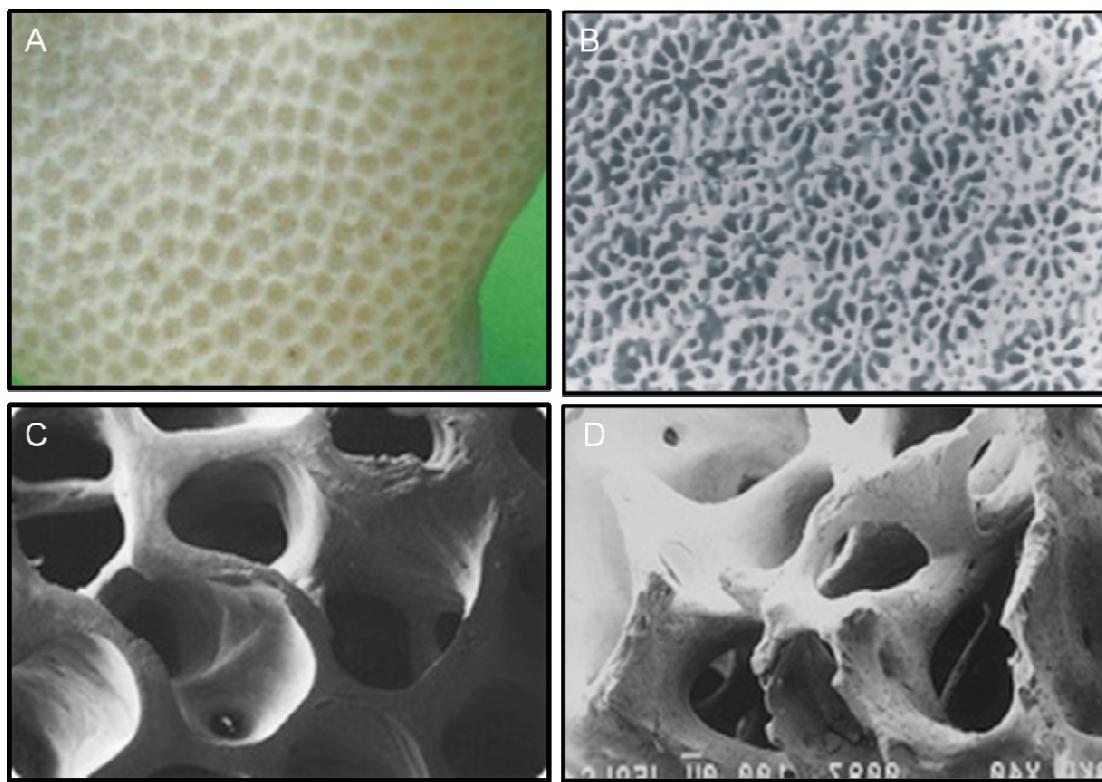


Figura 36. A) Coral *Porites porites*. B) Hidroxiapatita coralina obtenida tras la eliminación de la materia orgánica y el proceso de intercambio hidrotérmico en solución de fosfatos. C) Hidroxiapatita de origen bovino, su aspecto es muy parecido a la imagen d. D) Hueso humano.

Para la presente investigación se elige la hidroxiapatita obtenida a partir de hueso bovino sometido a tratamiento térmico de alta temperatura, durante 15 horas, seguido de tratamiento químico alcalino y esterilizado con rayos gamma, su nombre comercial es Bio-Oss[®], (Geistlich Biomaterials).

Se trata de un biomaterial ampliamente testado para la regeneración ósea en clínica humana que posee capacidad osteoconductora (Pjetursson y cols., 2008). Se presenta en forma de bloques y de granulado, (figura 37). Para la investigación se ha utilizado en forma de granulado de entre 1 y 2 mm, debido a la imposibilidad de cortar los bloques en fragmentos lo suficientemente finos para poder visualizar las células

sembradas en su interior. Para poder mantener compactos los gránulos de Bio-Oss se han incluido en la matriz de fibrina anteriormente descrita.

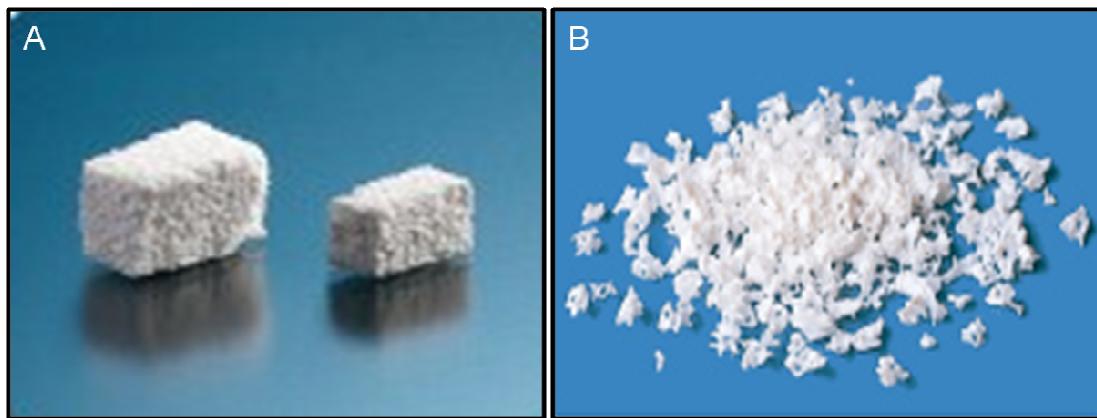


Figura 37. A) Dos bloques de Bio-Oss, su inconveniente es su mala manipulación. B) El mismo biomaterial en forma de gránulos, estos conservan la microestructura del hueso siendo más manejables.

Formación de la matriz de hidroxiapatita y siembra celular.

El procedimiento y los materiales a utilizar son los mismos que para la formación de una matriz de fibrina, con la única diferencia de que, antes de añadir el cloruro cálcico para la coagulación del plasma, se añadirá el granulado de hidroxiapatita, dejando que se emape del plasma, seguidamente se añade el cloruro cálcico y se mete en el incubador a 37°C. Al añadir la hidroxiapatita la coagulación del plasma se produce un poco más rápida.

Una vez obtenida la matriz, (figura 38), se siembran sobre ella las células por el procedimiento habitual, bien dejando que penetren en la matriz o bien se siembran y después se coagula el plasma, formándose la matriz con las células ya incorporadas.

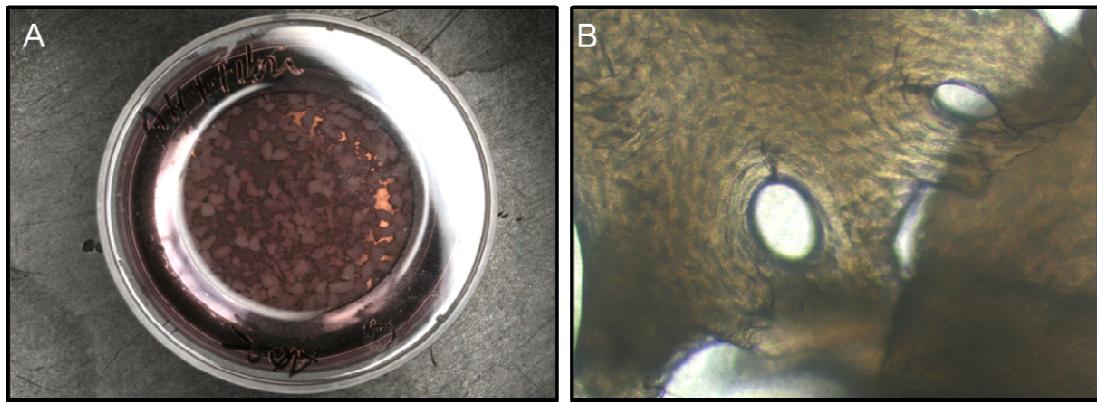


Figura 38. Matriz de hidroxiapatita con fibrina. A) A simple vista, el color rojizo se debe al medio de cultivo. B) Se aprecian los poros y como los gránulos se superponen suspendidos en la fibrina, el aspecto de la matriz recuerda al del hueso.

Objetivación del cultivo en la matriz.

La monitorización del cultivo se realizará cada dos o tres días.

Al principio puede ser un poco complicado el localizar las células, después, cuando la densidad celular aumenta, nos interesará objetivar la relación de las células con las partículas de hidroxiapatita. Esto lo realizaremos por medio de visión microscópica directa con el microscopio de contraste de fases.

Se comprobará mediante la técnica de fluorescencia con faloidina con fluorocromo y visionado en microscopio confocal. Las imágenes del microscopio confocal se procesarán y montarán con ayuda informática para poder visualizar en una misma imagen las células y la hidroxiapatita. (Figura 39).

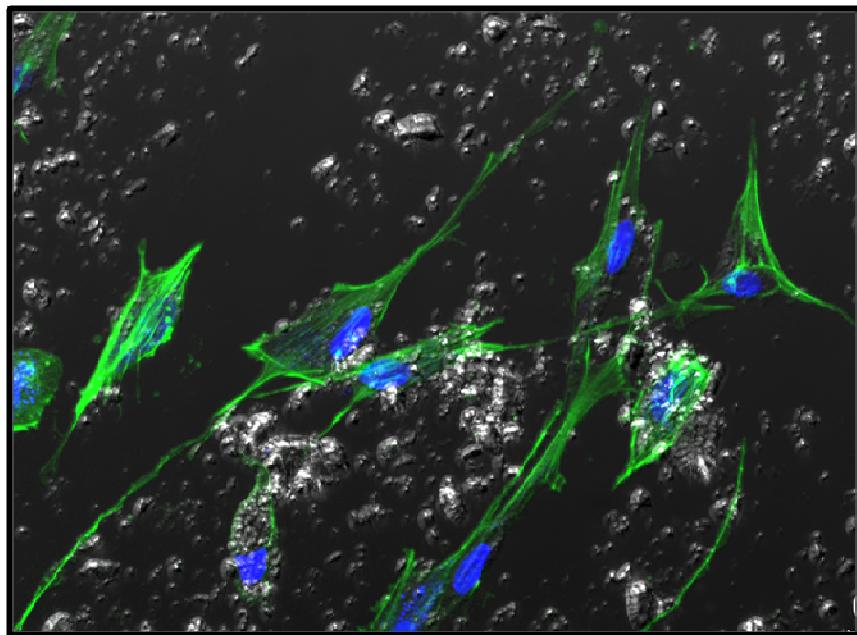


Figura 39. Microscopía confocal, el relieve de la hidroxiapatita, (HA), se ve en blanco. Los filopodios contactan con la HA de la matriz.

Tras la realización de los estudios “*in vitro*” y como aplicación de ellos se procede a la fase de experimentación “*in vivo*”.

9. MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

Como modelo animal de experimentación se utiliza el conejo albino New Zealand, *Oryctolagus cuniculus*, (figura 40). En este modelo de estudio se produjeron cuatro lesiones óseas femorales, dos en cada fémur, en 7 animales.

Estas se trataron mediante el relleno de la lesión con:

- 1) ADSC_s indiferenciadas incluidas en una matriz de hidroxiapatita con fibrina autóloga.

- 2) ADSC_s diferenciadas hacia linaje osteogénico incluidas en una matriz de hidroxiapatita con fibrina autóloga.
- 3) Hueso autólogo triturado.
- 4) sin tratamiento, confiando la curación al relleno por el coágulo sanguíneo.

Se realizaron controles radiológicos inmediatamente tras la cirugía y a los 30 días postcirugía, momento este en el que fueron sacrificados y se sometieron a estudio histomorfológico las muestras obtenidas de las zonas de lesión.



Figura 40. *Oryctolagus cuniculus*, conejo albino de Nueva Zelanda utilizado como modelo de experimentación animal.

9.1. Implantes biológicos.

El material biológico de implantación se prepara por dos procedimientos diferentes. En uno de ellos las células se incorporan a la matriz inmediatamente antes del procedimiento quirúrgico, mientras que en el otro las células proliferan y se diferencian en la matriz que posteriormente se implantará.

En ambos procedimientos se emplea el mismo material, con la salvedad de que en el caso de la proliferación y diferenciación dentro de la matriz los medios de cultivos están suplementados con SBF, P/S, Glutamina y suplemento diferenciador osteogénico respectivamente mientras que en el caso de sembrarlas inmediatamente antes de la implantación se emplea medio de cultivo sin ningún tipo de suplemento.

Material.

- Placa de cultivo de 24 pocillos.
- Plasma autólogo de conejo.
- Cloruro cálcico.
- Hidroxiapatita en gránulos, (Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials).
- Medio de cultivo DMEM bajo en glucosa completo.
- Medio de cultivo DMEM bajo en glucosa, sin ningún suplemento.
- Medio de diferenciación osteogénica.

Métodos.

Procedimiento 1: Consiste en preparar la matriz y después cultivar en ella las células durante unos días, para después implantar todo el constructo en la lesión ósea.

En dos pocillos de la placa de 12 pocillos se colocan 0'5 gr de Bio-Oss/pocillo.

Se añaden 0'5 ml/pocillo de plasma autólogo de conejo, se deja que el Bio-Oss se emape del plasma.

Se siembran 8×10^3 ADSC_s indiferenciadas/pocillo que se llevan resuspendidas en 100 μ l de DMEM completo.

Se añaden 0'5 ml de cloruro cálcico y se introduce en el incubador a 37°C durante 3' para que coagule, una vez ha coagulado, en un pocillo se ponen 2 ml de DMEM completo y en el otro se colocan 2 ml de medio diferenciador osteogénico. Se cambia el medio cada 2 ó 3 días. (Figura 41)

Procedimiento 2: Las células se expanden y se diferencian previamente en una placa de 12 pocillos, el día de la cirugía se prepara la matriz de fibrina e hidroxiapatita y se añaden las células a la vez.

En dos pocillos de la placa de 24 pocillos se colocan 0'5 gr de Bio-Oss/pocillo.

Se añaden 0'5 ml/pocillo de plasma autólogo de conejo, se deja que el Bio-Oss se emape del plasma.

Se siembran 30×10^3 ADSC_s indiferenciadas en uno de los pocillos que se llevan resuspendidas en 100 μ l de DMEM sin ningún tipo de suplemento. En el otro pocillo se siembran todas las células diferenciadas osteogénicas, no se recuentan pues muchas suele estar incluidas en la malla de matriz extracelular que forman al diferenciarse.

Se añaden 0'5 ml de cloruro cálcico y se introduce en el incubador a 37°C durante 3' para que coagule el plasma autólogo.

Una vez se ha formado la red de fibrina se añade 1ml de DMEM bajo en glucosa sin ningún tipo de suplemento y después se añaden 80 μ l de plasma autólogo.

Se mete en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ hasta el momento de la cirugía.

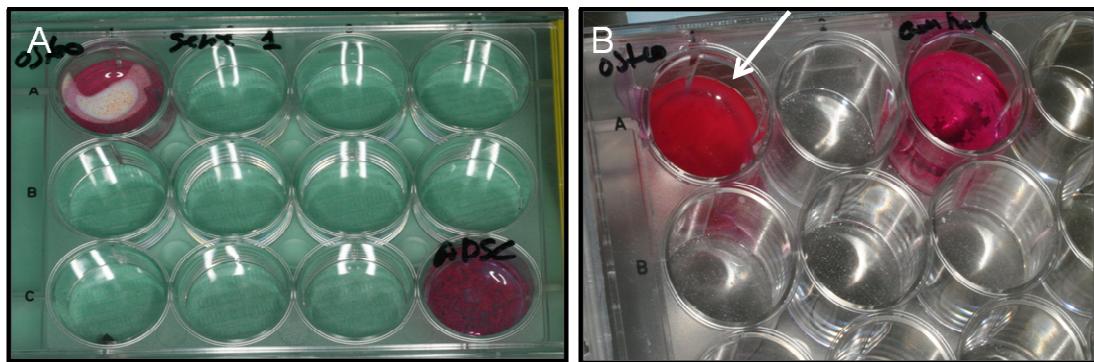


Figura 41. A) Constructo en el que las células se han expandido y diferenciado en su interior. B) La matriz se constituyó añadiendo las células previamente expandidas y diferenciadas, se aprecia como al haber quedado trazas de cloruro cálcico sin consumir al añadir medio de cultivo con suero autólogo el medio de cultivo se ha coagulado, flecha blanca.

9.2. Cirugía de implantación.

Previo a la cirugía se prepara el animal depilándole las dos patas traseras. Se procede a la anestesia general con isofluorano inhalado, (Isovet®. Braun vetcare S.A), se inyecta vía intramuscular 0,4 mg/kg de hidrocloruro de buprenorfina, (Buprex®. RB Pharmaceuticals Limited) y se pincelan ambas patas con solución antiséptica de povidona yodada, (Betadine®. Meda Farma SAU). Todo el procedimiento se realiza en ambiente estéril.

Una vez preparado el animal se comienza la intervención, se realiza una incisión en la cara externa de cada muslo, despegando los tejidos por planos hasta acceder a la metáfisis y a la epífisis femorales distales, una vez expuestas se desperiostizan y se producen dos lesiones circulares de 6 mm de diámetro mediante una trefina, (Ace Surgical) montada en una pieza de mano reductora 1:27, (W&H Wheledent Iberica), y bajo abundante irrigación con suero fisiológico estéril. (Figura 42).

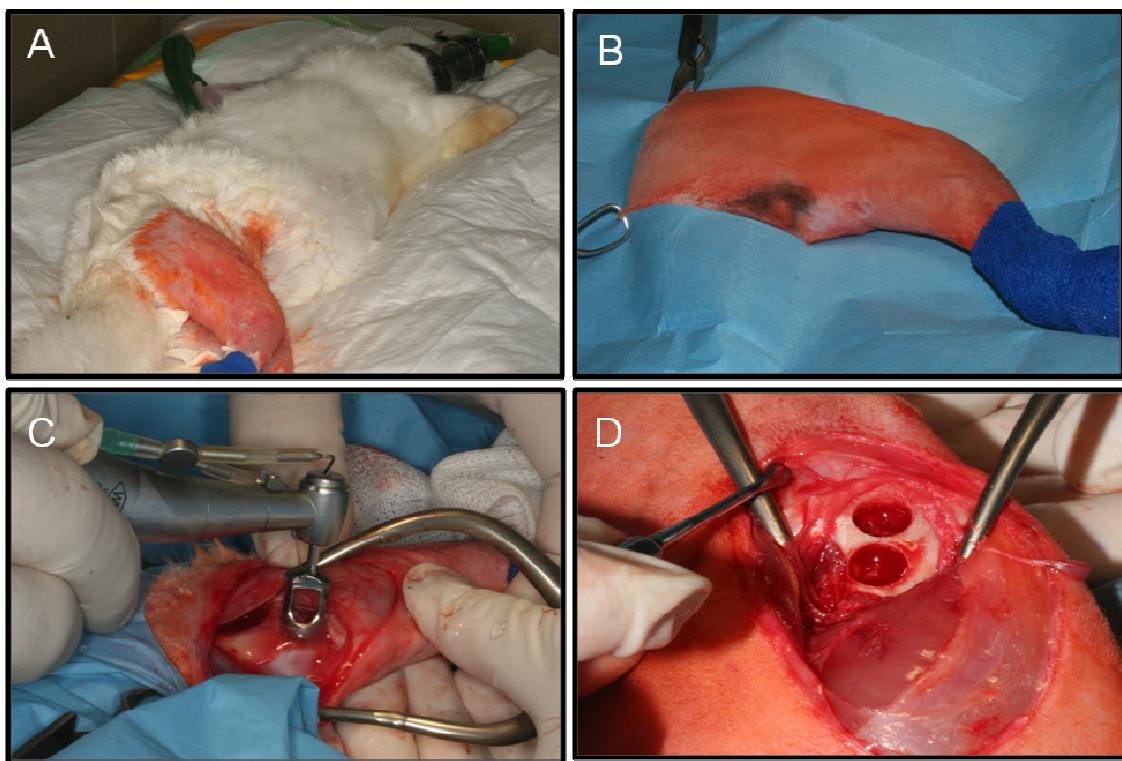


Figura 42. Proceso quirúrgico. A) Anestesia y desinfección del campo. B) Aislamiento del campo quirúrgico. C) Trefinado bajo irrigación del fémur del conejo. D) Las lesiones óseas producidas.

Los fragmentos óseos obtenidos con la trefina se guardan en una batea y se trituran con un molinillo de hueso, (Kholer. GmbH & Co. Kg).

Las lesiones producidas, en cada animal, se rellenan de forma aleatoria de la siguiente manera:

- 1) Una se rellena con un implante de ADSC_s indiferenciadas incluidas en la matriz de fibrina e hidroxiapatita.
- 2) Otra se rellena con un implante de ADSC_s diferenciadas en linaje osteogénico e incluidas en la matriz de fibrina + HA.
- 3) La tercera lesión se rellena con el hueso autólogo triturado.

4) La lesión restante se deja sin tratamiento, confiando en la regeneración a partir del relleno por el coágulo.

Una vez tratadas todas las zonas es de suma importancia el proceder a anotar en la historia clínica la posición y tipo de tratamiento de cada lesión.

Seguidamente se procede al cierre por planos mediante sutura con ácido poliglicólico de 4 ceros, (Vicryl, Ethicon). (Figura 43)

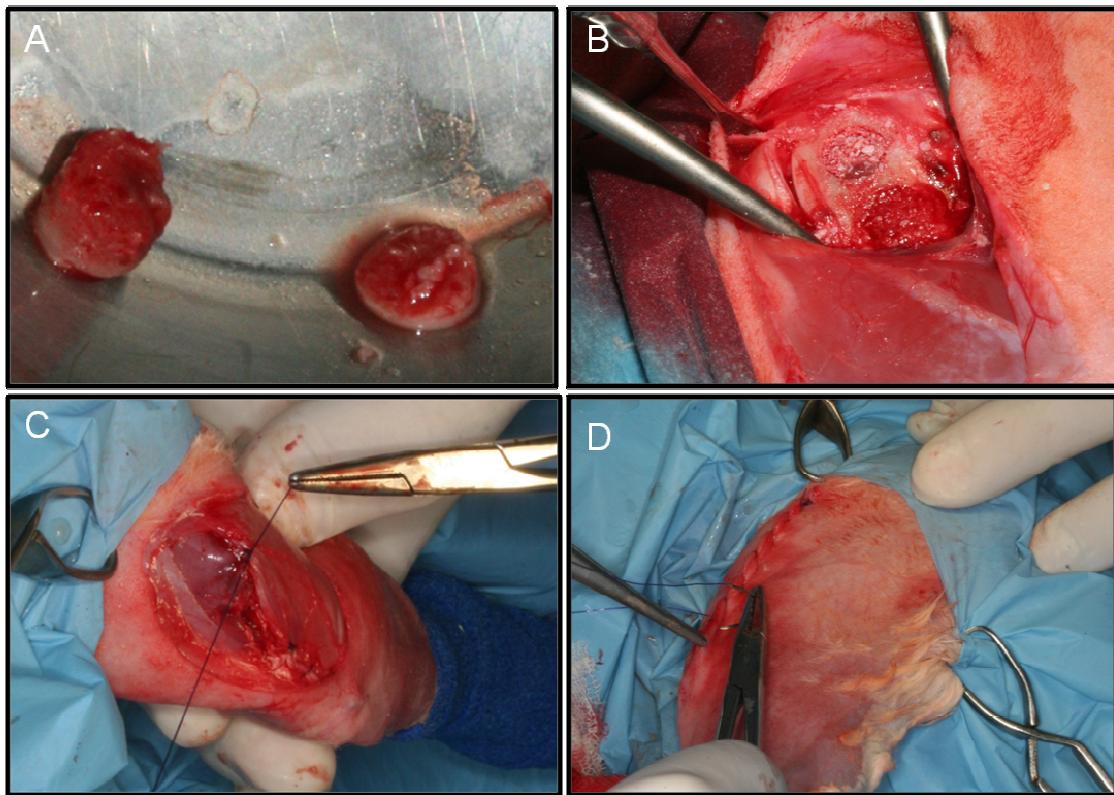


Figura 43. A) Los fragmentos óseos obtenidos con la trefina. B) lesión distal rellena con constructo con células indiferenciadas, flecha blanca, la lesión mesial se llenó con hueso autólogo triturado, flecha negra. C y D) Sutura por planos,

Tras la realización de la cirugía, en todos los casos, se ha procedido a comprobar la vitalidad de los implantes.

9.3. Comprobación de la vitalidad de los implantes.

Como los constructos son transportados desde el laboratorio donde se encuentra el incubador hasta el quirófano, y esto comporta el sacar las células de su ambiente de cultivo, es necesario comprobar que las células que se han implantado están vivas.

El procedimiento que se ha empleado consiste en conservar, tras la cirugía, un resto de la matriz que se ha implantado, se traslada de nuevo al laboratorio y ahí:

- ✓ Se coloca en una placa de cultivo de 35 mm.
- ✓ Se deshace todo lo posible frotando contra la placa. Los restos se dejan.
- ✓ Se añade medio de cultivo completo, DMEM bajo en glucosa, con 10% de SBF, con penicilina/estreptomicina y glutamina.
- ✓ Se introduce en el incubador y se monitoriza diariamente.

Los restos así manipulados se comportan como si fuesen un explante de tejido, al haberlo desechar si hay células vivas estas proliferarán y se adherirán al plástico de la placa.

9.4. Estudio radiológico.

Se estudia la evolución de las lesiones mediante seguimiento radiológico, se realiza una radiografía de cada fémur inmediatamente después de la cirugía y otra de control a los 30 días de la cirugía, comparándose las imágenes.

Para la realización de las radiografías, a los 30 días, se utiliza un aparato de radiología intraoral Kodak 2200 a 70 kV y 8 mA, (Kodak Dental Systems). El 1º día, en todos los casos, se realizó radiología en placa, ajustando el tiempo de exposición a cada caso. (Figura 44).

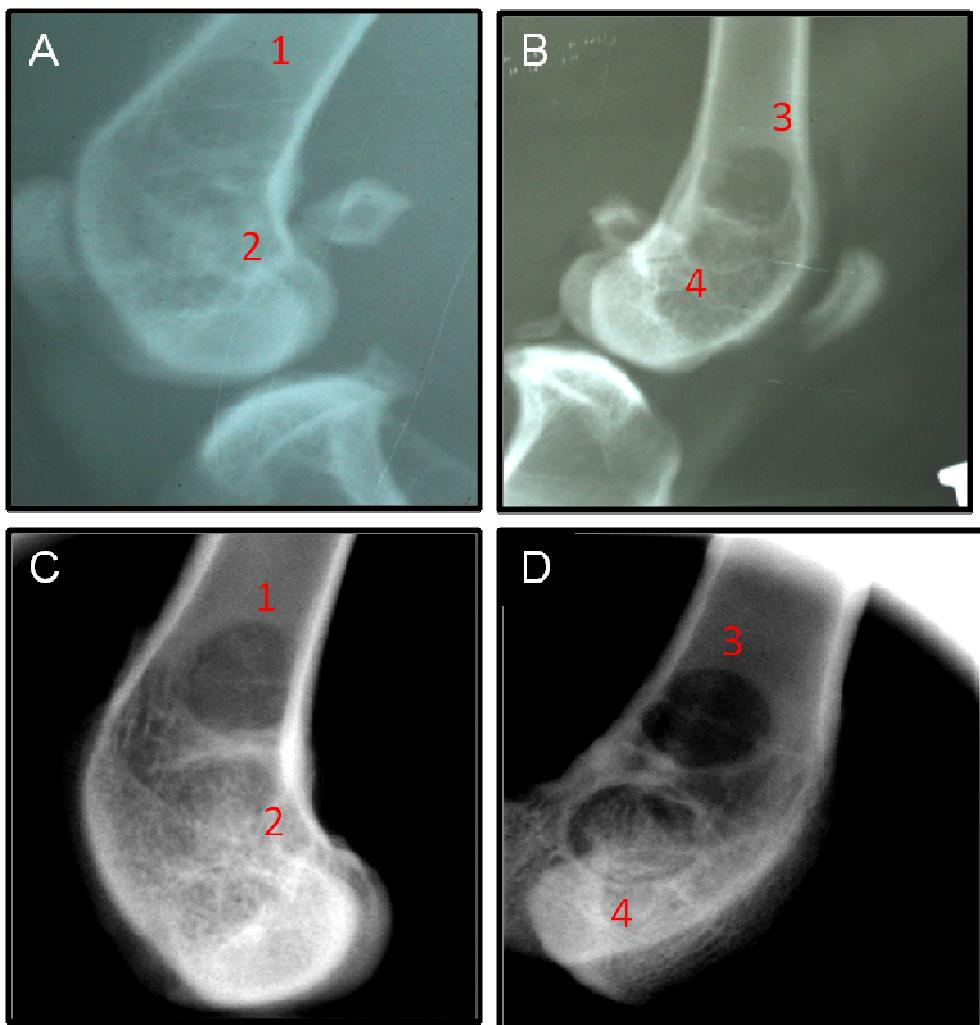


Figura 44. A) Rx del fémur derecho el día de la cirugía. B) Fémur izquierdo el día de la cirugía. C) Fémur derecho a los 30 días. D) Fémur izquierdo a los 30 días. En rojo 1. Relleno de hueso autólogo. 2. Relleno con implante diferenciado osteo. 3. Sin relleno. 4. Relleno con implante de células indiferenciadas.

9.5. Estudio histológico e histomorfométrico.

Para la realización del estudio histológico es necesario obtener previamente las muestras que se desean analizar, para esto en todos los casos se procedió al sacrificio del animal de experimentación, a los 30 días tras la intervención, mediante la inyección intramuscular de una sobredosis de sulfato de ketamina, (Imalgéne 500.

Merial S.A. Lyon) y de diacepan (Valium 10 solución inyectable. Roche Farma S.A. Madrid).

Tras la muerte de los animales se procede a la extracción de los fémures, eliminando las partes blandas, (Figura 45).



Figura 45. Fémur recién estirpado, se aprecia el lugar donde se provocaron las lesiones con la trefina.

En las piezas obtenidas se identifican visualmente las zonas donde se provocaron las lesiones.

Se procede a obtener un bloque óseo, conteniendo cada bloque una zona de lesión completa, mediante el corte con disco de diamante de 19 mm de diámetro, (NTI – Kahla GmbH. Germany), montado en una pieza de mano, (Kavo INTRACcompact 10 CHC. Kavo Dental Excellence. Biberach, Germany). (Figura 46).



Figura 46. Disco y pieza de mano con los que se obtienen los bloques de hueso que incluyen cada zona lesionada.

Cada bloque obtenido se introduce en un tubo falcon de 15 ml. con formaldehído al 10 %, correctamente etiquetado, se dejará la muestra en el tubo 24 horas como mínimo para que se fije completamente. Una vez fijada la muestra, esta se procesará hasta obtener los cortes histológicos.

Procesado de la muestra.

Material.

- Ácido Nítrico
- Agua destilada
- Etanol absoluto
- Xilol
- Parafina
- Micrótomo de rotación. (Micron HM 350 S. Thermo Scientific. Germany)
- Portaobjetos
- Cobreobjetos

Preparación de la soluciones.

Solución de Ácido Nítrico al 5 %. Se toman 5 ml de ácido nítrico y se diluyen en 95 ml agua destilada.

Soluciones de etanol al 50%, 70%, 80% y 95%. Se toman 50, 70, 80 y 95 ml de etanol absoluto y se mezclan con 50, 30, 20 y 5 ml, respectivamente, de agua destilada.

Procedimiento.

Decalcificación del hueso. Se introduce la muestra en solución de ácido nítrico al 5%, en una relación volumétrica de 1/20 como mínimo, a 25°C durante 24 horas.

Tras la decalcificación se aclara el ácido con en agua destilada.

Deshidratación de la muestra. Se elimina toda el agua de la muestra mediante su inmersión en soluciones de etanol de concentraciones crecientes, 50%, 70%, 80%, 95% y absoluto. La muestra se tendrá una hora en cada solución a fin de que la deshidratación se produzca de lentamente, evitando así que se deforme la muestra.

Aclaramiento o diafanización. Una vez deshidratada la muestra se procede a la sustitución del etanol mediante inmersión en una sustancia miscible tanto en el etanol como en la parafina, se emplea el xilol o xileno. Se mantendrá el baño una hora a T° ambiente.

Inclusión y formación de bloques en parafina. Se introduce la muestra en un vaso y se le añade la parafina fundida a 60°C, se coloca la muestra en la estufa a 60°C hasta un máximo de 6 horas, en dependencia del grosor de la muestra. Luego se coloca la muestra, orientándola, en un molde con parafina fundida y se deja solidificar a T° ambiente para formar el bloque.

Obtención de los cortes. Mediante un micrótomo de rotación, se obtienen cortes de entre 4 y 6 micrones, estos se dejan flotando en un baño termostatizado con agua tibia, los cortes se extienden con cuidado, para evitar que se formen arrugas y se recogen con un portaobjetos desengrasado cubierto por una capa de adhesivo de Mayer, se pueden “pescar” varios cortes en un mismo portaobjetos.

Tinción de los cortes. Previo a la tinción se deben de desparafinar los cortes mediante un baño en xilol a 58°C durante 15’. Después se rehidratan en solución alcohólica de concentración decreciente, comenzando por etanol absoluto seguido del de 95%, 80%, 70% y 50%, la muestra se bañara 30'' en cada uno, seguidamente se aclarara 30'' en agua destilada y se procede a la tinción con hematoxilina y eosina.

Una vez teñido el corte se deshidrata con alcoholes de gradación creciente, se aclara con xilol y se pega un cubreobjetos con una gota de adhesivo bálsamo de Canadá, el cual tiene un índice de refracción similar al del vidrio. Se deja secar unas horas y ya se puede proceder a la observación en el microscopio óptico.

Estudio histológico comparativo.

Se realiza mediante la observación de las características de cada muestra en el microscopio óptico.

Estudio histomorfométrico.

Se lleva a cabo mediante el conteo del número de células presentes en un área conocida, previamente escogida, de cada preparación y la comparación de los resultados obtenidos en todos los casos.

Material.

- ✓ Microscopio Nikon binocular YS 100. (Nikon Europe B V).
- ✓ Malla de titanio de 50 x30 x 0,1 mm. (Mozo-Grau, Valladolid). (Figura 47).

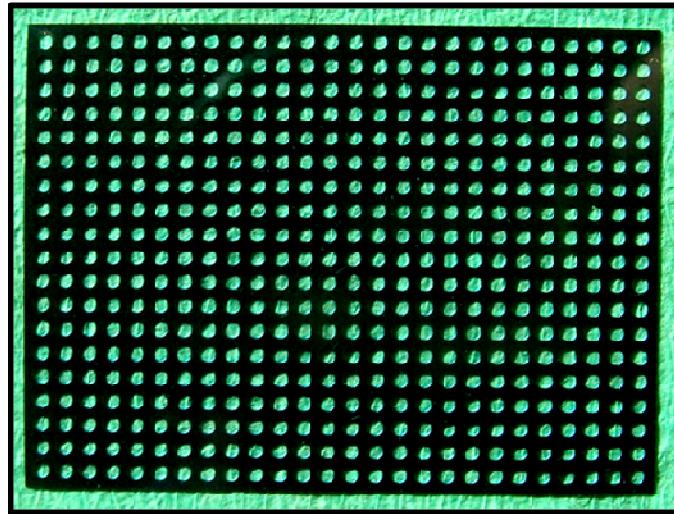


Figura 47. Malla de titanio, su grosor de una décima de mm permite tener enfocados los poros y la preparación histológica de debajo. El diámetro de cada poro es de 1 mm².

Método.

Se corta la malla de titanio, con poros de 1,57 mm² de superficie, hasta un tamaño de 30 x 20 x 0,5 mm para poder ajustarla a los portaobjetos.

Se visualiza la preparación histológica, a estudiar, a 100 aumentos y se selecciona la zona que se considera con mayor concentración celular.

Se marca esta zona, en el cubreobjetos, con un rotulador fino, se pone el microscopio a 40 aumentos y se coloca la malla sobre la preparación, centrando la zona marcada con un poro. Finalmente se fija la malla con cinta adhesiva. (Figura 48).

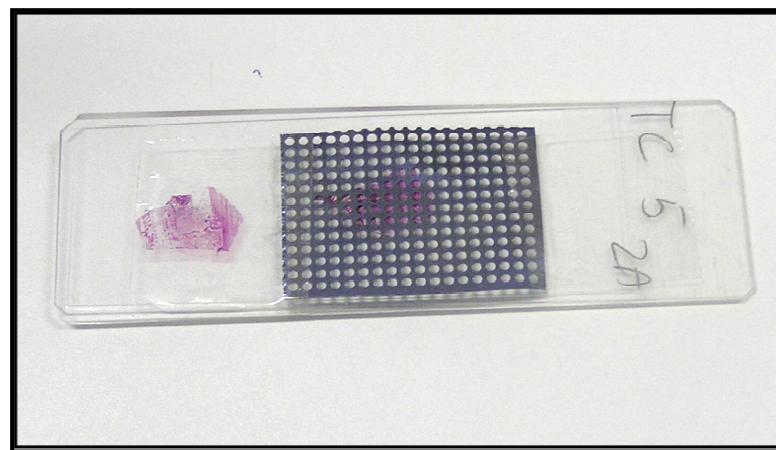


Figura 48. Portaobjetos preparado con la malla.

Se coloca el portaobjetos, con la malla posicionada y fijada, en el microscopio, se localiza la zona previamente seleccionada, a 40 aumentos, y se procede al.

Recuento celular en el poro seleccionado con 100 aumentos. Se anota la cifra obtenida. (Figura 49).

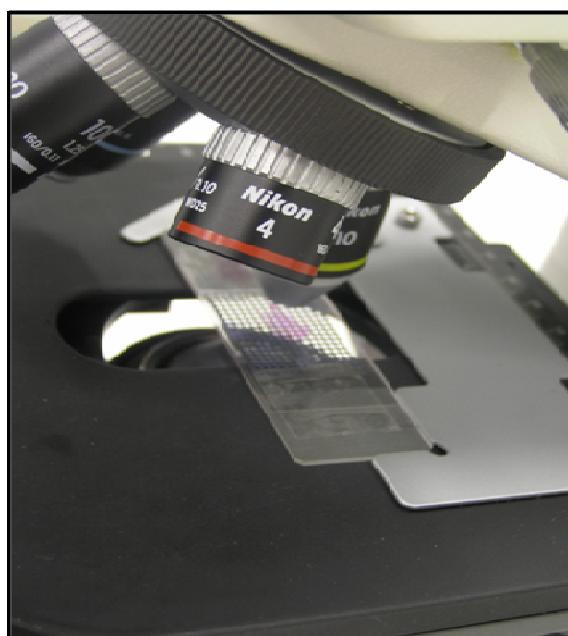


Figura 49. Preparación histológica colocada, en la platina del microscopio, para realizar el recuento celular en el área escogida. Este recuento se realiza a 100 aumentos.

Una vez se han obtenido los resultados del recuento de todas las preparaciones, estos, se agrupan en una única tabla por orden creciente de rangos, conservando su categoría.

En la tabla se han establecido 3 categorías:

- 1) Corresponde a las lesiones tratadas con hueso autólogo.
- 2) Corresponde al tratamiento con ADSC_s indiferenciadas y la matriz.
- 3) Corresponde a las lesiones tratadas mediante las ADSC_s diferenciadas osteogénicas con la matriz.

El grupo de las lesiones sin tratamiento, regeneración a expensas del coágulo sanguíneo, solamente se somete a estudio histológico comparativo.

Los resultados tabulados se someten a análisis estadístico mediante la prueba de Krustal-Walis para variables de tres categorías y si aparece diferencia significativa, en la cantidad de celularidad, entre los grupos se realizará la prueba de la U de Man-Whitney, comparando 2 a 2 los grupos, para averiguar a cual es debida la diferencia.

V.- RESULTADOS

1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Obtención del tejido adiposo y de la fracción vasculo-estromal de la grasa.

Para llevar a cabo la investigación se han realizado 9 lipectomías, 3 de grasa abdominal/perirrenal y 6 de grasa interescapular, en 7 especímenes. Se ha obtenido una cantidad de grasa con un rango entre 6 - 16 grs./lipectomía, (tabla 3), con un valor promedio de 11,66 grs.

ESPECIMEN	ZONA	PESO en grs.
1	Abdominal/perirrenal	16
1	Abdominal/perirrenal	7
2	Abdominal/perirrenal	13
3	Interescapular	12
4	Interescapular	13
5	Interescapular	14
5	Interescapular	6
6	Interescapular	14
7	Interescapular	10

Tabla 3. 1. Distribución por lipectomías del peso de tejido adiposo obtenido.

Tras la disgregación enzimática de la grasa se obtiene un rango de células de entre $25 - 45 \times 10^3$ células/ gr. de grasa, con un promedio de 38×10^3 células/gr.

Estas se siembran en una placa de 100 mm. de diámetro y van proliferando hasta confluir al cabo de un promedio de 10 días. En la figura 51 se ve el aspecto de las células a las 2 horas de obtenidas, se observa una baja densidad, a las 24 horas tienden a contactar a la par que proliferan, a la semana alcanzan un 70% de confluencia y en 10 días están al 100% de confluencia, momento en el cual se procede al repique de la placa y se obtiene la línea celular, fase 1, que se va seleccionando mediante su expansión y cultivo en el medio específico.

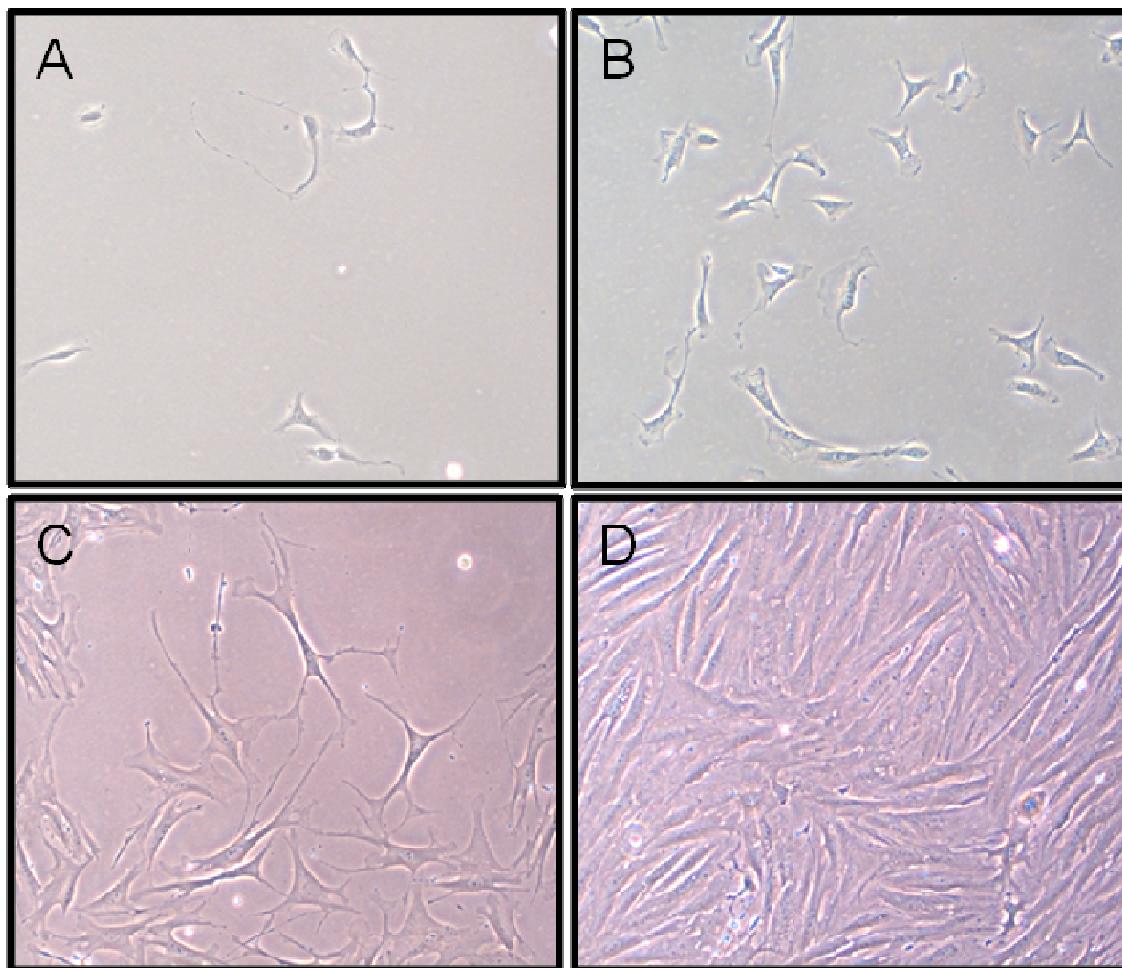


Figura 51. A) Células a las 2 horas de la siembra. B) A las 24 horas. C) a los 7 días. D) Cultivo primario a los 10 días.

En lo que respecta a la obtención de las ADSC_s mediante la técnica de explantes, la población celular se consigue más lentamente, estando el tiempo de consecución de la línea celular en dependencia del número, volumen y grado de disagregación mecánica de los explantes de tejido adiposo.

Al principio la proliferación es lenta. Esto es debido a que a las células les cuesta comenzar a migrar del explante y adherirse a la placa, tardando entre 2 y 3 días, una vez las células están adheridas, al sustrato de la placa de cultivo, comienzan a proliferar a la misma velocidad que las obtenidas por disagregación enzimática. (Figura 52).

Las células obtenidas por esta técnica son las mismas que las obtenidas por disagregación enzimática, y por lo tanto se comportan, en los sucesivos pasos, de la misma forma.

Hemos observado que a la vez que las células adheridas a la placa van proliferando continúan saliendo otras células de los explantes.

Esto nos posibilita el sembrar varias placas con los mismos explantes, simplemente cambiándolos de placa. Hay que tener la precaución de retirar los explantes cuando las células que proliferan en la placa han alcanzado un porcentaje de confluencia suficiente para que el cultivo sea viable.

El rendimiento promedio de los explantes ha sido de 10 días, tiempo suficiente para poder sembrar 3 placas de cultivo.

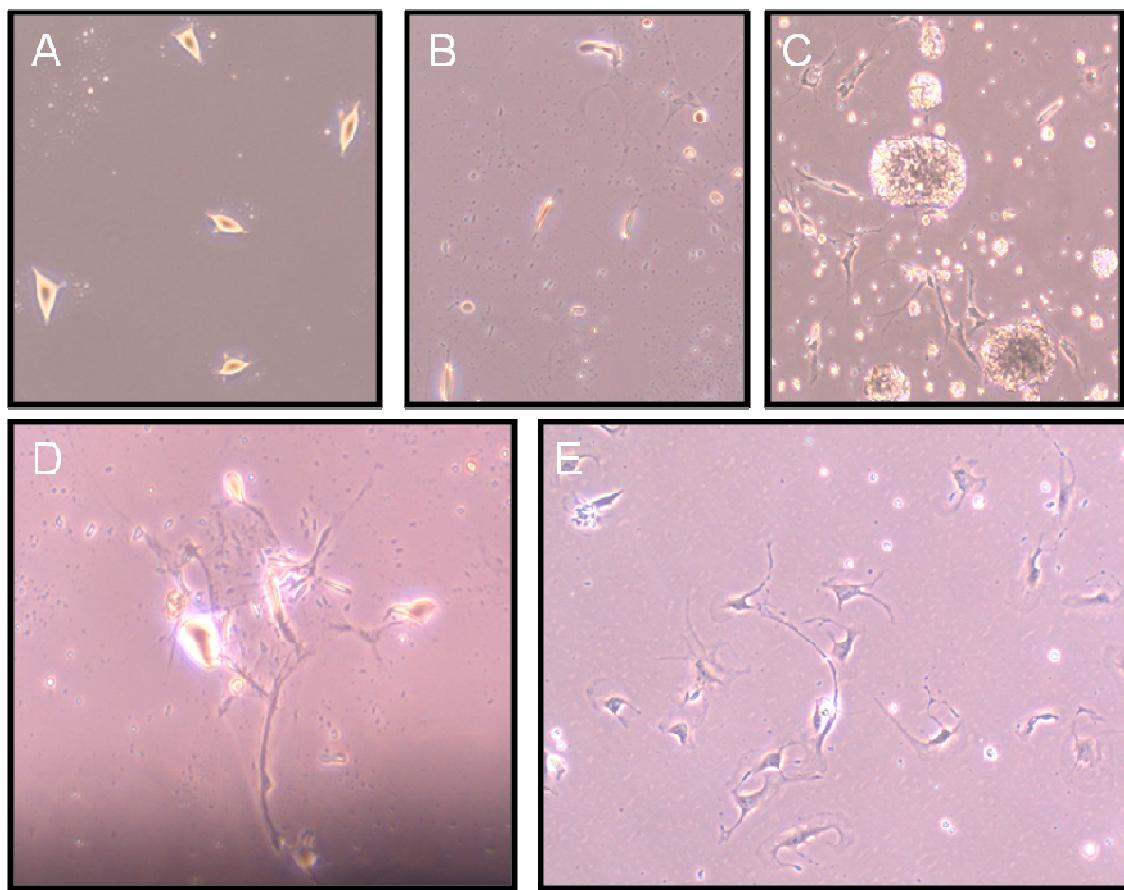


Figura 52. A) Cultivo a las 35 horas de la siembra de los explantes. B) A las 50 horas. C) A los 4 días de la siembra, se aprecian restos de tejido adiposo flotando y las células adheridas. D) Detalle de los contacto entre las células. E) Al 7 día el cultivo está consolidado, ya se pueden retirar los explantes.

2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

2.1. Proliferación celular del cultivo a diferentes pasos.

Se han tomado las células de la fracción vasculoestromal de dos especímenes, se han obtenido las líneas celulares correspondientes y se ha realizado el análisis de la proliferación celular en los pasos 1, 6 y 15, de las 2 líneas celulares. Los resultados de la proliferación de las células obtenidas de los 2 especímenes se han promediado y se ha confeccionado una tabla con los valores promedio calculados. (Tabla 4)

Pase1		Pase6		Pase15	
Día	Nº Células	Día.	Nº Células	Día.	Nº Células
0	30.000	0	30.000	0	30000
1	26.500	1	27.324	1	26200
2	30.950	2	30.650	2	30750
3	46.700	3	42.300	3	39200
4	73600	4	69.000	4	61100
5	105.300	5	109.600	5	96200
6	156.400	6	152.200	6	148800

Tabla 4. Tabulación de los promedios de los recuentos, día a día, de los cultivos celulares en los pases 1, 6 y 15, obtenidos de dos especímenes.

Se han confeccionado las gráficas con las curvas de crecimiento, tanto aritméticas como logarítmicas. (Figura 53).

En todos los casos se ha observado una fase de latencia, tras la siembra celular, de 1 día, en esta se apreció una ligera disminución, de alrededor de un 10%, en el nº de células con respecto al nº de células sembradas. Pasado este periodo de latencia las células han entrado en fase de crecimiento exponencial, siendo este más marcado en los 2 últimos días antes de alcanzar la confluencia. En el pase 1 el tiempo medio de duplicación de la población celular fue de 2,51 días, en el pase 6 de 2,56 y en el pase 15 de 2,59.

A una densidad de siembra de $3,12 \times 10^3$ cel./cm² se produjo, en todos los casos, la confluencia a los 7 días. No hemos encontrado relación entre la velocidad de crecimiento y la edad de las ADSCs, considerada en pases. En el pase 1 la fase de latencia fue un poco más amplia, un día, respecto al pase 15, pero después en la fase exponencial recuperan este ligero retraso.

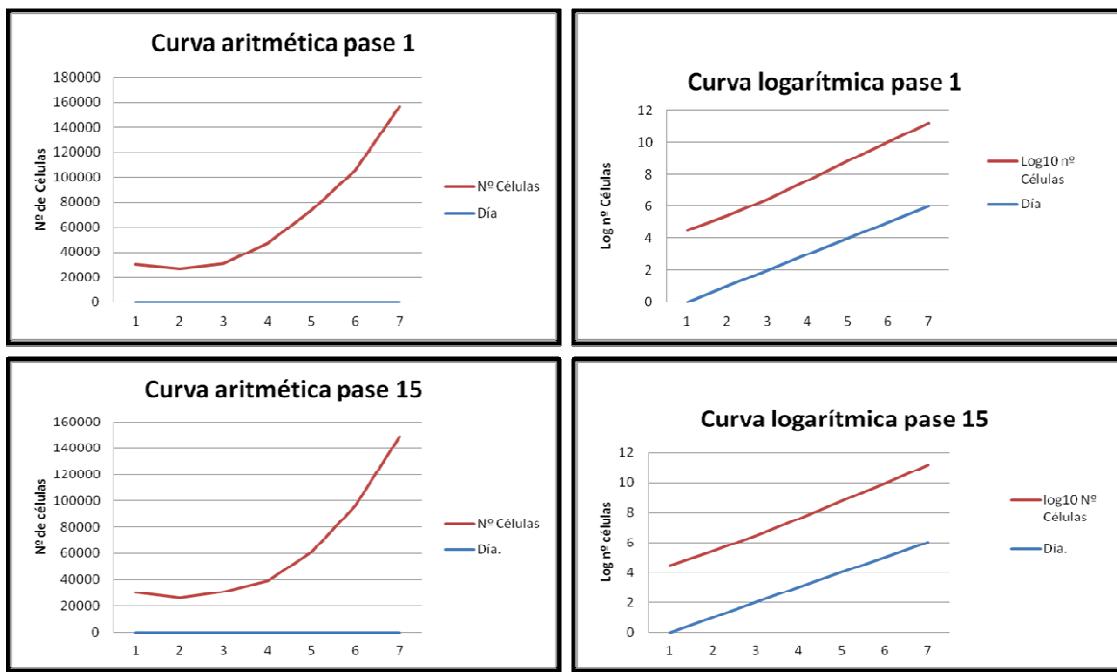


Figura 53. Representación del nº de células frente al tiempo mediante curvas de crecimiento, en el fase 1 y en el 15.

2.2. Proliferación celular del cultivo con diferentes concentraciones de SBF.

Se ha realizado el análisis de la velocidad de proliferación de una misma línea celular, en el fase 8, cultivada con 4 alícuotas de medio de cultivo con concentraciones diferentes de SBF:

- A) Una alícuota se suplemento con 1,25% de SBF.
- B) La segunda con 2,50%.
- C) La tercera con el 5%.
- D) La cuarta con la concentración habitual del 10%.

Las células cultivadas con medio con el 1,25% de SBF apenas proliferan siendo su proliferación dependiente de los cambios de medio y no llegando a duplicar la población celular, (Figura 54). Las células cultivadas con una concentración del 2,50% de SBF se comportan de forma similar a las cultivadas con el 1,25%.

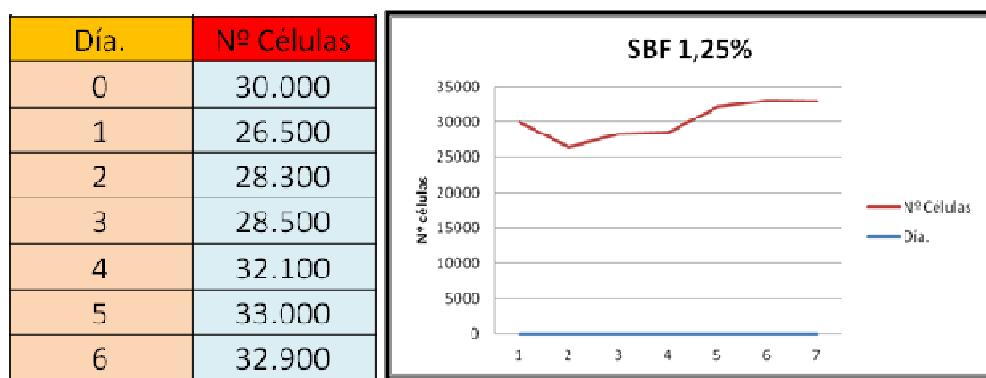


Figura 54. Tabla y representación gráfica de la proliferación celular de un cultivo con una concentración de SBF, en el medio de cultivo, del 1,25%.

Las células cultivadas con 5% de SBF proliferan, siendo su tiempo de duplicación de la población de 4,21 días. Las cultivadas en condiciones normales, con un 10% de SBF en el medio de cultivo, duplican su población en 2,5 días. (Figura 55).

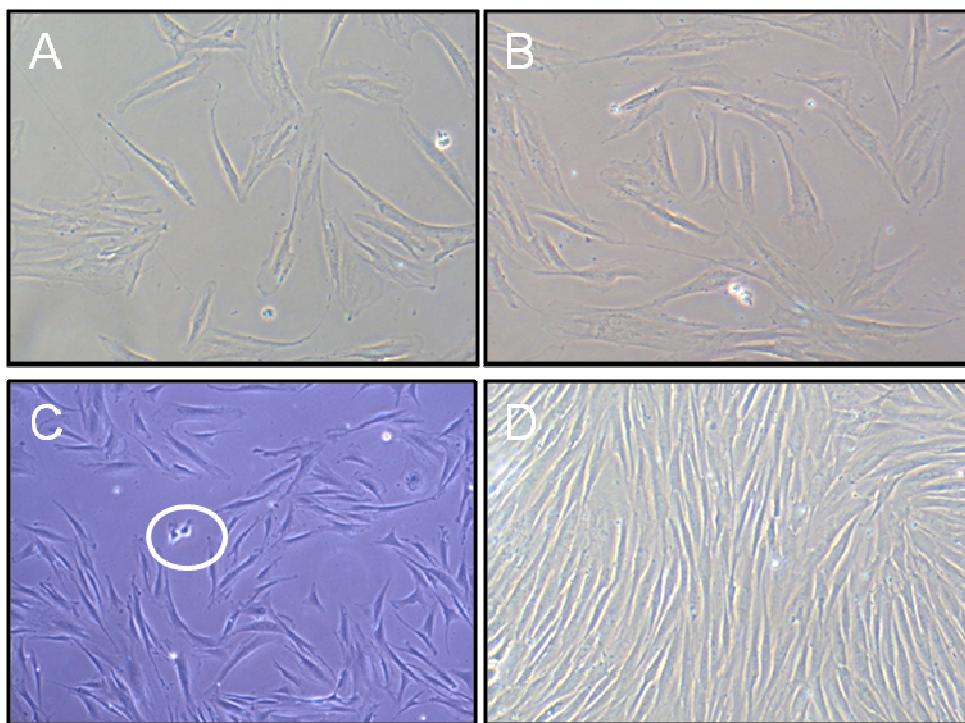


Figura 55. A) Cultivo tras una semana con DMEN al 1,25% de SBF. B) Una semana de cultivo con un 2,50% de SBF. C) A los 3 días de cultivo con 5% de SBF, el círculo señala una mitosis. D) Una semana con 10% de SBF en el medio de cultivo.

Al realizar el estudio de la proliferación celular, todos los días al hacer el recuento celular, se determinó la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de la tinción con azul Tripán. En esta las células vivas, con la membrana celular integra, se observan rodeadas de un halo refringente y no teñidas, mientras que las células con la membrana deteriorada, muertas, están teñidas y deformadas. (Figura 56)

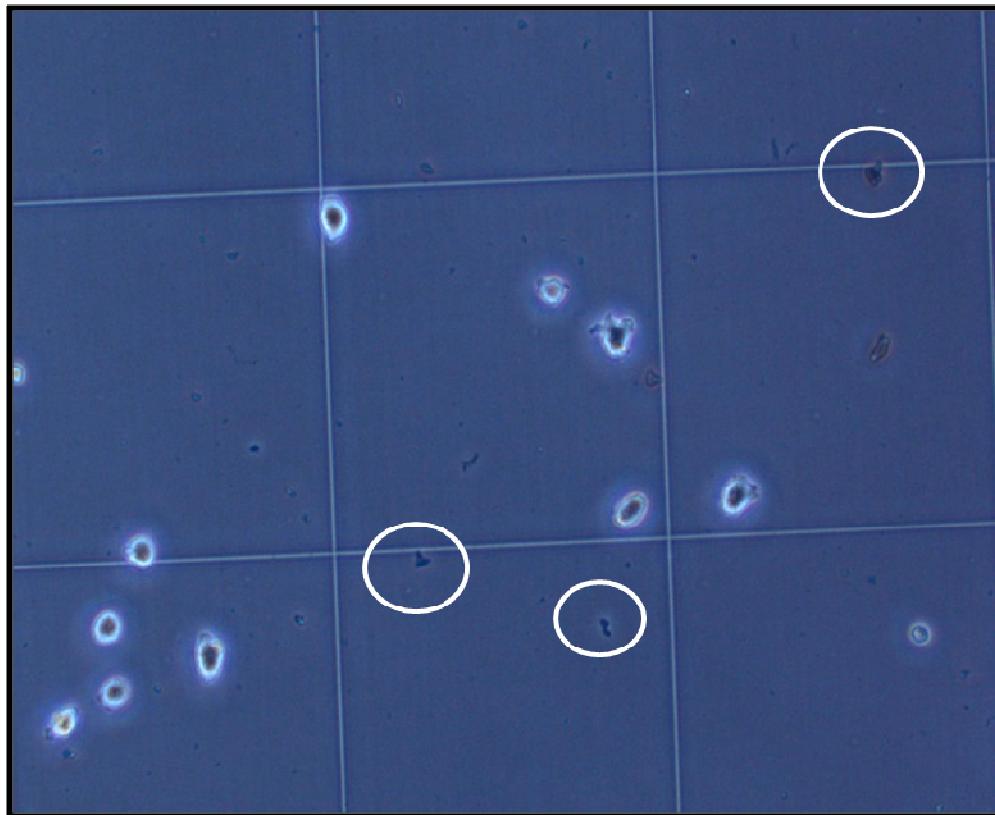


Figura 56. Prueba de exclusión de la tinción con azul Tripán.
Los círculos blancos señalan células muertas.

Se ha observado que cuando las células están en una confluencia alta, mayor del 60%, presentan un pequeño aumento de su viabilidad, de un 1% aproximadamente, respecto a cuando se encuentran en un porcentaje bajo de confluencia.

La tasa de viabilidad promedio encontrada en el pase 1 fue del 89,80%, en el pase 6 del 91% y en el pase 15 del 90%. (Tabla 5)

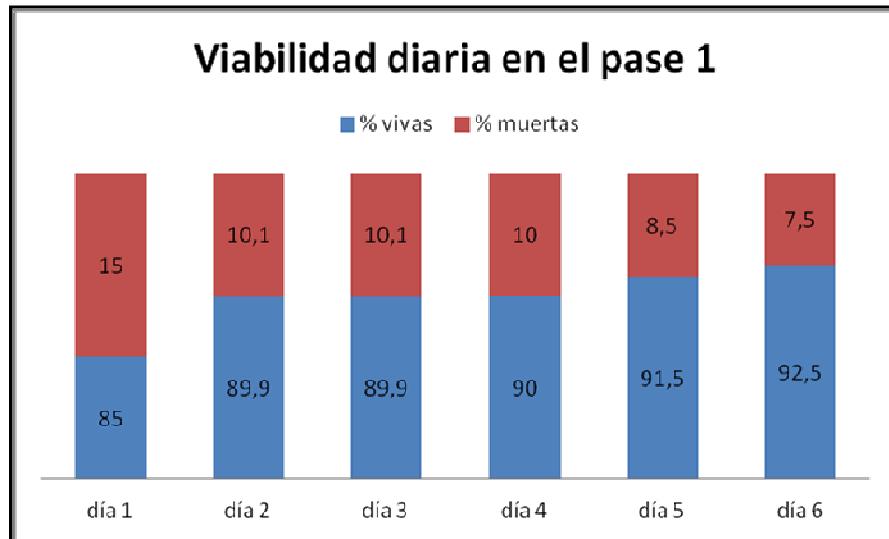


Tabla 5. Porcentaje de células viables diario en el pase 1.

3. ESTUDIO DE LA CITOMORFOLOGÍA.

Cuando las células se encuentran cercanas a la confluencia adoptan un aspecto similar al de los cultivos de fibroblastos, con una morfología celular alargada, (figura 57), cuando comienzan a confluir, con relativa frecuencia, se observan algunas células que no alargan su morfología sino que mantienen una forma redondeada. (Figura 58).

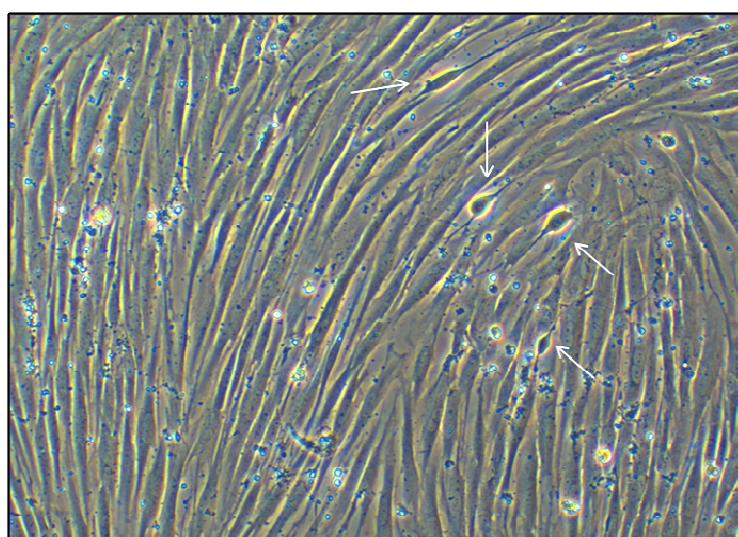


Figura 57. Las ADSCs al 95% de confluencia. Las flechas indican células que todavía están dividiéndose.

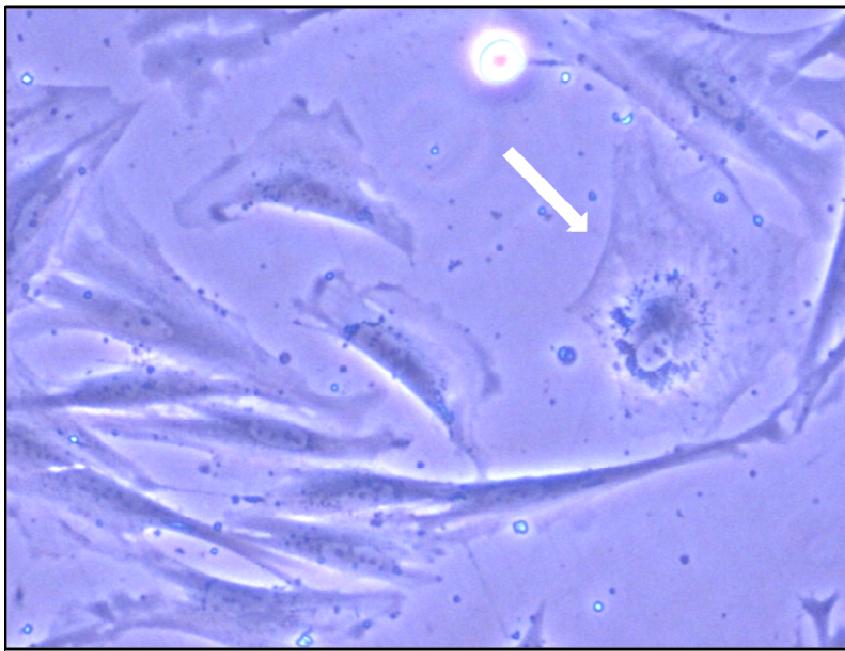


Figura 58. La flecha blanca señala una célula de morfología redondeada.

La parte principal del estudio de la citomorfología se ha realizado cuando las células están en un porcentaje de confluencia muy pequeño, esto nos permite el poder analizarlas de forma individualizada.

3.1. Características morfológicas generales.

Son comunes a los diversos tipos de morfología que presentan las células, cuando no se encuentran en confluencia, hemos encontrado la presencia de lamelipodios, estos son prolongaciones transitorias de la membrana citoplasmática, de forma laminar ancha, constituidas a partir de los filamentos de actina del citoesqueleto y que se relacionan con los mecanismos de desplazamiento celular, proyectando el lamelipodio en la dirección hacia la que se quiere desplazar la célula. Su estructura la hemos evidenciado mediante tinción con faloidina marcada con un fluorocromo, esta tiene la capacidad de impedir la despolimerización de los filamentos de la fibrina, estabilizándola al unirse a ella, este hecho nos permite observar la distribución de los microfilamentos del citoesqueleto. (Figura 59)

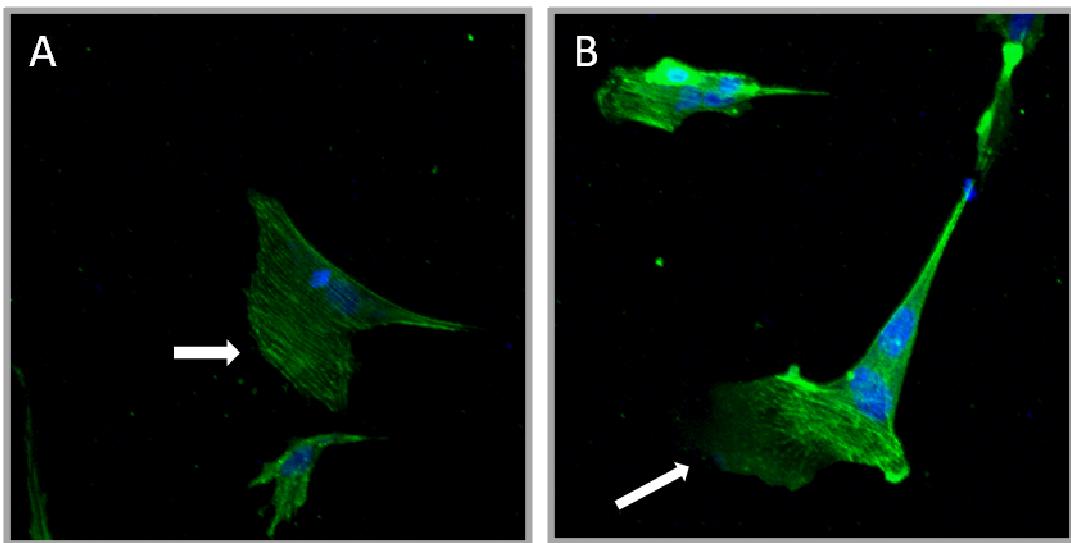


Figura 59. Las flechas blancas señalan los lamelipodios. A) El lamelipodio se forma desde un extremo y un lado de la célula. B) Célula con forma cónica, proyectando un lamelipodio desde la base del cono.

Otra característica morfológica general, común a las distintas morfologías que presentan las ADSCs, es la presencia de filopodios, estos están formados por fibras de actina dispuestas en haces paralelos que se extienden en el eje directriz de la célula. Están relacionados con el desplazamiento de las células y su adhesión a la placa del cultivo. En nuestro estudio hemos observado que las ADSCs los emplean para establecer contacto entre ellas. (Figura 60).

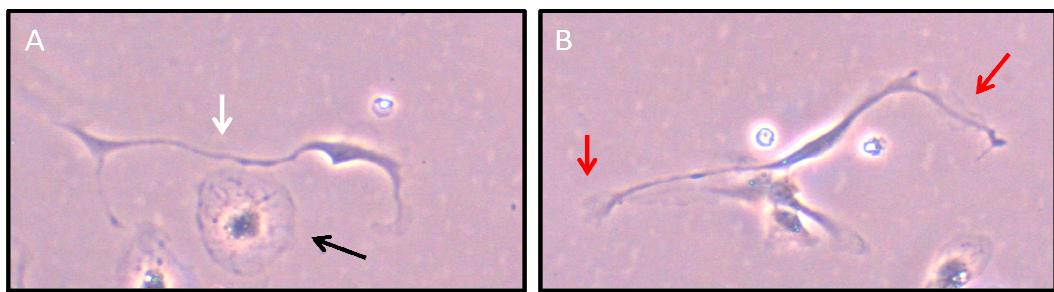


Figura 60. A) Flecha blanca filopodio de contacto. Flecha negra, célula de morfología redonda B) Célula con 2 filopodios, ambos presentan restos citoplasmáticos, flechas rojas.

Otra característica general que hemos encontrado es la presencia, hasta en un 30% de células binucleadas, e incluso en ocasiones con 3 núcleos, no habiendo

encontrado relación entre este hecho y la morfología que presentan las células. (Figura 61).

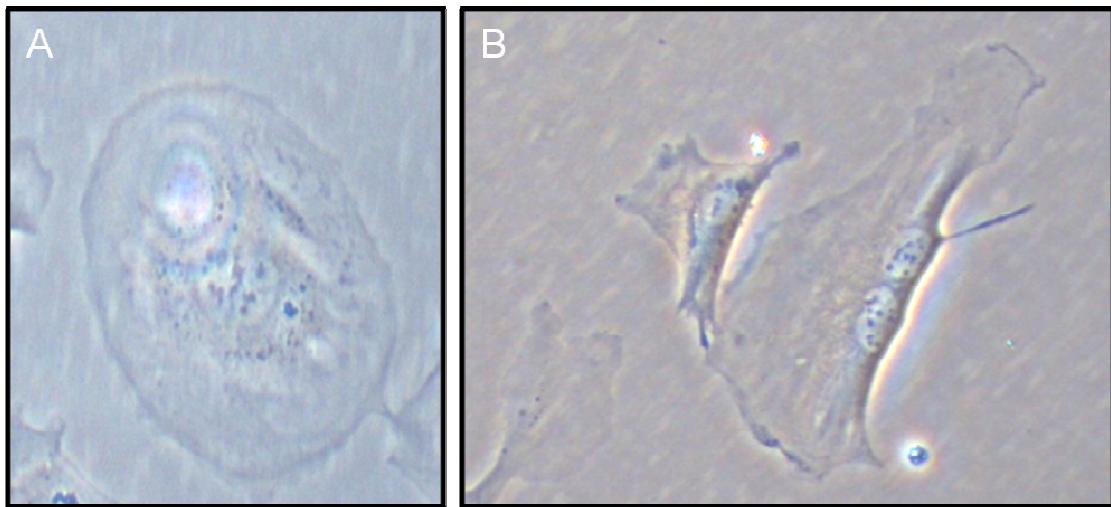
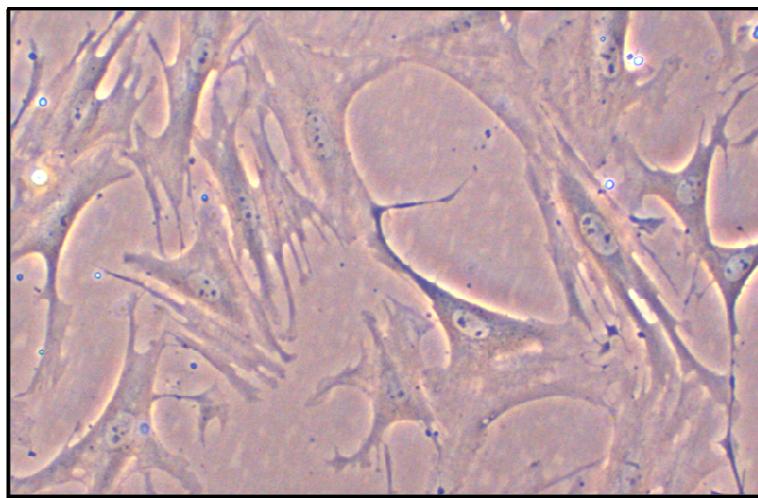


Figura 61. Células multinucleadas. A) Redondeada con 3 núcleos. B) Cilíndrica con lamelipodio lateral y binucleada.

También es una característica morfológica general, típicamente postmitótica, común a todas las ADSCs el presentar unos nucléolos relativamente grandes y nítidos, (Figura 62), se ha relacionado el tamaño de los nucléolos con la actividad nucleolar, interviniendo esta en la síntesis del RNA ribosómico.



Figuran 62. En la telofase tardía se aprecian las características de los nucléolos.

En todas las morfologías que presentan las ADSC_s hemos hallado que los orgánulos citoplasmáticos siempre se ven muy concentrados alrededor del núcleo y con un aspecto punteado. (Figura 61 A) y (Figura 63).

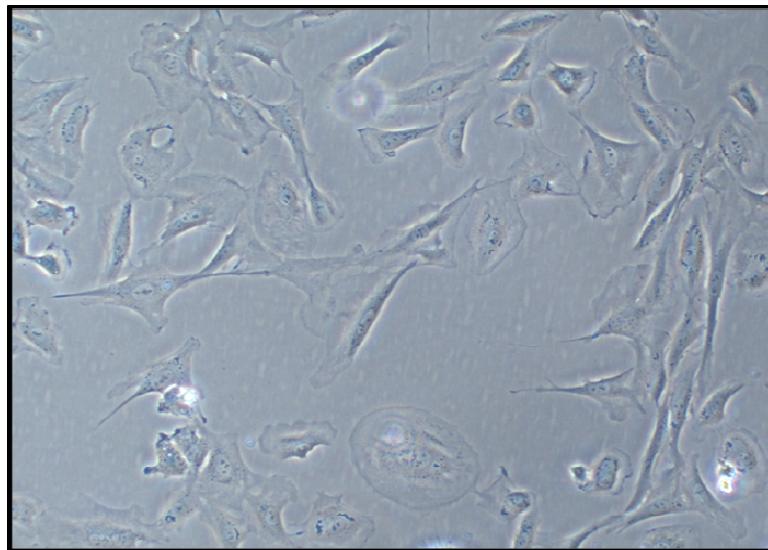


Figura 63. Disposición de los orgánulos celulares en ADSC_s con diferentes morfologías.

En un cultivo, antes de confluir, encontramos varias formas morfológicas básicas. (Figura 64).

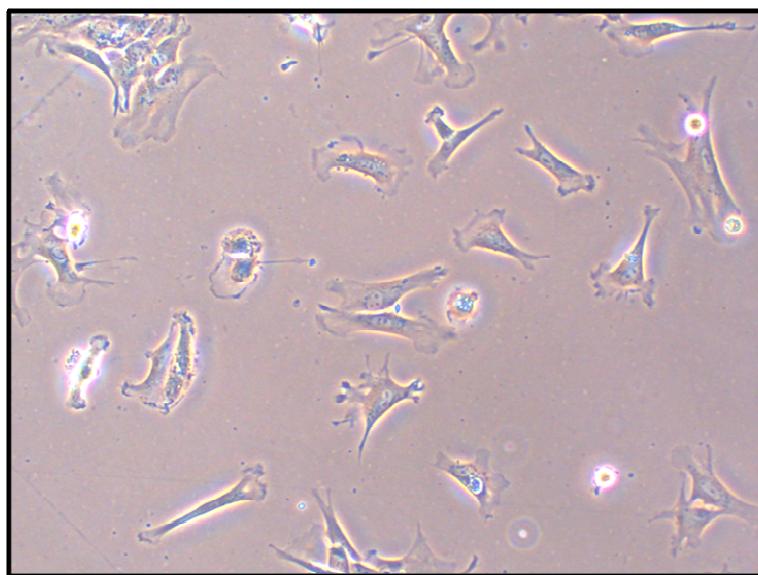


Figura 64. Cultivo de ADSC_s en pase 3, se aprecian distintas morfologías celulares básicas.

3.2. Características morfológicas particulares básicas.

Se han clasificado las formas en 5 grupos principales:

Morfología de triángulo isósceles. Esta morfología se ve con frecuencia, alrededor del 30%, se presenta con un lamelipodio en la base del triángulo, este aspecto recuerda al de un “cucuricho de helado”. Una evolución de esta forma es la variante en la que se aumenta la base con el lamelipodio y se reducen los 2 lados iguales del triángulo isósceles hasta quedar como un filopodio, aspecto que recuerda a un abanico abierto. (Figura 65 A y B)

Morfología rectangular o cilíndrica. Las células adoptan una forma alargada, como un “puro” y suelen presentar un pequeño lamelipodio en cada extremo, se pueden encontrar con 1 ó 2 núcleos. La frecuencia de observación de esta morfología está sobre el 35%. (Figura 65 C). Pensamos que una evolución de esta forma es la siguiente forma morfológica.

Morfología en C. Esta forma que se observa con una frecuencia del 20%, pensamos que se trata de una evolución de la anterior, en la cual la célula aumenta los lamelipodios de los extremos, prolongándolos por un lateral hasta hacerlos confluir, entonces la célula queda anclada por los extremos y avanza un poco por la acción del lamelipodio quedando ligeramente curvada, es la forma de C. (Figura 61 B) y (figura 65 D).

Morfología redondeada. Estas células suelen tener 1 ó 2 núcleos centrados, con los orgánulos citoplasmáticos rodeándolos y una gran expansión del citoplasma. Esta morfología está presente en el 10% de las células. Hemos observado que las células con esta morfología no suelen dividirse ni moverse, (figura 61 A), (figura 65 E),

y suelen ser muy poco cambiantes, manteniendo su forma incluso cuando el cultivo esta en confluencia.

Así mismo como fenómeno llamativo hemos observado, mediante filmación del cultivo, que los núcleos presenta un movimiento de tipo rotatorio en el citoplasma.

Morfología tripolar. En estas se encuentra el núcleo centrado y tres prolongaciones citoplasmáticas a modo de hélice, con un tamaño similar en cada una. Los extremos de las prolongaciones citoplasmáticas suelen contener elementos de anclaje de la célula a la placa, mientras que la parte central suele estar ligeramente separada de esta. (Figura 65 F).

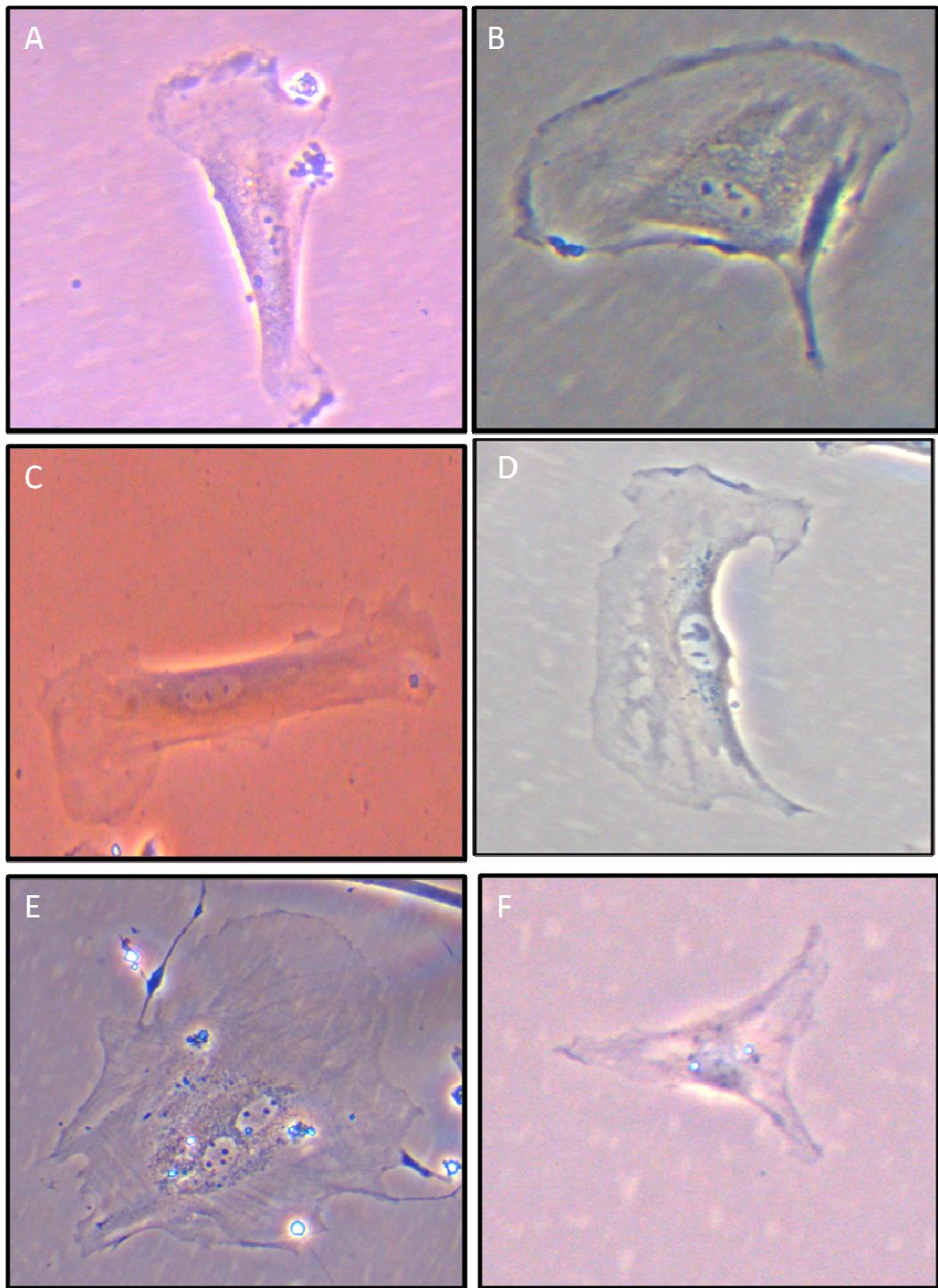


Figura 65. Morfologías particulares básicas. A y B) Triangular. C) Rectangular o cilíndrica. D) En C. E) Redonda. F) Tripolar.

En ciertas situaciones específicas, generalmente cuando las células del cultivo reciben algún estímulo potente, reaccionan y adoptan unas morfologías específicas de estas situaciones.

3.3. Características morfológicas específicas.

Se van a describir:

La morfología en la mitosis. Cuando la célula entra en mitosis va condensando el citoplasma y se va alargando, al mismo tiempo se va despegando de la placa de cultivo, esto se ve al microscopio de contraste de fases como un halo blanco refringente, aparece una zona donde el citoplasma queda como una ligera prolongación, (figura 66), después la célula se separa en dos, expandiendo de golpe el citoplasma y uniéndose a la placa de cultivo, en este momento la célula tiene una morfología poliédrica o casi redondeada. Una vez completada la división cada célula adquiere su propia forma. (Figura 67)

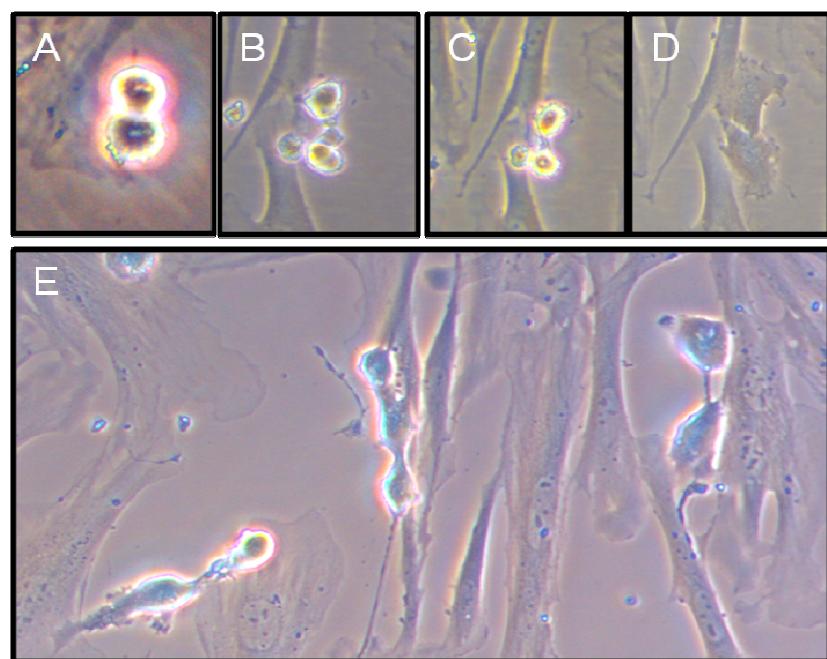


Figura 66. A B C y D) División celular seriada. E) Distintas fases de la mitosis.

En la figura 67. Podemos observar distintas morfologías que adoptan las células justo antes de completar su división, en este momento las células ya se están fijando a la placa.

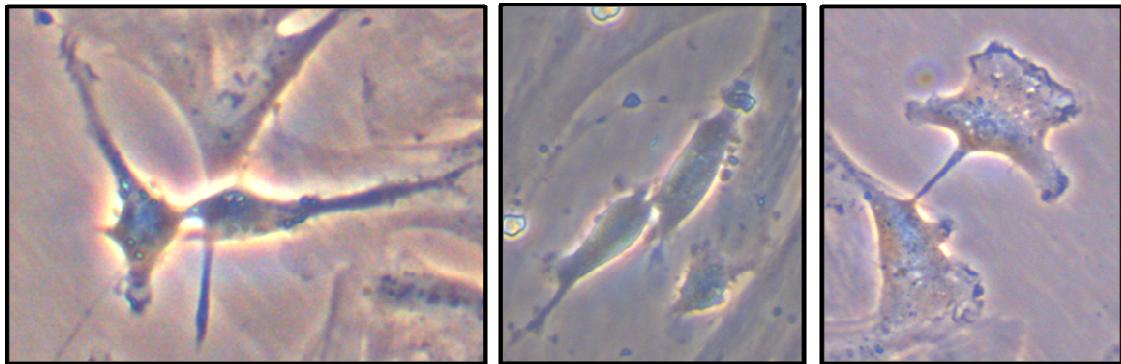


Figura 67. Morfologías justo antes de finalizar la división.

Morfología por modificación del sustrato basal. Se ha encontrado que la modificación de la base de la placa, raspándola, condiciona las disposición y forma de las ADSC_s, estas tienden a alinearse, generalmente en fila de a uno, contactando. Las células se alargan hasta adquirir una morfología filiforme, en mayor o menor grado. (Figura 68).

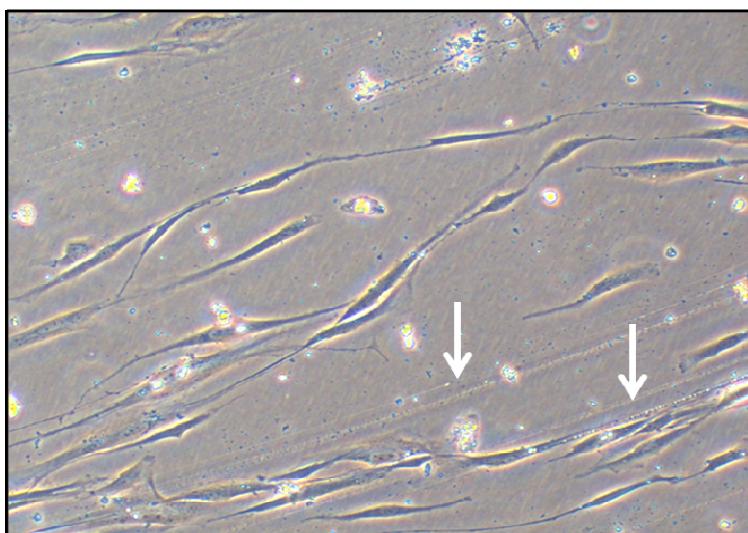


Figura 68. Placa con el fondo rayado, flechas blancas. Las células con morfología alargada, se disponen en fila siguiendo la dirección de los surcos labrados en la placa.

Morfología por sobreestimulación. Se ha observado que en ciertas ocasiones que provocan estrés en el cultivo, sobreestimulación del cultivo, como es la adición de un suplemento de diferenciación a una concentración excesiva, las ADSCs cambian su morfología, comenzando a formar grandes vacuolas citoplasmáticas que liberan fragmentos de citoplasma.

Esta pérdida de citoplasma condiciona una morfología con largas prolongaciones que posteriormente van desapareciendo, quedando las células con una morfología alargada, que se ancla a la base de la placa por unos pocos puntos.

La pérdida de citoplasma ocasiona una disminución del tamaño de las células, con lo cual se ven más separadas en el cultivo. Si cesa la sobreestimulación del cultivo las células son capaces de recobrar su morfología original en 2 días. (Figura 69).

Hemos objetivado esta morfología en algunas células presentes en cultivos que se someten a diferenciación adipogénica, sin sobreestimular a las células. (Figura 70)

Este proceso de pérdida citoplasmática también lo hemos observado en cultivos sobre los que se han aplicado pulsos eléctricos para permeabilizar la membrana plasmática. (Figura 71)

Estos hechos nos llevan a preguntarnos si la formación de vacuolas citoplasmáticas que liberan fragmentos de citoplasma podría ser un paso previo a la diferenciación?

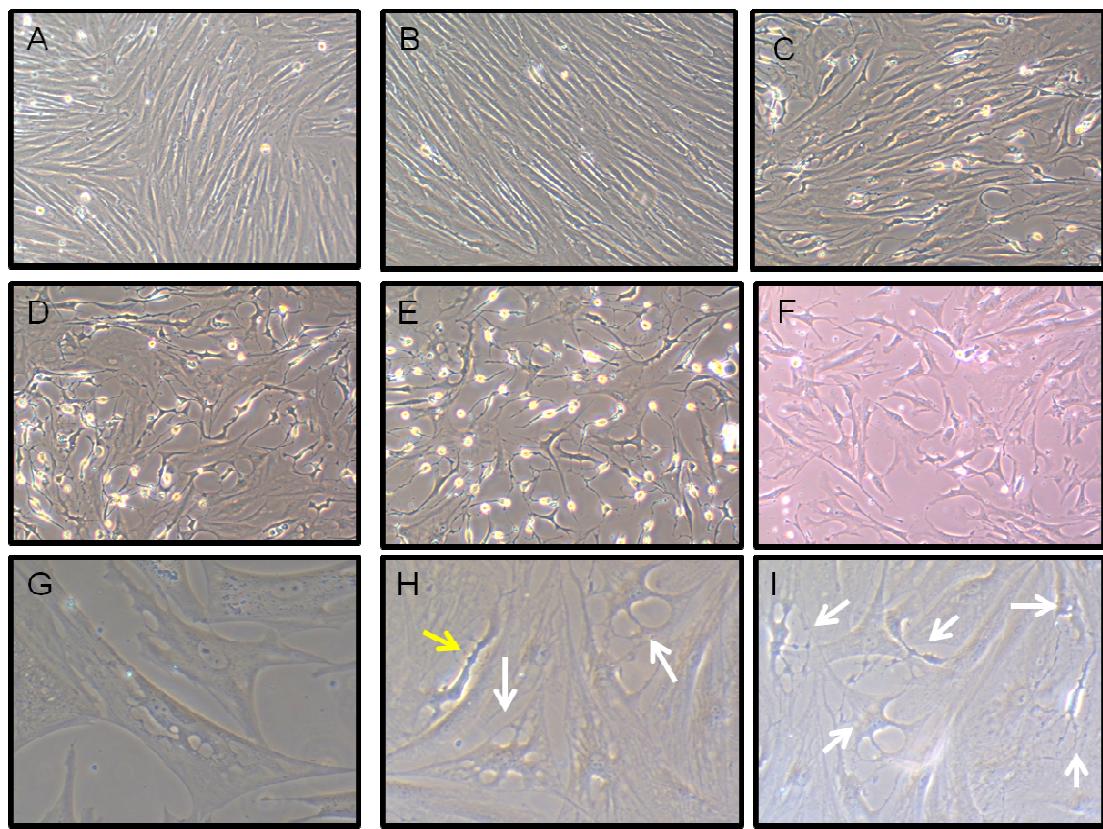


Figura 69. Cambios morfológicos por sobreestimulación. A) El día 1. B) A los 4 días. C) A los 7. D) El día 13. E) El día 15. F) El 2º día tras cesar la sobreestimulación. G) Célula que comienza a reducir su citoplasma. H e I). La flecha amarilla señala una mitosis, las flechas blancas señalan células en diferente fase de pérdida citoplasmática.

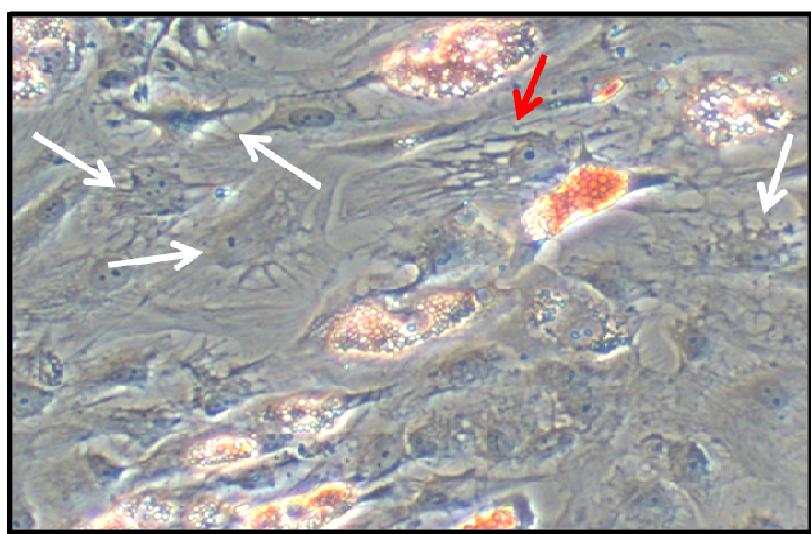


Figura 70. Cultivo de diferenciación a adipocitos, las flechas señalan algunas células que han adoptado la morfología típica de la sobreestimulación. La flecha roja marca una célula con vacuolas citoplasmáticas y separando parte del citoplasma

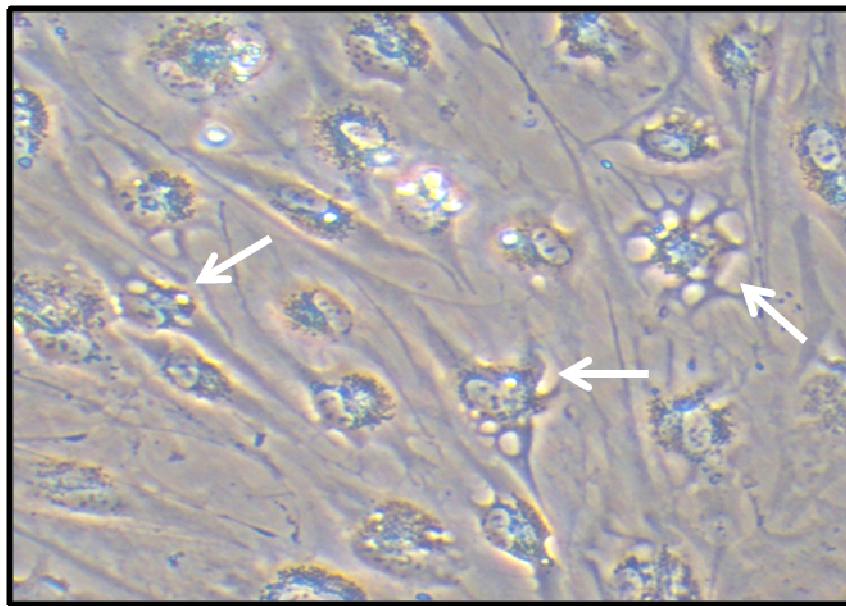


Figura 71. Cultivo que ha sufrido un pulso eléctrico, las flechas señalan algunas células con morfología de sobreestimulación.

También hemos analizado las modificaciones que se producen en la forma celular con el transcurso del tiempo.

Cambios morfológicos con el envejecimiento del cultivo. Hemos mantenido la misma línea celular en cultivo estático durante 12 meses, hasta el pase 38, controlando en cada pase la forma que presentaban las células.

No hemos encontrado ningún cambio morfológico en las células que se pueda asociar a la senescencia del cultivo. (Figura 72)

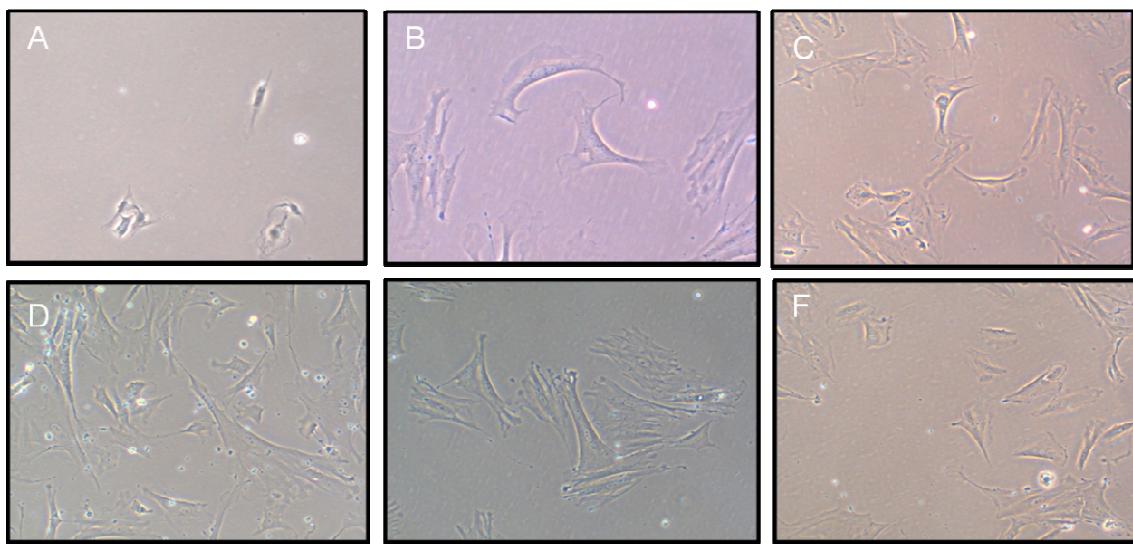


Figura 72. Morfología con el transcurso del tiempo. A) El día de la siembra. B) El día 21, fase 3. C) La línea celular en el fase 7, día 65. D) El día 104. E) A los 201 días de expansión de la línea celular. F) Transcurridos 315 desde el inicio de la expansión.

Morfología al despegar las células. Cuando se despegan las células, de la base de la placa, mediante el uso de tripsina, estas se van reduciendo y van adquiriendo una forma esférica característica. (Figura 73)

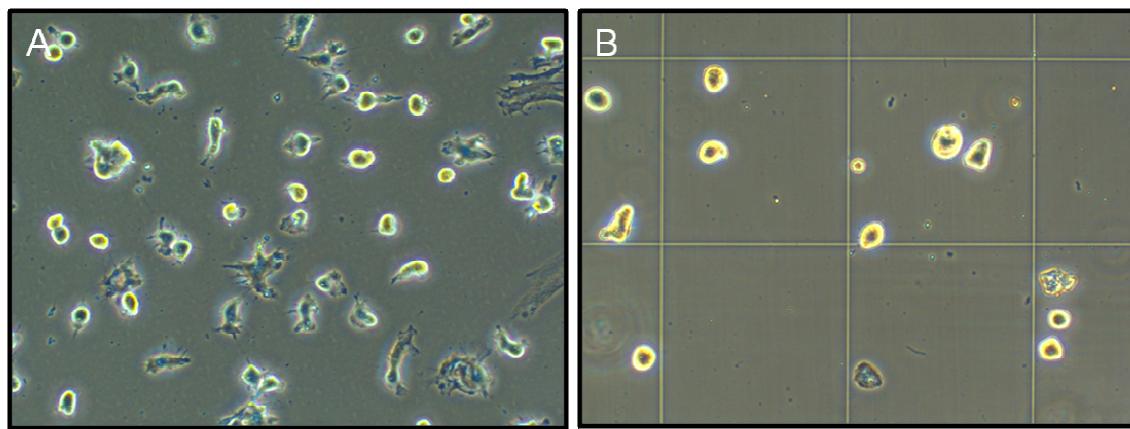


Figura 73. A) Las células al comienzo de la trypsinización. B) Forma esférica de las células despegadas, se ven rodeadas de un halo de refringencia al estar flotando.

Se han observado otras morfologías específicas cuando las células se diferencian o cuando se cultivan sobre matrices. Estas morfologías se describen en los resultados de las diferenciaciones hacia diferentes linajes y de las siembras en distintas matrices.

También se ha estudiado la morfología en células fijadas y teñidas por distintos procedimientos. (Figura 74).

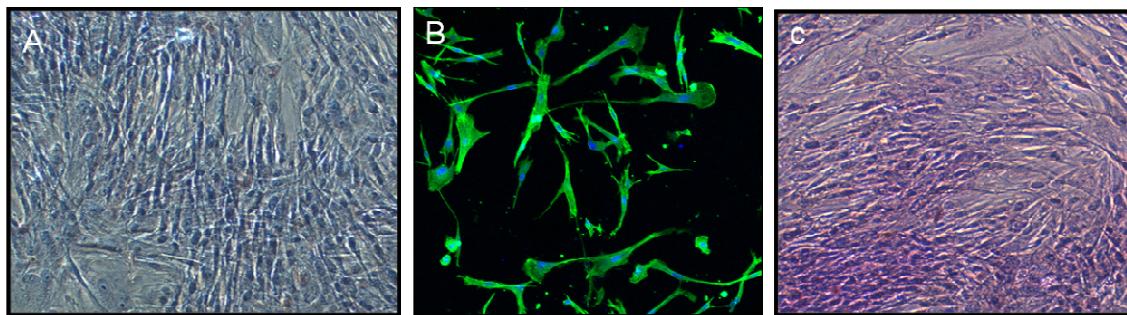


Figura 74. A) Tinción con azul de toluidina. B) Inmunocitoquímica con faloidina y fluorocromo. C) Tinción con hematoxilina-eosina.

3.4. Seguimiento del cultivo mediante microscopia de intervalos.

Mediante la microscopia de intervalos y posterior montaje en video se ha observado como adquieren su morfología las células, y se ha estudiado la dinámica celular en los cultivos.

Se ha observado que las células con morfología redondeada, que en la observación directa del cultivo parece que no tienen casi actividad, tienen los núcleos en constante movimiento, tanto rotacional como translacional.

También se ha constado la condensación del citoplasma que acontece durante la mitosis y cambios morfológicos no asociadas a la mitosis.

4. CARACTERIZACIÓN POR MARCADORES DE SUPERFICIE.

Fenotipaje.

El estudio de los marcadores de superficies se realizó cuando los cultivos estaban en confluencia. En el estudio de los marcadores de superficie, (tabla 6), se ha encontrado que la mayoría de las células no expresan marcadores hematopoyéticos como el CD34, con un $94'6 \pm 1'9\%$ de células negativas, y el CD45, con un $91'6 \pm 7'5\%$ de negativas.

El CD13, aminopeptidasa N, se expresó en el $73 \pm 7\%$ de las células. El CD14, el CD15, marcador de células linfoides y el CD19, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas se han considerado de expresión negativa, siendo estas del 0'4% del 1'6%, del 1'2 % y respectivamente, mientras que el CD29 lo expuso el $37 \pm 8,8\%$ de las células.

El CD31, que se encuentra en células endoteliales y en las plaquetas, lo han expresado el $57 \pm 9\%$ de las células analizadas. El CD44, el cual es una glicoproteína involucrada en la adhesión, migración e interacciones célula a célula, solo se ha expresado por el 7,9% de las células considerándose su negativa su expresión. El CD73 se han expresado por el $32 \pm 0'5\%$ y el CD90 o Thy-1 que es un marcador asociado a diversos tipos de células troncales y al proceso axonal de las neuronas, se ha expresado por encima del 95%.

El CD105, (figura 75), solo se han expresado claramente positivo, por encima del grupo control, por el 25'9% de las células, el resto de las células mostraban una intensidad de fluorescencia por encima de 10^2 pero dentro de los rangos del grupo control.

ADSC- Marcadores positivos celulares.	ADSC- Marcadores negativos celulares.
CD9	CD11b
CD10	CD14 --
CD13 +++	CD19 --
CD29 ++	CD31 ++
CD44 --	CD34 --
CD49 (d)	CD45 --
CD54	CD79a
CD55	CD80
CD59	CD117
CD73 +	CD133
CD90 + + +	CD144
CD105 +	HLA-DR --
CD106	c-kit --
CD146	MyD88
CD166 --	STRO-1

Tabla 6. Marcadores de superficie expresados y no expresados por las hADSC_s, en negrita los requisitos imprescindibles que tiene que cumplir la célula para ser considerada mesenquimal humana. Las filas blancas señalan marcadores que no hemos estudiado en las ADSC_s de conejo. Las amarillas indican los positivos, la intensidad del positivo se muestra por el tono y el nº de +. Los negativos en verde con signo --.

El CD166, una glicoproteína de tipo 1 miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, ha sido expresado por menos del 1% de las células.

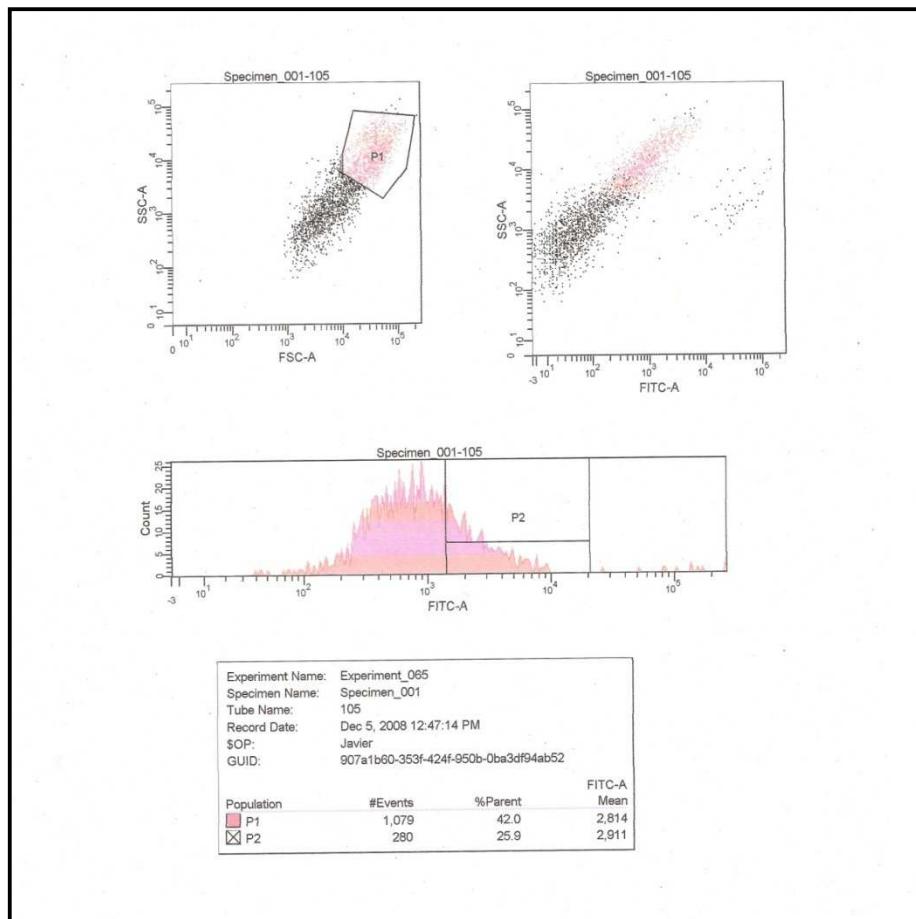


Figura 75. Citometría de flujo para el marcador CD105, solo una parte de las células, 26%, lo expresan claramente positivo.

El $50.9 \pm 1.3\%$ de las células han expresado el HLA-AB, mientras que menos del 1% han expresado el HLA-DR. El c-kit o CD117 es un receptor de membrana del SCF (Stem cell factor), se ha comprobado su grado de expresión mediante la técnica de inmunofluorescencia realizada sobre células cultivadas sobre cubreobjetos introducidos en el cultivo y visión en microscopio. Se ha encontrado que algunas de las células, una minoría, lo expresan, considerando negativa su expresión (Figura 76).

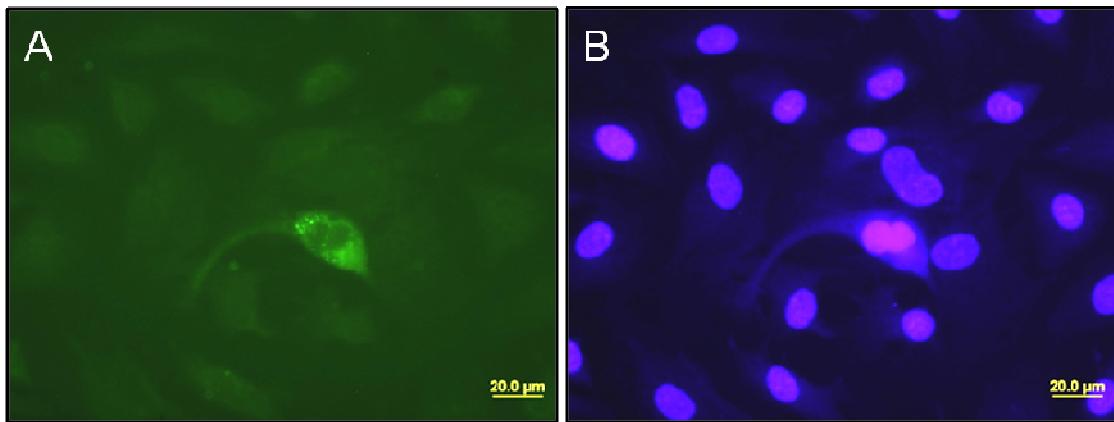


Figura 76. A) ADSC que expresa el c-kit, las células de su alrededor apenas se aprecian como sombras. B) Tras teñir los núcleos con DAPI se observan gran cantidad de ADSCs que no expresan el c-kit.

5.- ESTUDIO DE LA PLURIPOTENCIALIDAD.

Se ha estudiado la capacidad de diferenciación en diversos linajes, comprobando que las ADSCs de conejo tienen una capacidad de diferenciación pluripotencial. Se ha demostrado que tienen capacidad de diferenciación hacia linaje osteogénico, adipogénico, condrogénico y neurogénico.

5.1.- Diferenciación osteogénica.

Siguiendo el protocolo indicado en material y métodos, se ha inducido la diferenciación osteogénica en 4 placas de 12 pocillos observando como las células, en las fases iniciales de esta, modifican su morfología mediante la emisión de prolongaciones citoplasmáticas que buscan el contacto con las células vecinas, formando una especie de red.

Las células a la vez que se van diferenciando van proliferando, de manera que se van cerrando los huecos de esta red y se forman una estructura en multicapa típica,

donde las células están en confluencia. Esta está perfectamente estructurada a los 25 días de diferenciación. (Figura 77)

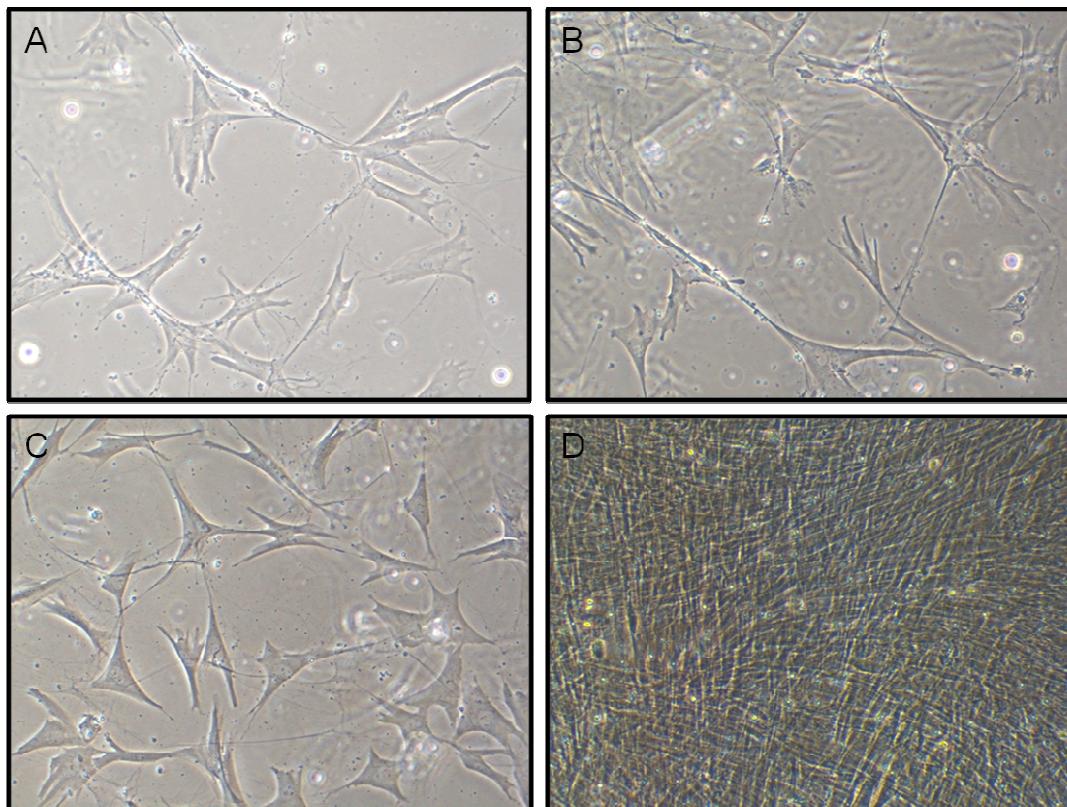


Figura 77. Diferenciación de las ADSCs hacia linaje osteogénico. A y B) A los 5 días. C) A los 7 días las células proliferan y van cerrando los huecos. D) Las células diferenciadas, a los 20 días están en confluencia y adoptan la disposición típica en multicapa.

También se ha inducido la diferenciación osteogénica formando bolas, en una técnica desarrollada por nosotros, esta técnica nos permite tener un control, a simple vista, del desarrollo del cultivo, ya que la matriz que forman las células es visible sin necesidad del microscopio. (Figura 78).

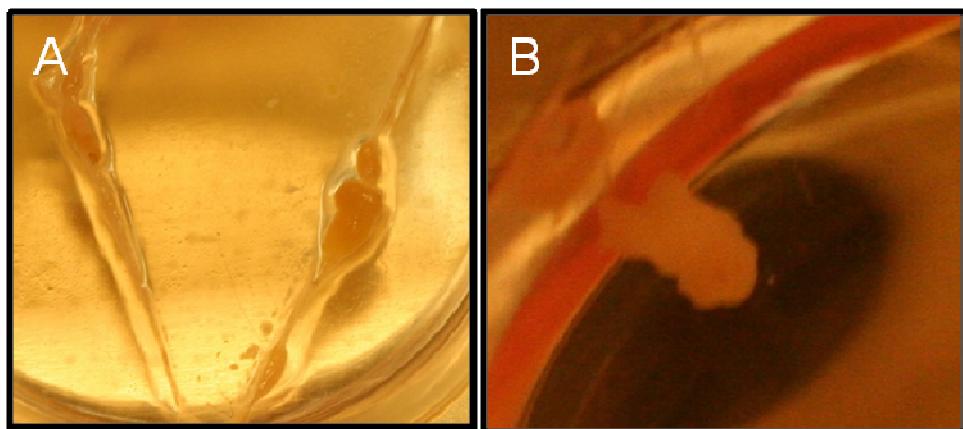


Figura 78. Diferenciación osteogénica en bola. A) Las masas están adheridas a los bordes de un fragmento de cubreobjetos. B) La bola está adherida a la base de la placa.

Para comprobar la capacidad osteogénica de las ADSC_s de conejo, estas se han cultivado en medio de diferenciación osteogénica durante 25 días. La diferenciación osteogénica temprana en osteoblastos se caracteriza por la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, (ALP), que comienza a expresarse sobre el quinto día de cultivo. Se ha examinado la expresión de ALP, en el día 10 de diferenciación, mediante la prueba citoquímica de tinción con sal de diazonio, encontrándose una alta expresión de ALP en las células diferenciadas y no expresándola las ADSC_s indiferenciadas usadas como control. (Figura 79).

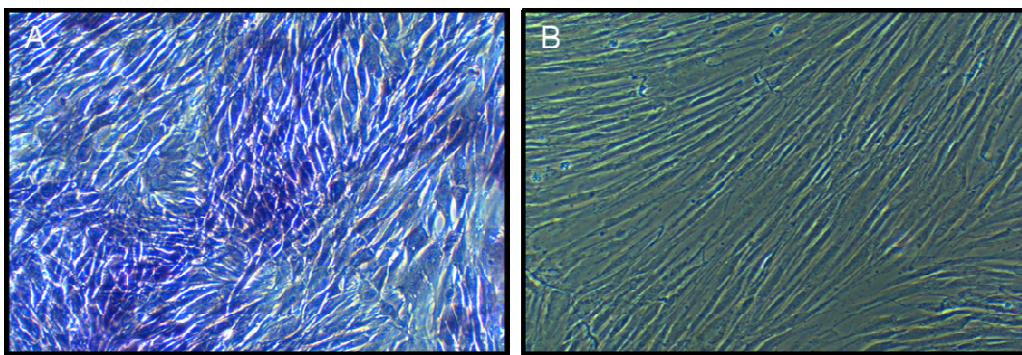


Figura 79. A) Tinción positiva de ALP con sal de diazonio, “salt fast violet” al 10 día de diferenciación osteogénica. B) ADSC_s indiferenciadas, empleadas como control.

Para evaluar la diferenciación osteogénica, junto a la ALP, se han empleado otros marcadores osteogénicos. Uno de estos es la formación de matriz extracelular calcificada. Esta se ha comprobado mediante la demostración citoquímica de la presencia de sales de calcio en el entorno de las células diferenciadas así, mediante la tinción con rojo alizarina (el cual reacciona con el calcio por quelación formando un compuesto birrefringente de color rojo), en 4 líneas celulares de ADSCs diferenciadas en multicapa y 1 diferenciada en bola se ha constatado la presencia de sales de calcio. También se ha comprobado la presencia de sales cálcicas extracelulares mediante la tinción de Von Kossa con el cultivo en monocapa, en esta se sustituyen los iones de calcio por iones de plata, viéndose las sales de calcio, con las células en monocapa, como zonas negras entre ellas. (Figura 80).

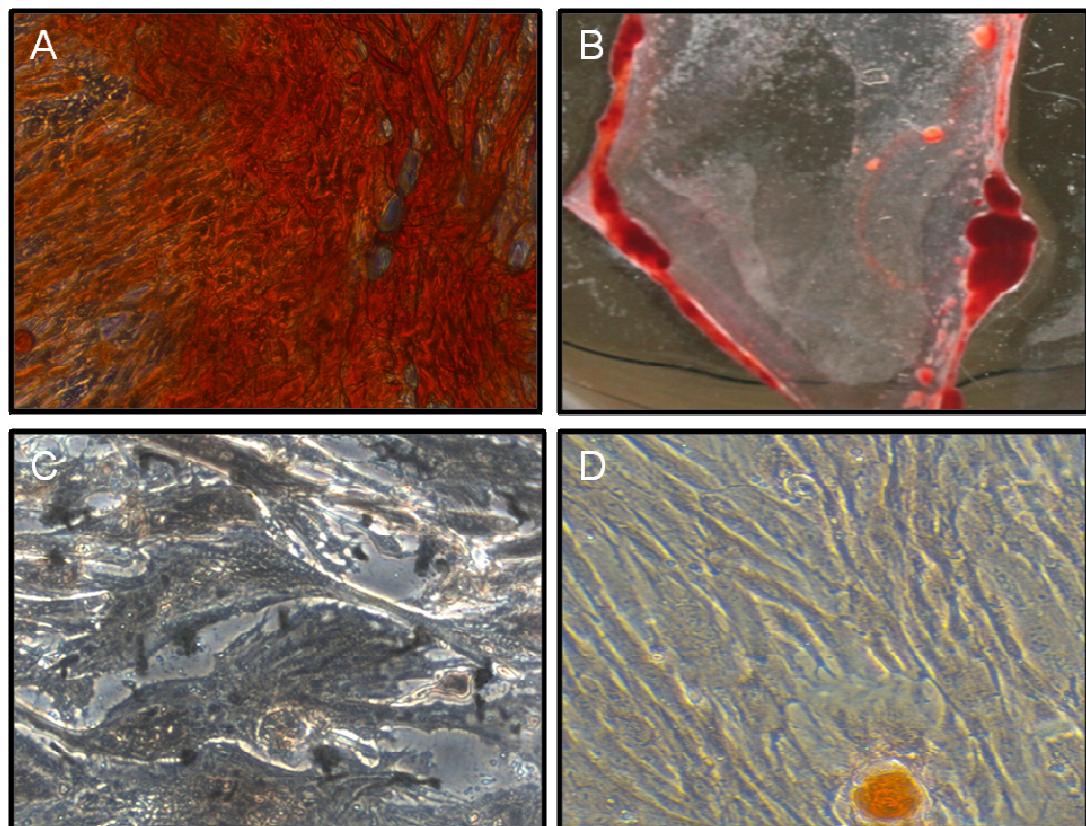


Figura 80. A) Tinción con rojo alizarina. B) Rojo alizarina positivo en cultivo en bola. C) Tinción de Von Kossa. D) El control negativo no se tiñe con la alizarina.

Otro marcador específico osteogénico es la síntesis de proteínas de la matriz ósea, para que se produzca esta formación es necesaria la activación de los genes que regulan su síntesis, y la formación de su RNA_m .

Se ha investigado, mediante RT-PCR, el nivel de RNA_m de la osteonectina y de la proteína $RUNX_2$, la cual es el factor de transcripción más relevante en osteogénesis. Como control endógeno se ha utilizado la cuantificación del RNA_m de la enzima GAPDH, enzima glicolítica fundamental para el metabolismo celular.

Se ha realizado la evaluación de 3 grupos de $ADSC_s$:

- 1) Un grupo de control, con células indiferenciadas, en el cual los valores de expresión de los marcadores estudiados se consideraron 1, expresando GAPDH y no expresando osteonectina y $RUNX_2$.
- 2) Otro grupo estaba formado por las células diferenciadas durante 15 días.
- 3) Un tercer grupo constituido por células diferenciadas durante 25 días.

Hemos hallado que la GAPDH tiene unos valores similares en los 3 cultivos, mientras que la osteonectina y la $RUNX_2$ solo se encuentran aumentadas en los cultivos de diferenciación ósea.

Los resultados obtenidos y su representación gráfica se muestran en la tabla 7.

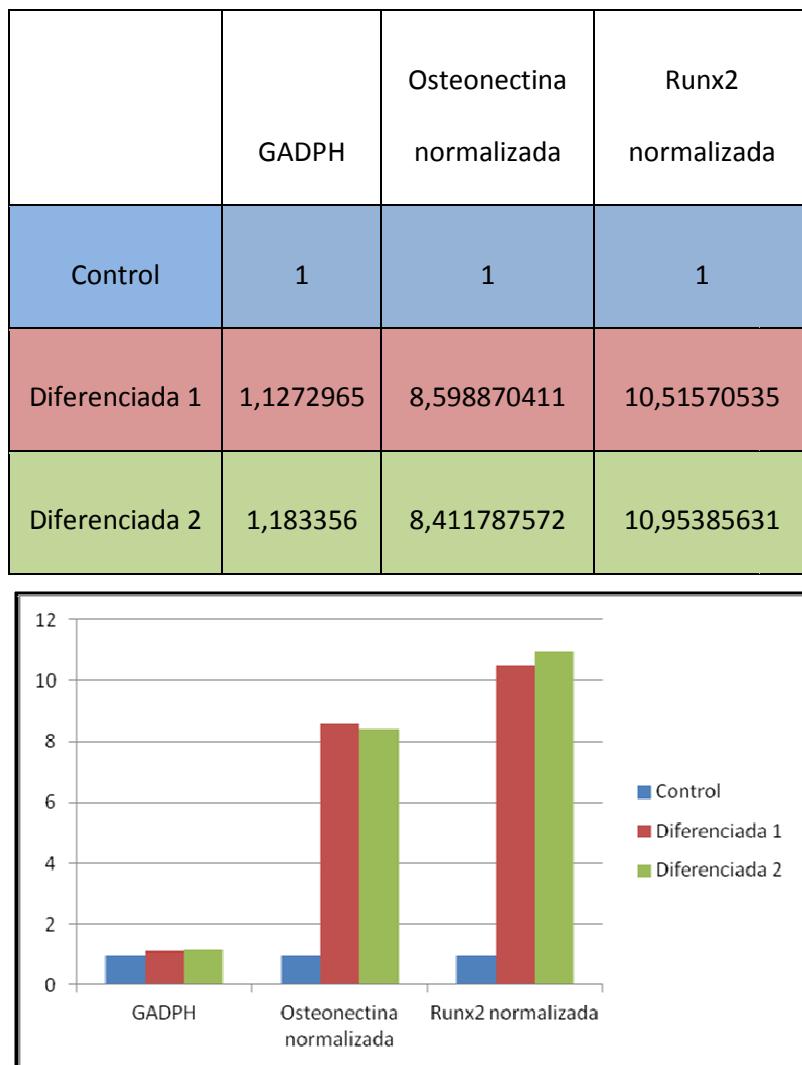


Tabla 7. Valores hallados en la RT-PCR y su representación gráfica. Las células diferenciadas osteogénicas expresan los mensajeros de la osteonectina y del RUNX₂.

5.2.- Diferenciación condrogénica.

La diferenciación condrogénica se puede llevar a cabo mediante 2 técnicas, en una de ellas las células forman una bola, micromasa, que se encuentra en suspensión en el medio de cultivo, en la otra técnica se forma un aglomerado de células que está rodeado por una multicapa de células en confluencia.

La diferenciación por la técnica de micromasa, en un tubo falcon, la hemos realizado en 7 ocasiones, el problema que nos ha planteado ha sido la imposibilidad de monitorizar el cultivo con microscopio de contraste de fases.

Otro inconveniente ha sido la dificultad de manejo de la bolita para la comprobación citoquímica de la diferenciación.

Estos inconvenientes se han solventado llevando a cabo la diferenciación en placa, mediante la formación de un conglomerado celular, esta técnica la hemos llevado a cabo en 2 placas.

La morfología de las células, cuando se observan al microscopio de contraste de fases, solo se puede apreciar en las que están en monocapa o en multicapa fina.

Estas presentan, cuando están en confluencia, un aspecto de fibroblastos. En las zonas donde las células están en mono capa, sin llegar a confluir, se aprecian las morfologías particulares básicas del cultivo en placa, no habiendo observado modificaciones morfológicas respecto a los cultivos de células indiferenciadas. (Figura 81).

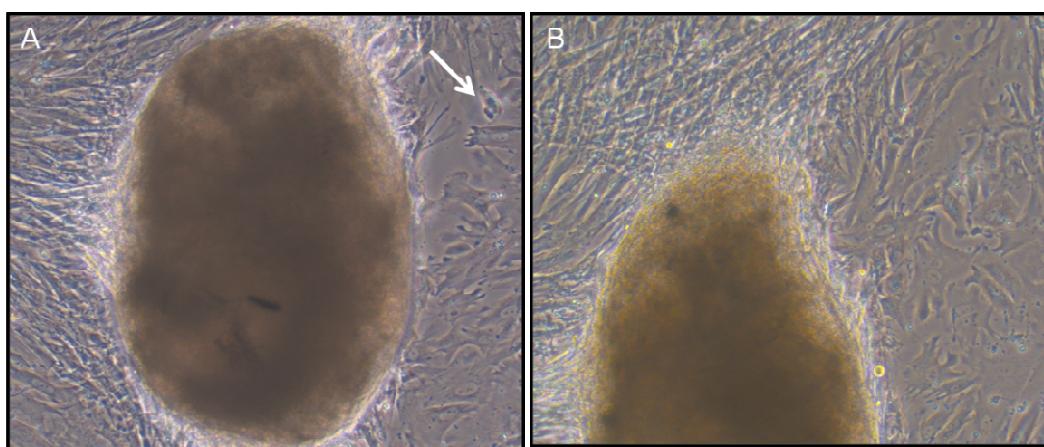


Figura 81. A) Agregado celular diferenciado condrogénico, la flecha señala una mitosis. B) Detalle con células en varias capas junto al conglomerado.

Las masas celulares condrogénicas presentan una matriz extracelular rica en colágeno y en proteoglicanos sulfatados, estos se puede detectar de forma específica mediante la tinción, en medio ácido, con azul alcíán.

El tinte no penetra en el conglomerado celular, por su densidad, pero si que tiñe la matriz extracelular formada cuando las células están en multicapa alrededor del conglomerado. Las células que se encuentran en la periferia, en monocapa, no forman matriz extracelular y por lo tanto no se capta el colorante. (Figura 82)

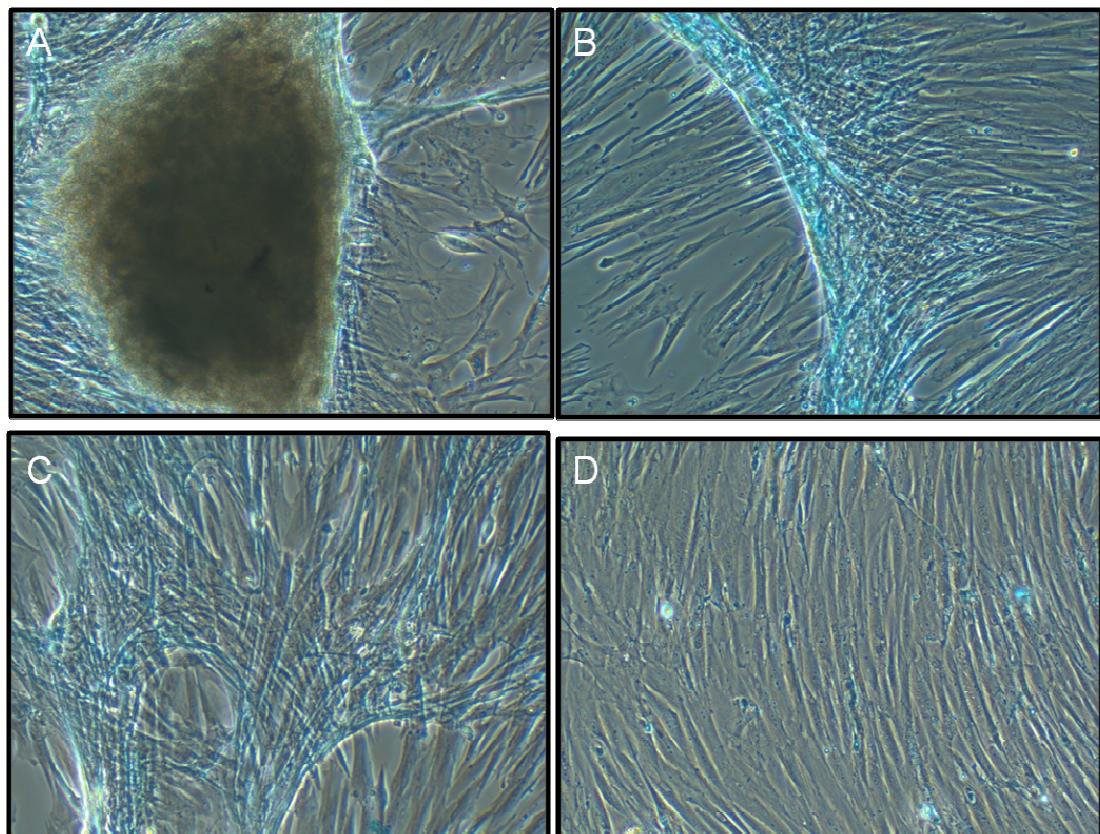


Figura 82. A) Tinción con azul alcíán de un cultivo condrogénico en placa, conglomerado central. B y C) Células en multicapa rodeando al conglomerado central y células en mono capa. D) Las ADSCs indiferenciadas, control, no se tiñe con el azul alcíán, se ven residuos del tinte.

5.3.- Diferenciación adipogénica.

En el proceso de diferenciación adipocítica de las ADSC_s que hemos realizado en 4 placas siguiendo el protocolo detallado en material y métodos, se observa que a partir del octavo día, en una fracción de las células, comienzan a aparecer unas gotitas en su citoplasma, estas corresponden a lípidos, que van aumentando, en número, hasta ocupar la mayor parte del espacio intracelular. Esta morfología asemeja a la de los adipocitos.

También hemos observado la presencia de células aisladas que presentan la morfología típica de la sobreestimulación celular. Una proporción importante de células, entre el 70% y el 85%, no sufre modificación morfológica significativa. (Figura 83).

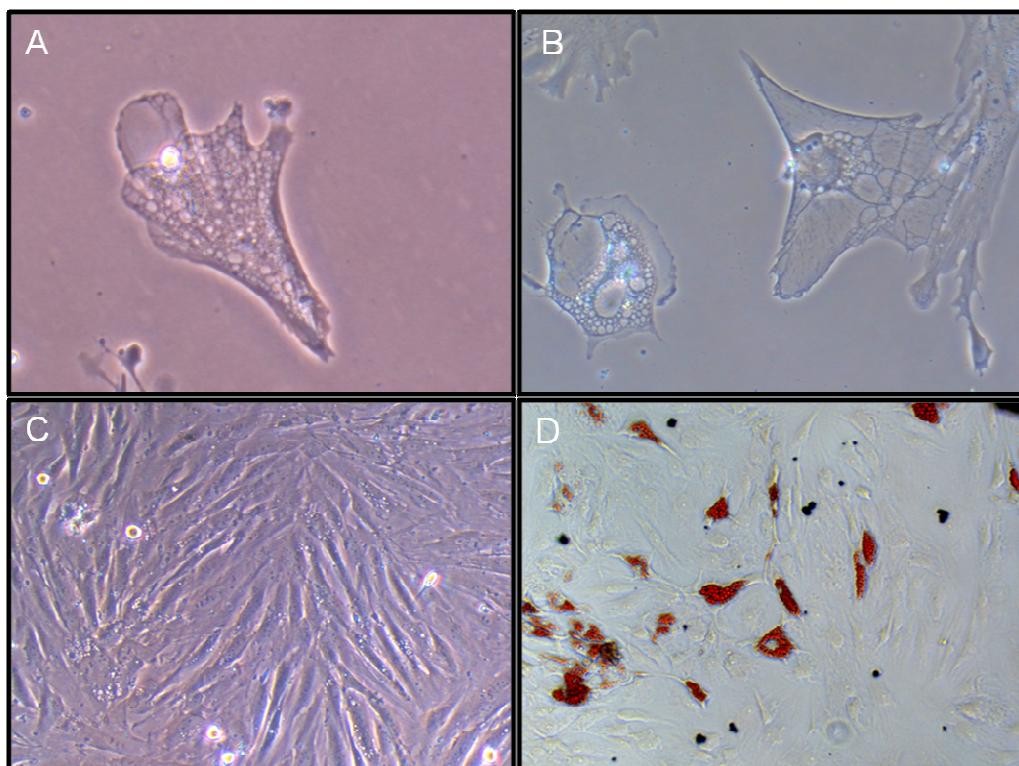


Figura 83. A y B) ADSC_s con diferentes concentraciones de vesículas lipídicas en su citoplasma. C) Cultivo de diferenciación adipocítica. D) Tinción con aceite rojo O, visión de microscopia en campo claro que destaca las células teñidas.

La diferenciación se ha comprobado mediante la tinción de las vacuolas lipídicas con aceite rojo O, el cual es un lisocromo muy soluble en los lípidos y que no se une a ninguna otra sustancia celular. Los lípidos se observan como gotitas rojas en el interior del citoplasma, en algunas ocasiones han aparecido entre un 5% y un 15% de células vacuoladas que no han captado el colorante. (Figura 84).

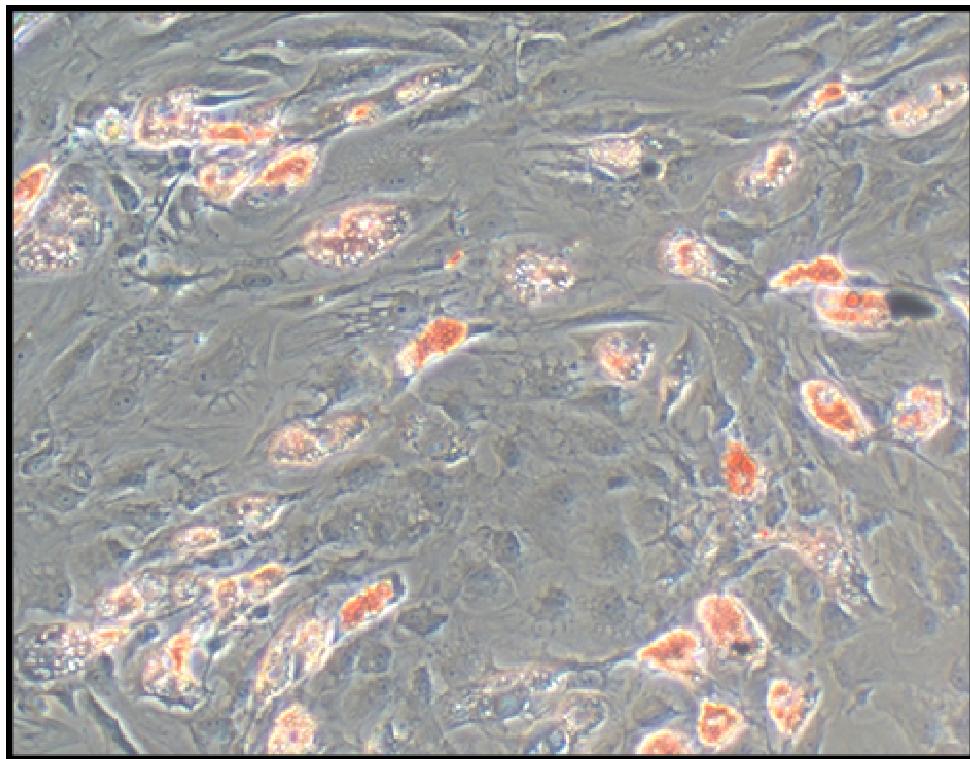


Figura 84. El aceite rojo O tiñe claramente las ADSC_s diferenciadas a adipocitos. Se observan algunas células que presentan formas citoplasmáticas similares a las gotitas lipídicas pero que no se tiñen.

5.4.- Diferenciación neurogénica.

Se han cultivado las ADSC_s en medio neurogénico, a las 24 horas ya se evidencian cambios morfológicos en las células, se ha observado como estas van condensando el citoplasma, van emitiendo varias prolongaciones y van adquiriendo una morfología similar a la de las células nerviosas. En 3-5 días la diferenciación se completa, las

células que se han diferenciado tienden a establecer contacto entre ellas, mediante prolongaciones que semejan a dendritas y axones, formando una especie de red no muy tupida. También se puede observar un alto porcentaje de células, 85%; que no sufren ningún tipo de transformación morfológica. (Figura 85).

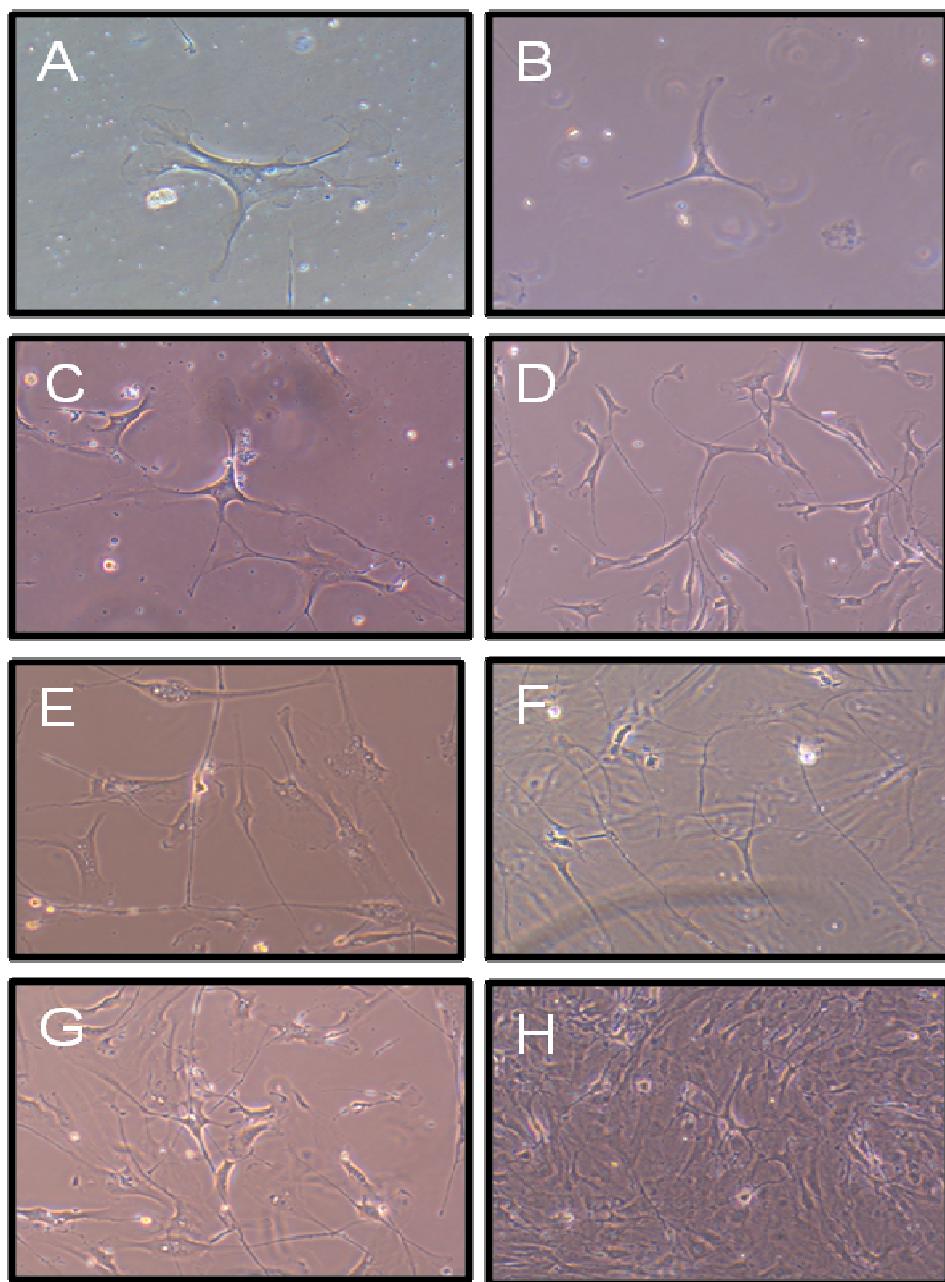


Figura 85. A) Inicio de la diferenciación neurógena. B) La célula adquiere morfología tripolar. C, D, E, F y G). Las prolongaciones tienden a contactar ya es perceptible la red formada por las células diferenciadas. H) Células en distinto grado de diferenciación.

Las células nerviosas producen ciertas proteínas características. (Figura 86)

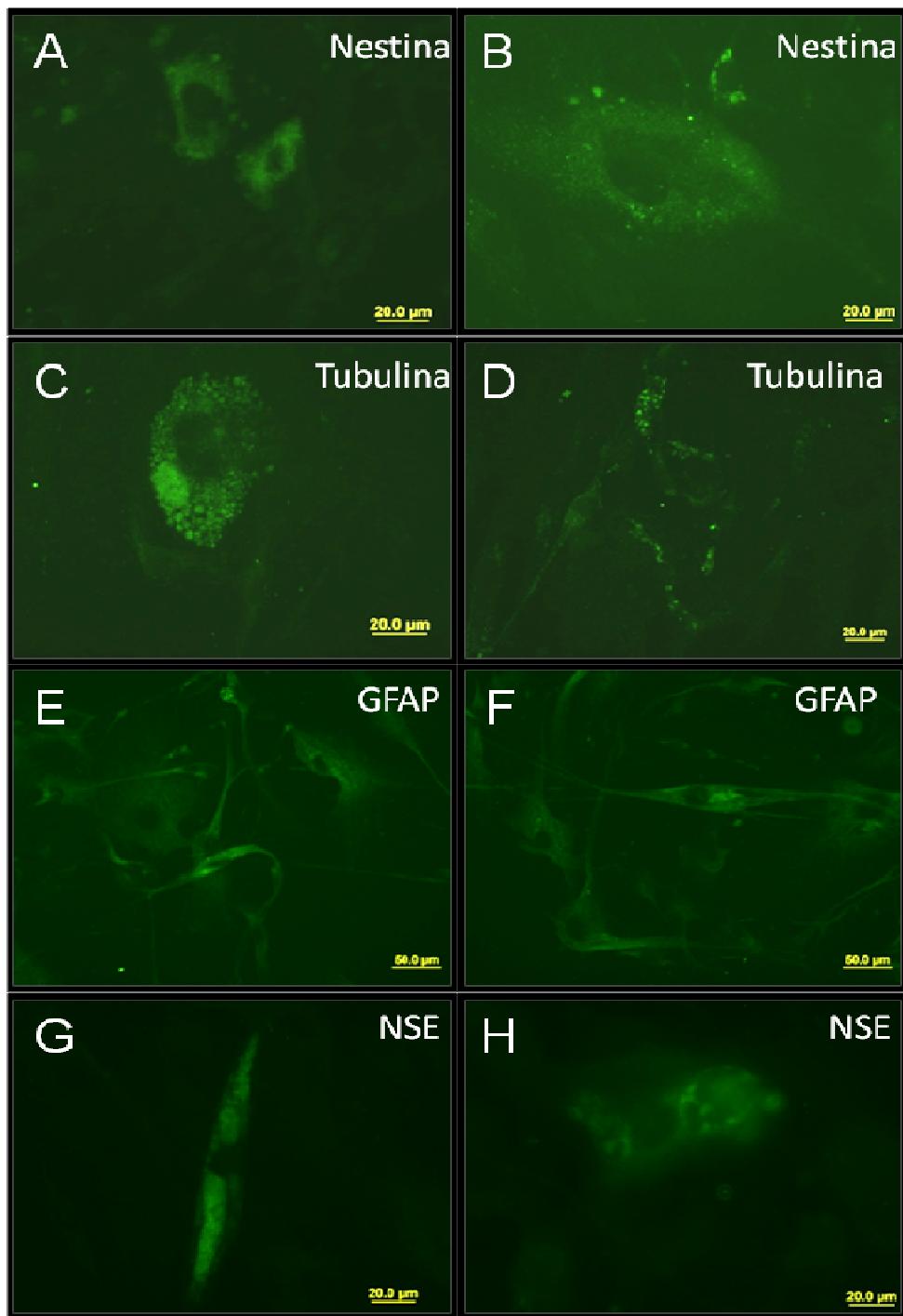


Figura 86. Algunas ADSCs cultivadas en medio neurogénico expresan: A y B) nestina. C y D) Tubulina β III. E y F) Proteína glifobrilar ácida, la cual es característica de los astrocitos. G y H). Enolasa específica neuronal, ésta es específica de las neuronas maduras.

Como se ve en la figura 86, mediante técnicas de inmunocitoquímica se ha investigado la producción de estas proteínas por parte de las ADSCs cultivadas en medio, hemos encontrado que parte de las células diferenciadas expresan estas proteínas. La nestina está involucrada en el crecimiento del axón y se considera un marcador de neuronas primitivas al igual que la tubulina β III neuronal, la cual forma parte del cito esqueleto de las neuronas neurogénico. La GFAP es un marcador de astrocitos mientras que la enolasa neuronal específica se considera un marcador de neuronas maduras.

6. CRECIMIENTO EN MATRICES.

Una vez demostrada la pluripotencialidad de las ADSCs de conejo, debemos de analizar los resultados de su crecimiento en distintas matrices.

Las matrices proporcionan el soporte para la viabilidad y proliferación celulares. Se ha evaluado la relación que establecen las células con las matrices, su viabilidad y su capacidad de proliferación en los dos tipos de matrices desarrolladas.

Los resultados obtenidos en la matriz de fibrina autóloga, respecto al método de siembra, han sido similares con los 2 procedimientos empleados.

En la matriz de fibrina las células adoptan una disposición tridimensional. A la observación con el microscopio de contraste de fases, cuando hay una baja densidad de células es difícil el distinguirlas, pues suelen adoptar morfologías de tipo alargado que se confunden con la estructura de la fibrina, conforme las células proliferan y van confluyendo se pueden distinguir mejor. (Figura 87).

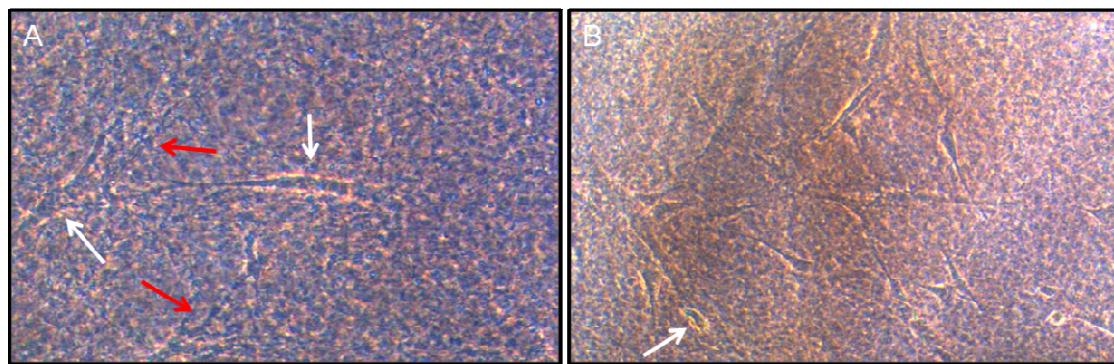


Figura 87. A) Las flechas blancas señalan 2 células que se ven nítidas, las flechas rojas señalan 2 estructuras alargadas que se pueden confundir con células. B) Al haber mayor densidad celular estas se aprecian mejor. La flecha blanca señala una mitosis, signo de que las células proliferan en la matriz.

Las células cultivadas en la matriz de fibrina autóloga se hacen fácilmente visibles mediante la tinción con azul de metileno, así es más sencillo confirmar su disposición tridimensional y su morfología predominantemente alargada. (Figura 88)

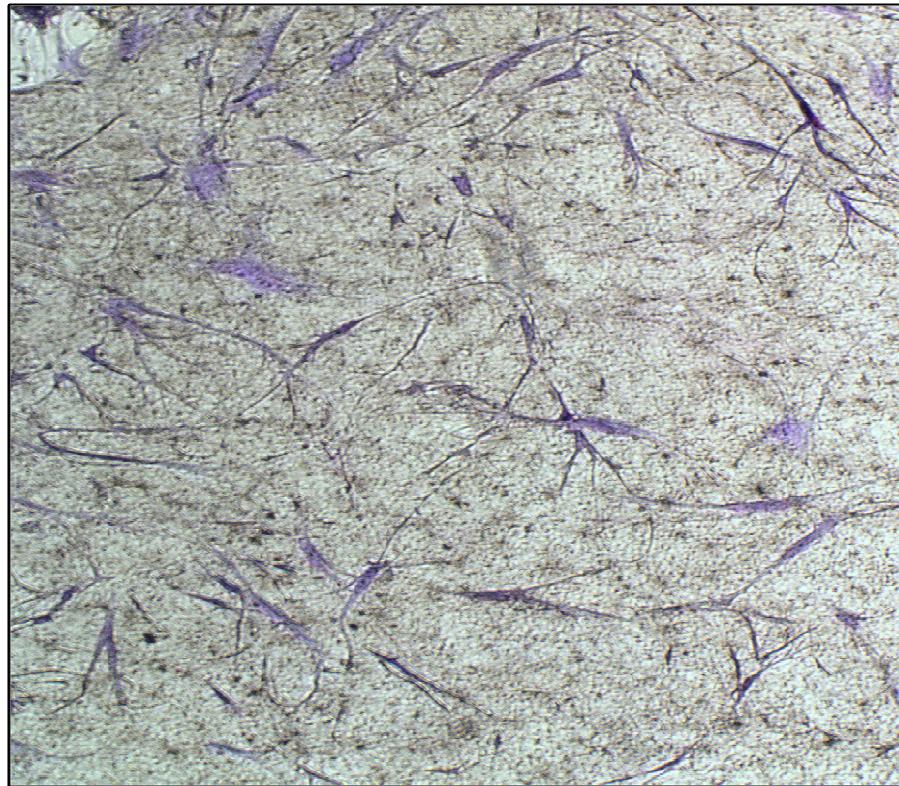


Figura 88. Tinción con azul de metileno de las células en la matriz de fibrina.

Si el cultivo de ADSC_s se observa con el microscopio confocal, tiñendo las células mediante inmunocitoquímica con faloidina, se aprecia muy claramente que las células están situadas tridimensionalmente dentro de la matriz y que estas tienden a contactar. La morfología celular se aprecia mucho más clara que con los otros métodos, encontrándose que las células mantienen sus formas particulares básicas, con la salvedad de que casi no se aprecian células de con morfología redondeada.

Como con el microscopio confocal la fibrina de la matriz no interfiere la observación, se ha observado que muchas células tienen morfología alargada, pero otras muchas conservan formas rectangulares. (Figura 89).

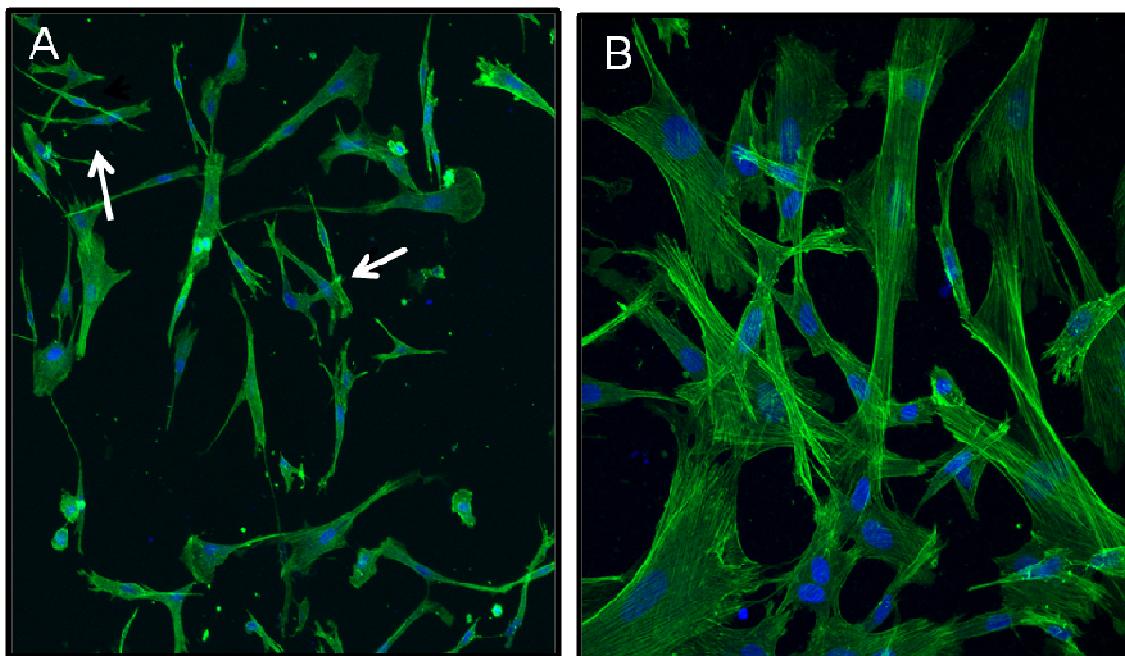


Figura 89. Microscopia confocal. A) Las células predominantes son alargadas, se ven algunas con morfología de “cucurcho”, las flechas blancas señalan células donde se aprecia claramente la disposición tridimensional. B) La forma predominante es rectangular. Se aprecian como las células están situadas a varios niveles.

Cuando las células se cultivan en una matriz de hidroxiapatita compactada con fibrina se presentan los mismos problemas a la observación que en las matrices de fibrina autóloga. Con microscopio de contraste de fases se ha observado la misma morfología alargada, aquí si se puede ver como se relacionan las células con la hidroxiapatita de la matriz, las células emiten unas pequeñas prolongaciones citoplasmáticas que les sirven de anclaje sobre el mineral. (Figura 90).

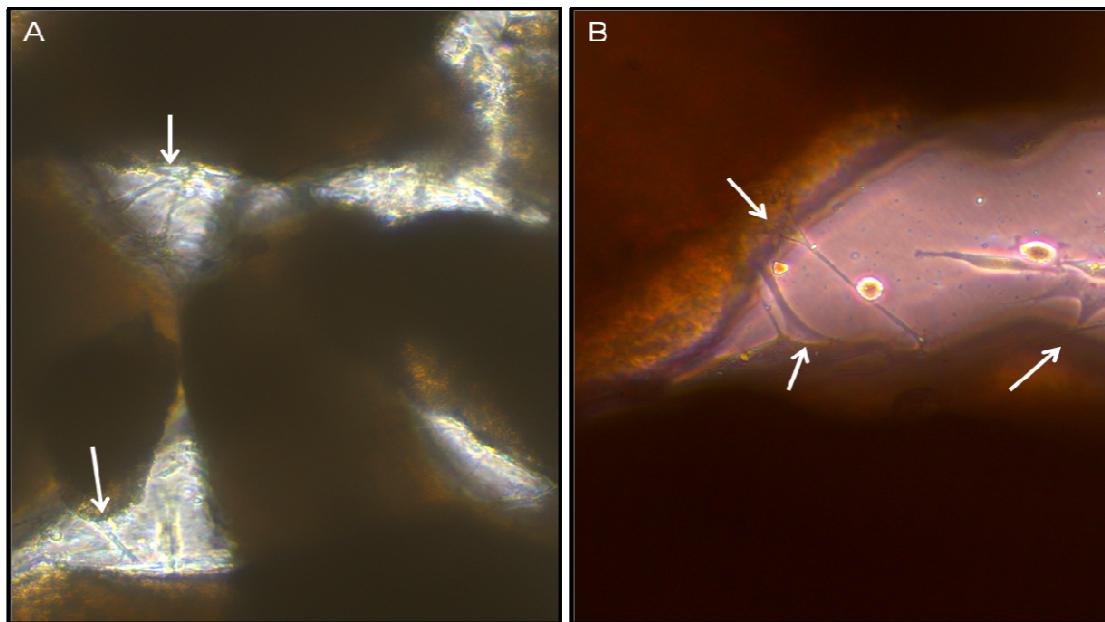


Figura 90. Microscopia de contraste de fases de las células incluidas en una matriz de HA compactada con fibrina. A) Las flechas blancas indican donde se encuentran las células en contacto con la HA. B) A mayor aumento, la flecha muestra la forma como las células se anclan a la matriz.

La observación con microscopía confocal presenta la dificultad de captar la hidroxiapatita, la cual pierde su aspecto natural, no obstante ilustra con mucho detalle tanto la morfología que presentan las células como la forma en que se relacionan con la matriz, de este modo sirve para confirmar los resultados. (Figura 91).

Los resultados obtenidos muestran una integración y proliferación celulares correctos en el interior de las matrices.

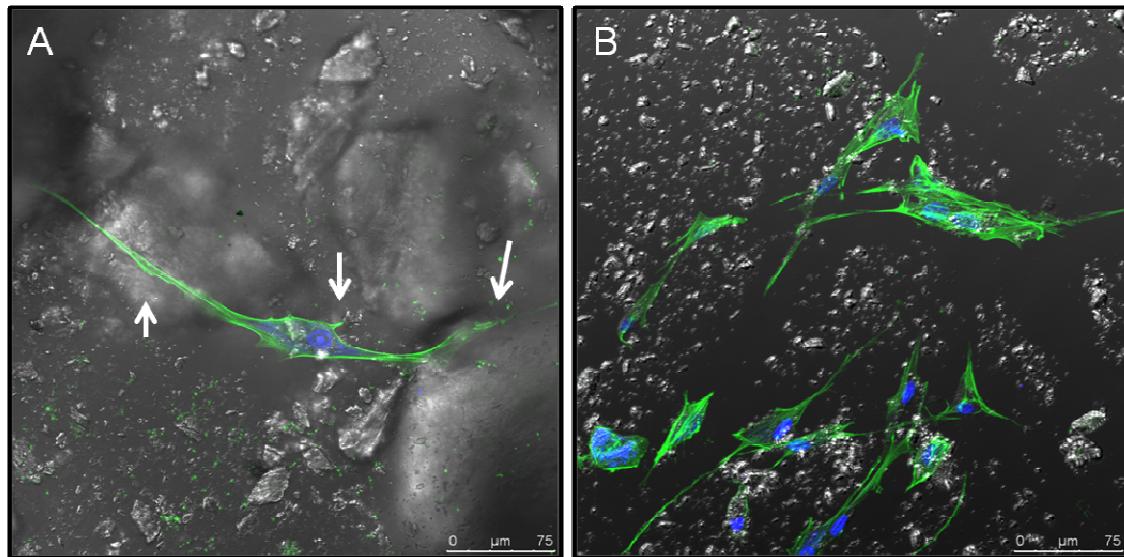


Figura 91. A) Se aprecia el relieve de los gránulos de HA, de color blanco, y como una célula se ancla a ellos, flechas blancas. B) Las células, en la matriz, emiten prolongaciones con las que se relacionan con ella.

7. RESULTADOS “IN VIVO” EN EL MODELO ANIMAL.

7.1. De la cirugía de implantación.

Se operaron 7 animales de experimentación, provocando un total de 28 lesiones femorales, de estos 1 murió en el postoperatorio, otro sufrió la fractura de un fémur, curando con pseudoartrosis, por lo que las 2 lesiones de ese fémur se excluyeron del estudio, (Figura 92), los otros 5 especímenes evolucionaron satisfactoriamente.

El resultado fue que se obtuvieron 22 lesiones aptas para el estudio, su distribución fue de:

5 lesiones tratadas con implantes de ADSC_s diferenciadas osteogénicas + matriz de HA/fibrina.

6 lesiones tratadas con ADSC_s indiferenciadas + matriz de HA/fibrina.

6 lesiones tratadas con relleno de hueso autólogo triturado.

5 lesiones que se dejaron sin tratamiento.

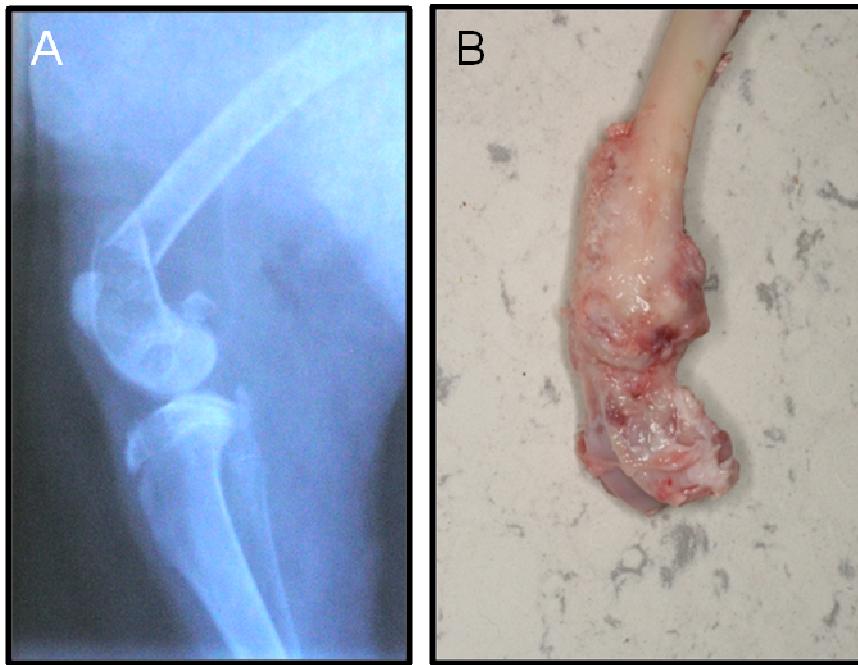


Figura 92. A) Rx de fémur con una fractura completa por trefina a nivel de la lesión proximal. B) A los 30 días se observa un gran callo de fractura, con pseudoartrosis. La pieza se desechó para el estudio.

Las células de 3 constructos, uno de $ADSC_s$ diferenciadas y 2 de $ADSC_s$ indiferenciadas se expandieron, en la matriz ya constituida, según el procedimiento 1.

Las células de los otros 8 implantes celulares se expandieron y diferenciaron en placa de cultivo y unas horas antes de la cirugía, tras varias series de lavados con PBS, se sembraron en la matriz según el procedimiento 2.

Para la realización de la cirugía los constructos se retiraron del incubador y se llevaron al quirófano, se realizaron las intervenciones y se guardaron restos de los constructos, después estos restos se volvieron a colocar en el incubador. Los

constructos con las células estuvieron en condiciones ambientales varias horas, por este motivo al día siguiente de las cirugías se procedió a la comprobación de la viabilidad de las células en los restos de los implantes.

7.2. Comprobación de la viabilidad celular en los implantes.

Tras realizar la cirugía se tomaron los restos de los constructos y se colocaron en placas de cultivo nuevas, se deshizo la matriz, frotando contra la placa, y se añadió medio de cultivo. Al cabo de unos días se observó que aparecían células pegadas a la placa y a los restos de la matriz, señal inequívoca de que había células vitales y con capacidad de proliferación en los restos de la matriz. (Figura 93).

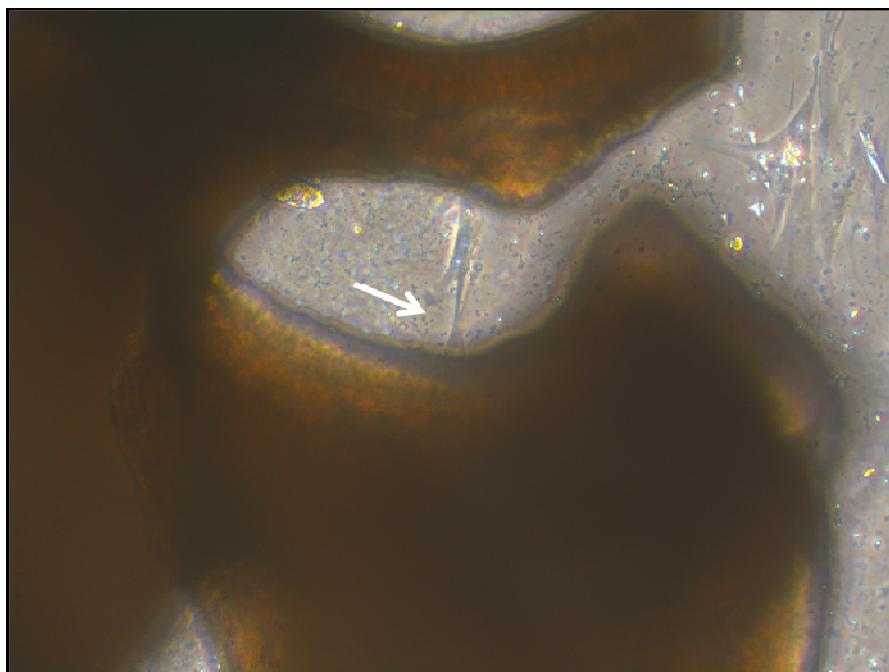


Figura 93. Se observan varias ADSCs entre los restos de la matriz, la fibrina esta degradada viéndose como un punteado. La flecha blanca señala una célula que contacta con la hidroxiapatita.

Como resultado extraordinario, en un caso donde tras la cirugía los restos del constructo fueron sometidos a calor, tardando más de 8 horas en devolverlos al incubador, se observó conservación de la vitalidad de las células, pero estas tendieron a unirse de forma semejante a un sincitio por fusión celular. (Figura 94).

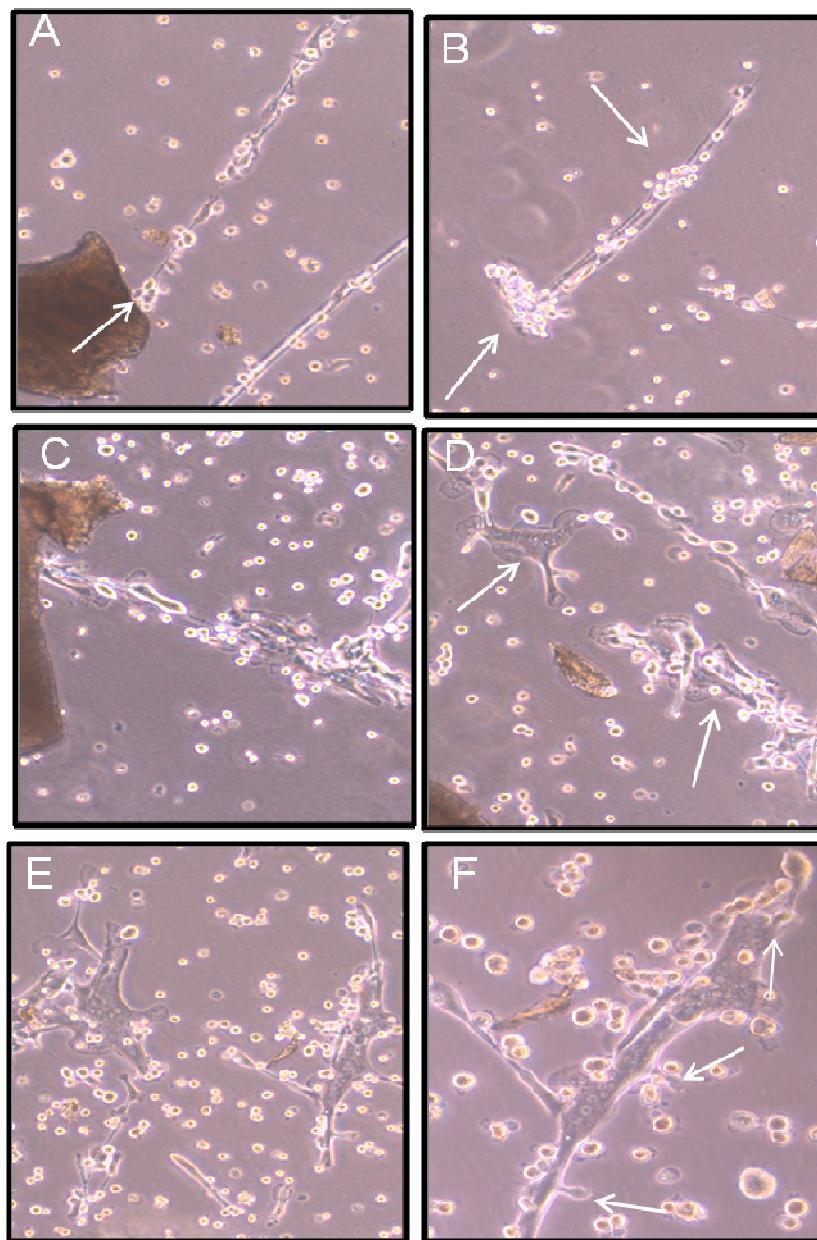


Figura 94. A) Células flotando, células adheridas y células, flecha blanca, que forman un agregado. B) Flechas blancas, las células forman un agregado y se adhieren a la placa. C) Células adheridas juntas a la placa. D) Flechas, células que parece que fusionan sus citoplasmas. E) Las células fusionadas parecen células gigantes. F) Célula gigante con células que parece se están fusionando a ella, flechas.

7.3. Análisis radiológico.

Se realizó estudio radiográfico de 12 femures, 6 animales, inmediatamente después de finalizar la cirugía y a los 30 días de esta, tras sacrificar al animal. Las imágenes fueron evaluados radiológicamente por el mismo observador. Dos de las radiografías se excluyeron del estudio por presentar, en una placa, una fractura y en la 2º radiografía un gran callo de fractura y pseudoartrosis. (Figura 95).

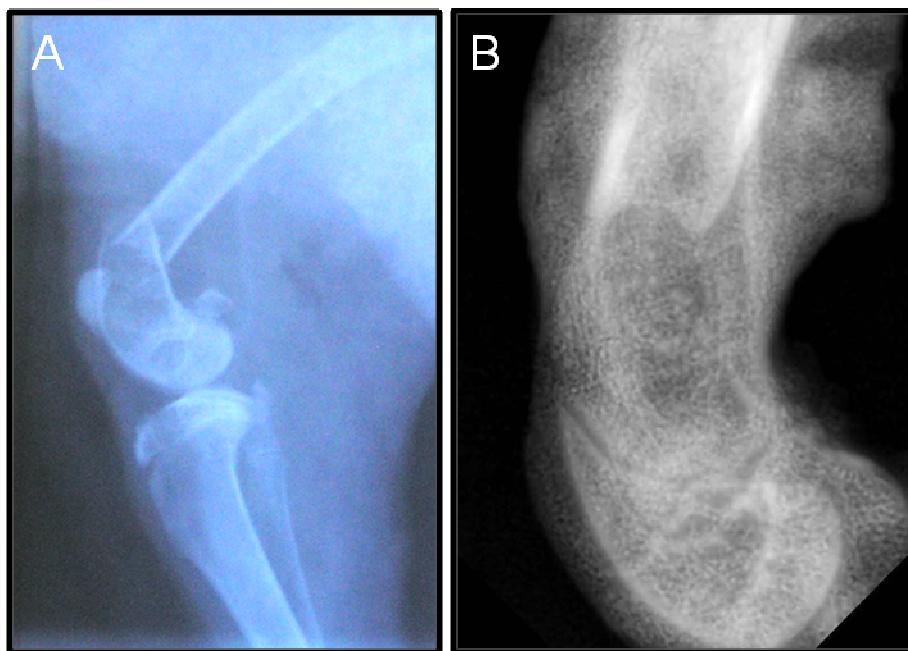


Figura 95. A) Rx tras la cirugía, se aprecia una fractura femoral. B) Rx a los 30 días, tras el sacrificio del animal, se ve un callo de fractura hipertrófico, se constato que se había producido una pseudoartrosis.

22 radiografías se consideraron aptas para el estudio, 11 correspondían al momento de la cirugía y otras 11 a los 30 días de esta.

Se evaluó si había diferencia significativa entre las imágenes radiológicas de la misma lesión el día 1 y el día 30. También se evaluó si había más evidencia radiológica de curación entre los distintos grupos.

En el grupo donde no se trató la lesión no se evidenciaron signos de curación a los 30 días.

En los 2 grupos tratados con los implantes biológicos surgió el problema de la radiopacidad de la hidroxiapatita, la cual impidió observar signos claros de curación, tanto en el tiempo como entre los 2 grupos.

En el grupo tratado con hueso autólogo triturado hubo pocas o nulas evidencias radiológicas de curación. (Figuras 96. 97 y 98).

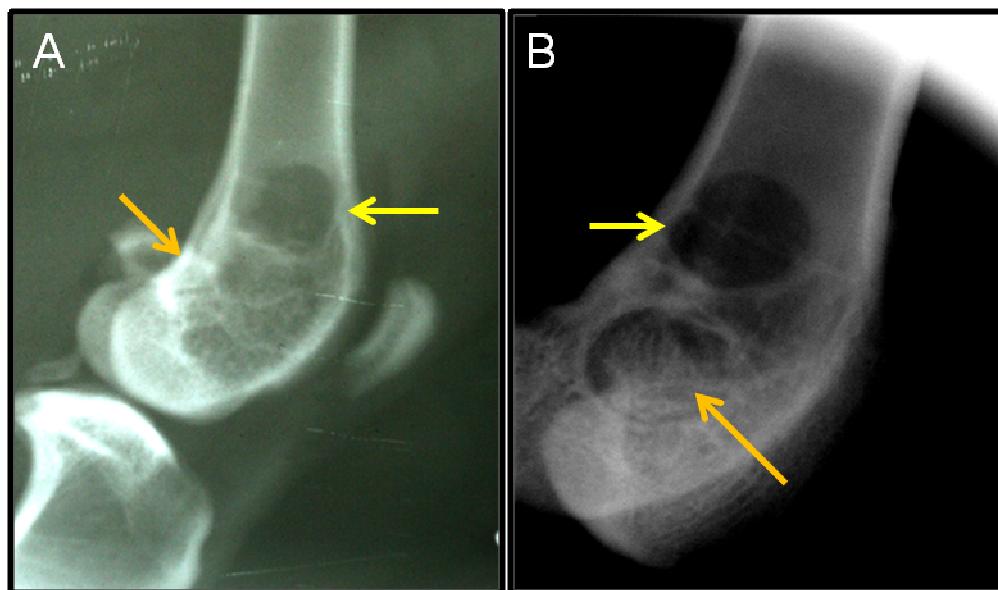


Figura 96. A) Rx tras la cirugía. B) Rx a los 30 días. Las flechas amarillas indican una lesión que se dejó sin tratamiento. Las flechas naranjas señalan una lesión tratada con HA/Fibrina + ADSC indiferenciadas. La proyección de las 2 Rx es diferente con lo cual se aprecia el efecto de desplazamiento del objeto en la visualización del constructo.

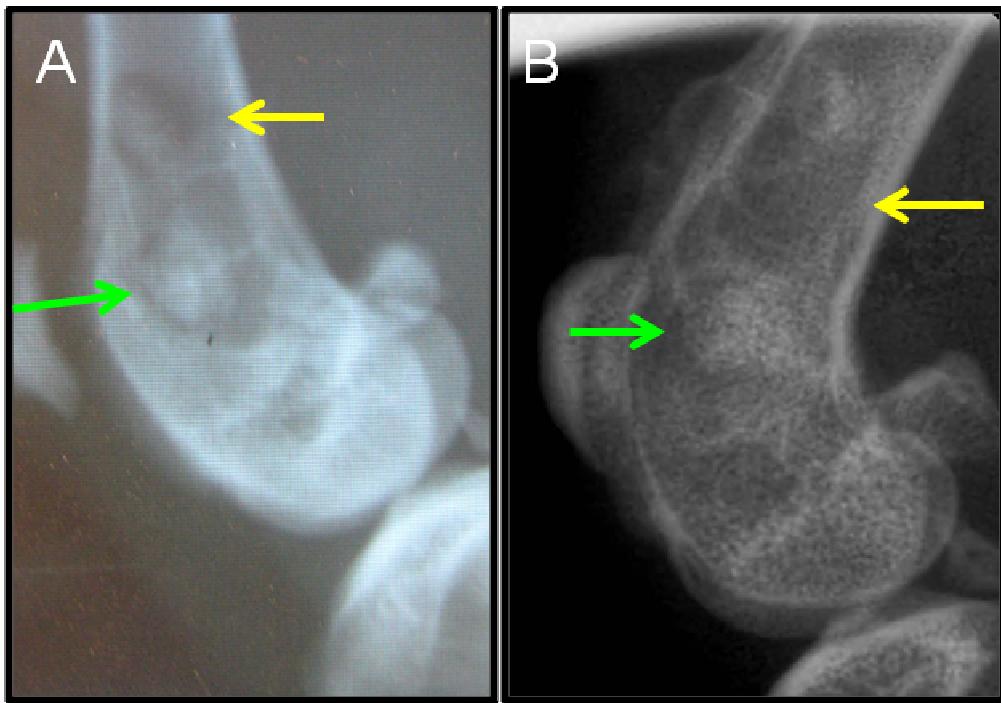


Figura 97. A) Rx el día 1. B) Rx el día 30. Flechas amarillas implante con $ADSC_s$ indiferenciadas. Flechas verdes implante con $ADSC_s$ diferenciadas. Se aprecia el desplazamiento del objeto por ser distinta la proyección radiológica al hacer cada radiografía.

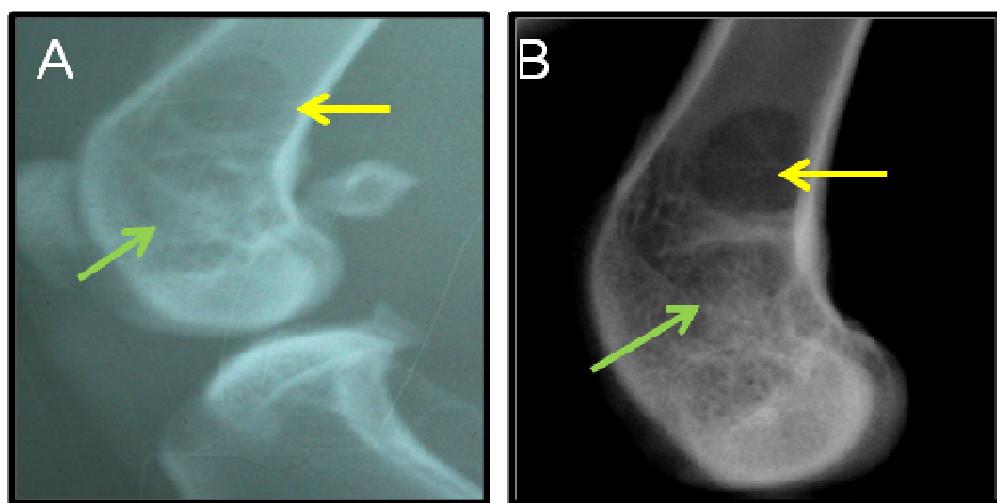


Figura 98. A) Rx el día 1. B) Rx el día 30. Las flechas amarillas señalan una lesión tratada con hueso autólogo. Las flechas verdes señalan una lesión tratada con implante de células diferenciadas osteogénicas.

7.4. Estudio histológico.

Se realizó el estudio histológico de las muestras obtenidas de los bloques conteniendo los distintos tipos de tratamientos efectuados en las lesiones. La obtención de los bloques se realizó por observación visual directa de los femures, tras la extirpación de las partes blandas. Con frecuencia se observó una fina membrana blanca que recubría las zonas lesionadas, esta se ha teñido con tinta china para orientar los cortes histológicos. (Figura 99).



Figura 99. Aspecto de tres fémures después de extirpar las partes blandas. Se aprecia, a simple vista, donde se realizaron las lesiones.

En todos los casos, tras la fijación y la obtención de los cortes histológicos, se realizó tinción con hemtoxilina y eosina. Se realizaron, mediante observación en microscopio óptico, dos tipos de análisis:

7.4.1. Análisis histológico comparativo.

En el grupo de lesiones que se dejaron sin tratamiento se encontró una reacción fibrosa cicatricial, en ocasiones desbordando los margenes de la herida, y no se observaron signos de regeneración ósea. (Figura 100).

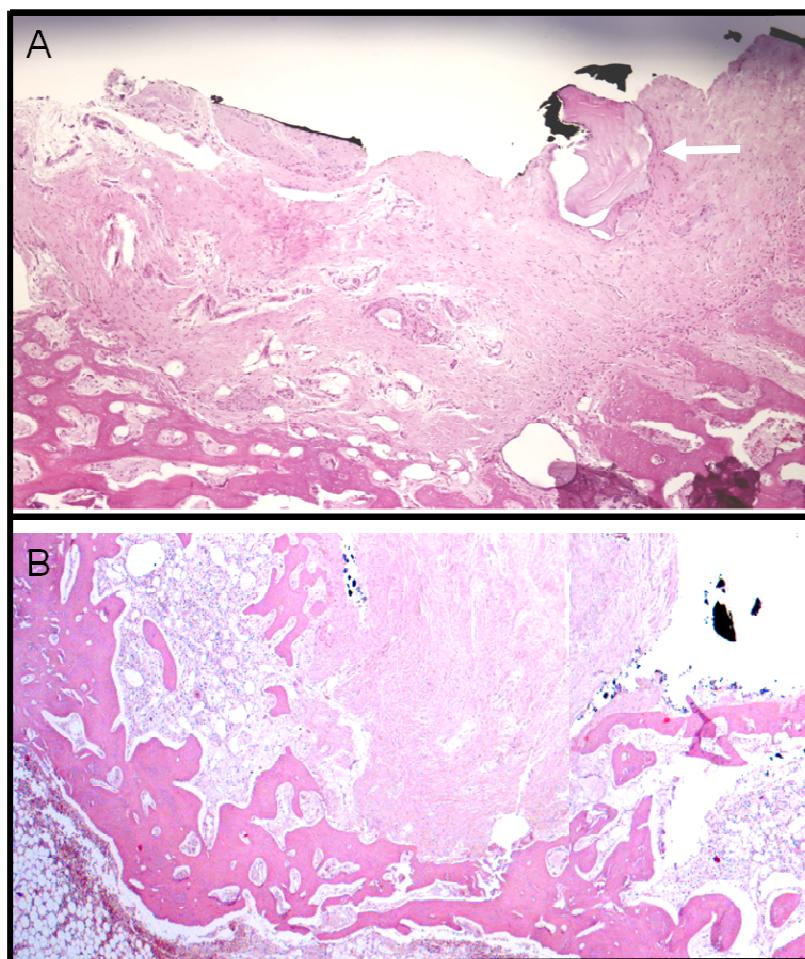


Figura 100. A) Reacción fibrosa en una lesión sin tratamiento. La flecha señala un resto de biomaterial que contaminó desde la lesión adyacente. B) La reacción fibrosa cicatricial desborda los límites de la lesión. No se aprecia ningún signo de regeneración ósea reactiva.

En los 2 grupos tratados con matriz y células, a la observación microscópica, no se apreció ninguna diferencia entre ellos.

En los 2 primeros casos, en los cuales se expandieron y se diferenciaron las células en la matriz por procedimiento 1, apenas se encontraron signos de regeneración ósea, apareciendo un infiltrado inflamatorio crónico con presencia de células gigantes multinucleadas. (Figura 101).

En los cuatro casos restantes se realizó la preparación del constructo por el procedimiento 2, en estos se encontraron signos de regeneración ósea y una disminución considerable de la reacción inflamatoria. (Figuras 102 y 103). Mediante la visión microscópica fue imposible distinguir los casos tratados con células indiferenciadas de los tratados con células diferenciadas hacia linaje óseo.

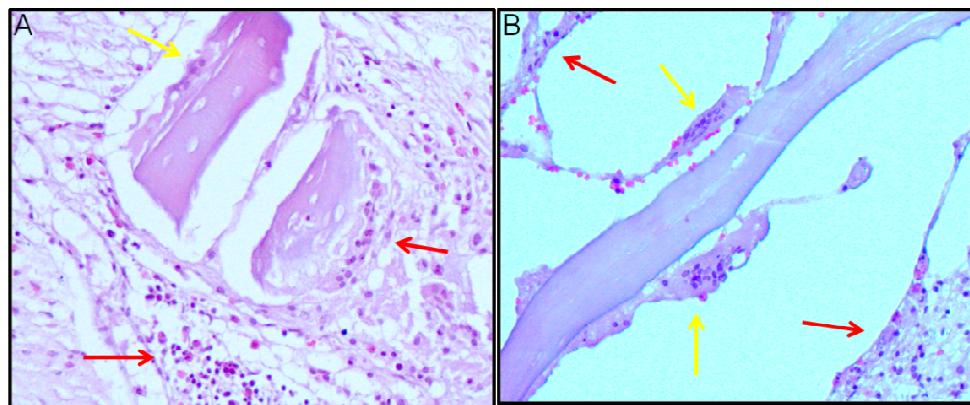


Figura 101. Constructo de células indiferenciadas, formado por el procedimiento 1. A) 2 partículas del biomaterial y componente inflamatorio crónico. No se aprecia ningún signo de regeneración. B) Detalle de una partícula de biomaterial con células gigantes multinucleadas adheridas. Las flechas rojas indican el infiltrado inflamatorio y las flechas amarillas señalan las células gigantes multinucleadas. Al realizar la preparación se ha desprendido el tejido de las partículas, por este motivo aparecen separadas del tejido.

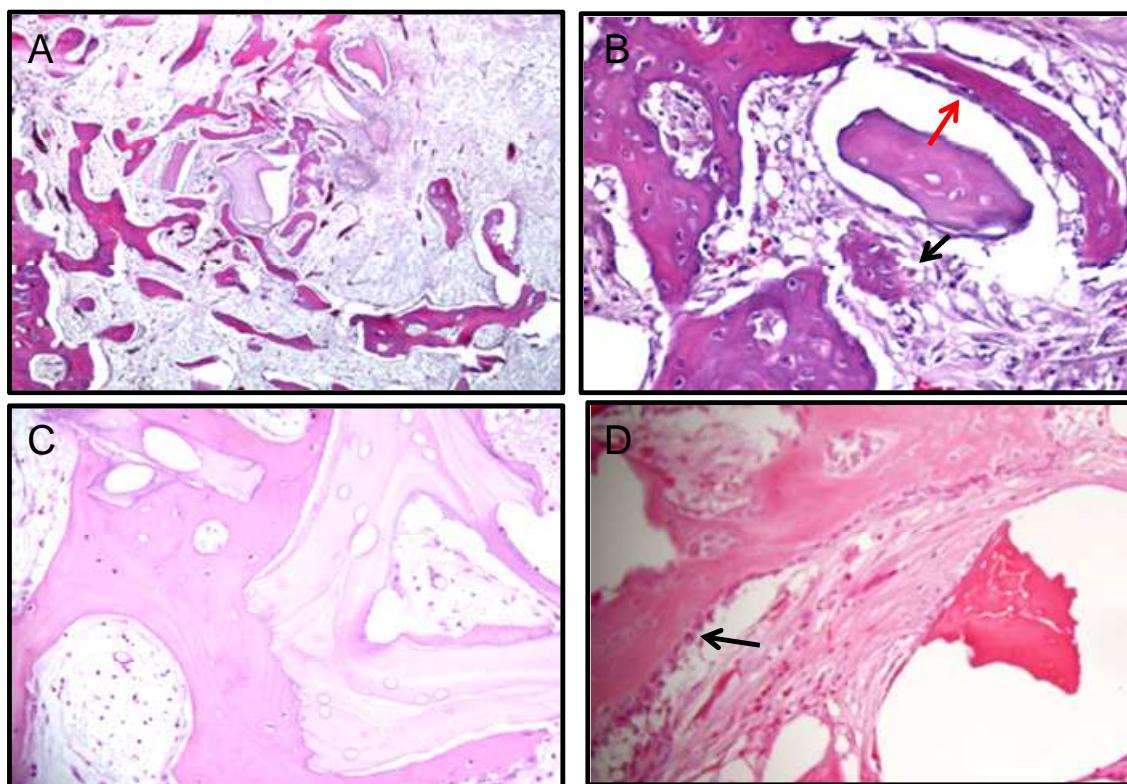


Figura 102. Cortes histológicos de lesiones tratadas con constructos con células diferenciadas. A) Entre las partículas del biomaterial hay trabéculas óseas neoformadas. B) Partícula de HA rodeada de hueso neoformado, la flecha roja señala una célula gigante multinucleada. La flecha negra muestra un osteoblasto a punto de transformarse en un osteocito en una laminilla de hueso inmaduro con gran celularidad, todo esto es señal de gran actividad osteoformadora. C) HA rodeada de hueso neoformado, este adquiere las formas anguladas de la HA, signo típico de hueso formado por osteoconducción. D) Junto a la HA se ve una trabécula con un frente de osteoblastos activados, hecho que se aprecia por su forma cuboidea, flecha negra

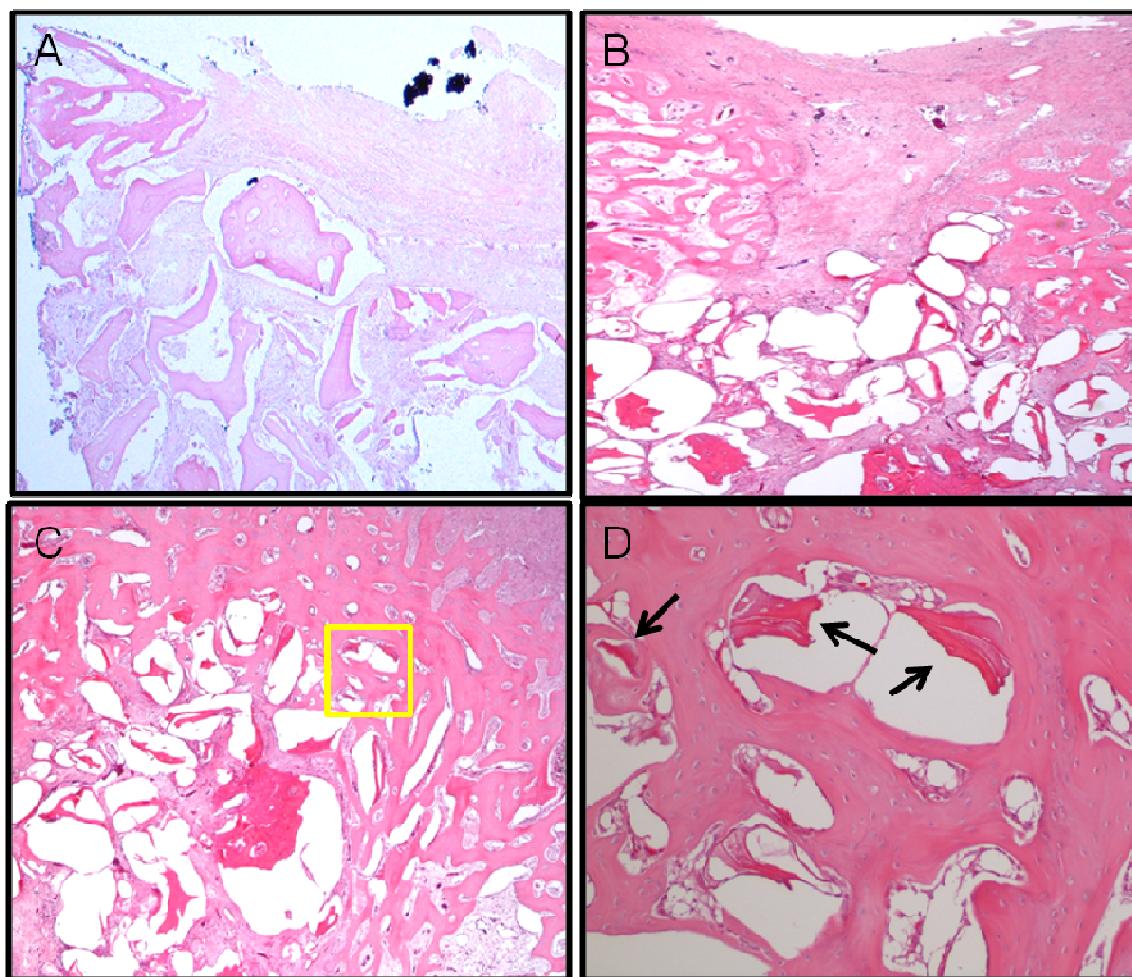


Figura 103. Cortes histológicos de lesiones tratadas con constructos de células indiferenciadas. A) Las partículas de HA no están rodeadas de hueso, se ve hueso nuevo en los bordes de la lesión. B) Se ve mayor formación de hueso reactivo en los bordes, en el centro de la lesión ha quedado una zona de fibrosis. Algunas partículas de HA están rodeadas de hueso. C) Algunas partículas de HA y bastante hueso neoformado. El recuadro amarillo se ve ampliado en D) Se ven tres partículas de Bio-Oss englobadas en el hueso neoformado. Flechas negras

En el grupo tratado con hueso autólogo se encontró una gran regeneración ósea, con una celularidad muy aumentada, evidenciando osteoblastos activos, con morfología cuboidea, también se ha observado como van quedando incluidos en la matriz osteoide. Se encontró, en algunas zonas, bastante hueso de tipo reticular, inmaduro, así como en otras se observó la formación de varias líneas de osificación. Estas zonas se hicieron muy evidentes en la visión con la luz polarizada. (Figura 104).

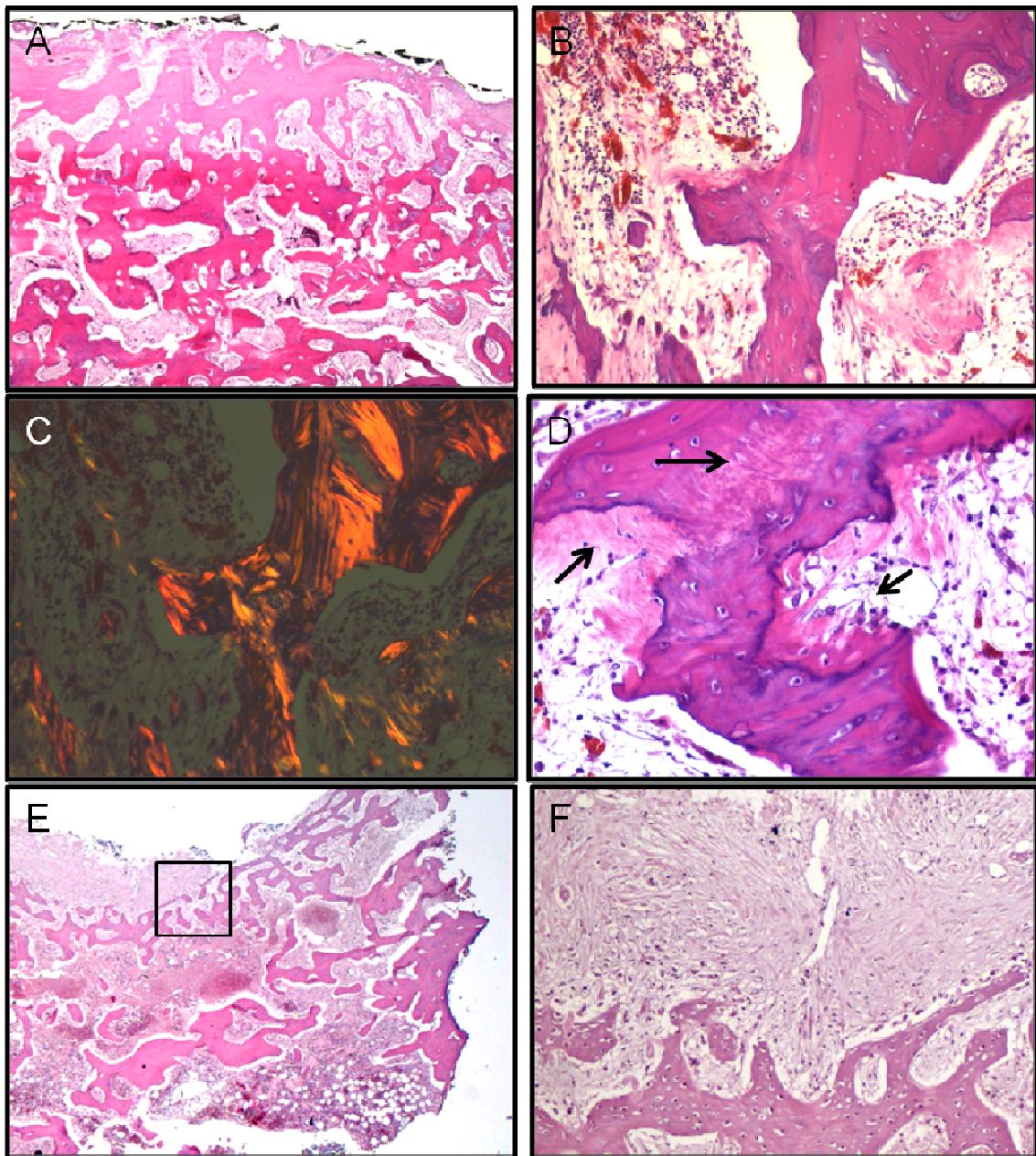


Figura 104. Cortes histológicos de lesiones tratadas con hueso autólogo. A) Se aprecia una gran regeneración ósea, no se distinguen los bordes de la lesión. B) hueso regenerado en varias fases, se observan con nitidez las líneas de aposición ósea. C) La imagen de B vista con luz polarizada, se aprecian zonas con líneas de osificación paralelas, signo de hueso maduro, junto con líneas muy desorganizadas, hueso reticulado, típico del hueso inmaduro neoformado. D) Formación de una laminilla ósea, se aprecian líneas de osificación, osteocitos y zonas de osteoide con células precursoras osteoblásticas y osteoblastos parcialmente incluidos en el osteoide, al que van calcificando, estas zonas están señaladas por las flechas negras. E) Se ha establecido un puente óseo que une los dos borde de la lesión, por encima queda un resto de tejido cicatricial fibroso. F) Se ve en detalle la zona recuadrada en negro en la imagen E. Se aprecia tejido óseo con abundante celularidad y actividad regeneradora, por encima se ve el grosor del resto fibroso.

Tras realizar el análisis histológico comparativo se procedió a realizar:

7.4.2. Análisis histomorfológico.

El análisis histomorfológico se ha llevado a cabo en tres de los cuatro tipos de lesiones, se ha descartado el grupo de las lesiones sin tratamiento por ser muy evidente en el análisis histológico la ausencia de regeneración ósea.

Se ha realizado el recuento de osteocitos y osteoblastos en: 5 lesiones tratadas con constructos de ADSCs diferenciadas osteogénicas; 6 lesiones tratadas con hueso autólogo triturado y 6 lesiones tratadas con constructos con ADSCs indiferenciadas. El recuento del número de células óseas se realizó en un área de 1,57 mm². Se eligieron estas áreas en función de la concentración celular observada, seleccionándose la zona de mayor concentración celular en cada una de las preparaciones. (Figura 105).

El mismo operador seleccionó las áreas y realizó el conteo.

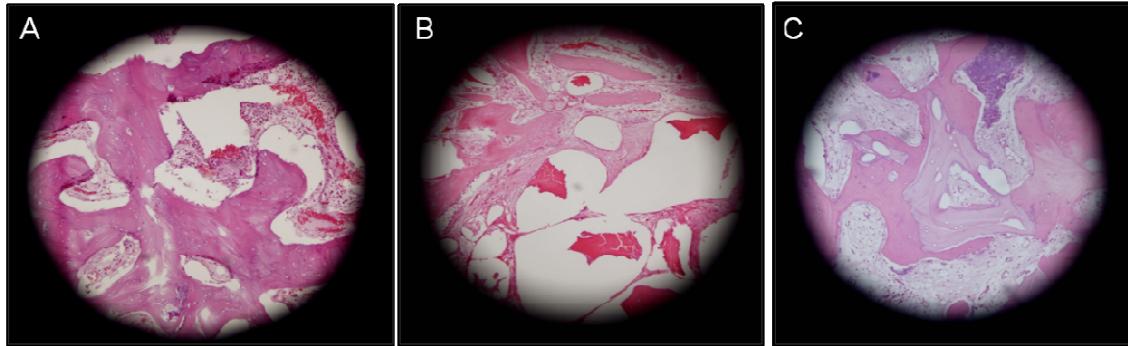


Figura 105. Aspecto a 40 aumentos de 3 áreas de conteo celular. A) Corresponde al grupo de hueso autólogo. B) Se trata de una de las preparaciones del grupo de constructos con ADSCs indiferenciadas. C) Corresponde a un corte histológico de una lesión tratada con un constructo con ADSCs diferenciadas a linaje osteogénico.

Los datos obtenidos en los distintos recuentos fueron tabulados, (tabla 8), y seguidamente se agruparon en una única serie, ordenándolos por rangos, los resultados se tabularon. (Tabla 9)

Se consideró hipótesis nula el que no existía diferencia significativa entre las 3 muestras. Las sumas de los rangos de cada grupo, R_1 , R_2 y R_3 fueron respectivamente, 86, 30 y 37.

GRUPO I	GRUPO 2	GRUPO 3
Hueso autólogo	ADSC Indiferenciadas	ADSC Diferenciadas
493	387	139
467	356	437
625	113	106
393	83	95
459	325	364
547		124

Tabla 8. Los resultados de los distintos recuentos de células óseas en cada grupo. No se incluyó el grupo de sin tratamiento.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
15	10	6
14	8	12
17	4	3
11	1	2
13	7	9
16		5

Tabla 9. Se han ordenado conjuntamente, en una única serie, los rangos de todos los datos obtenidos. Se asignó el rango 1º al valor más pequeño (83) y el rango 17º al valor mayor (625). Aunque se ordenó en conjunto se respetó la pertenencia de cada valor a su grupo correspondiente.

Se aplicó el estadístico del análisis de la varianza de Kruskal-Wallis.

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

Siendo N= nº de rangos.

R= suma rangos de cada grupo.

n= suma elementos de cada grupo

Se ha hallado un valor de H de 12,23, el cual es mayor que 9,21 que es el x^2 al nivel de confianza del 1% para 3-1 grados de libertad. Por consiguiente se consideró que había diferencia significativa entre las 3 muestras. Aplicando la prueba de la U de Mann-Whitney se investigó en que grupo o grupos radicaba la diferencia hallada, los grupos se tiene que comparar por parejas, así se ha comparado el grupo I con el 2, el 1 con el 3 y el 2 con el 3, habiéndose encontrado que esta diferencia significativa entre los grupos es debida al grupo I, los tratados con hueso autólogo.

VI.- DISCUSIÓN

La ingeniería del tejido óseo requiere la combinación de factores osteoinductivos, células osteoprogenitoras, una matriz que de soporte a las células y un adecuado aporte sanguíneo (Vacanti, 2006). Es aquí donde las células troncales pueden jugar un papel fundamental.

1. ADECUACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO DEL MODELO DE EXPERIMENTACIÓN.

En la actualidad el tejido adiposo se encuentra en el punto de mira de los investigadores, debido a que es una fuente de células troncales muy atractiva por:

1) La poca morbilidad que produce su extirpación, la cual se puede realizar bajo anestesia local.

2) Lo sencillo del procedimiento de obtención de sus células estromales, según el protocolo de disgregación enzimática descrito por la Dra. Patricia Zuk en 2001.

3) El buen ratio de células troncales que presenta.

En este trabajo de investigación se ha demostrado que del tejido adiposo de los conejos albinos New Zealand es posible obtener una fracción celular con capacidad de diferenciarse en diversos linajes mesodérmicos y ectodérmicos, de manera similar a lo que acontece con la obtenida del tejido adiposo de diversos mamíferos.

La mayoría de las investigaciones realizadas se han centrado en las células obtenidas de la grasa humana, así Zuk y cols., han empleado lipoaspirados humanos, en 2001 y 2002, para aislar, definir y caracterizar a las células troncales obtenidas de la grasa. En 2003, se ha planteado su utilización en terapia génica, lo que abre una nueva línea en las terapias celulares (Morizono y cols., 2003).

Se ha sugerido y demostrado la pluripotencialidad de estas células (Xu y cols., 2005).

Mitchell y McIntosh, ambos del grupo de investigación del Dr. Gimble, han realizado sendas investigaciones sobre el inmunofenotipo y la inmunogenicidad de las hADSC_s habiendo sido publicados los resultados de ambos trabajos en 2006 en Stem Cells. Recientemente, en 2010, Yu y cols., también perteneciente al grupo del Dr. Gimble, ha presentado sus resultados en la caracterización de estas células mediante análisis de RNA_m y citometría de flujo.

También han sido objeto de investigación las células madre obtenidas de modelo murino, así se comunicó la capacidad de diferenciación neurogénica de las ADSC_s murinas (Safford y cols., 2002; Safford y cols., 2004).

Zheng y cols., en 2006 han investigado sobre la capacidad de diferenciación “*in vitro*” e “*in vivo*” de las células mesenquimales de la grasa de ratón demostrando que “*in vitro*” se diferenciaban fácilmente a linaje cartilaginoso y óseo, pero “*in vivo*” su capacidad para regenerar hueso y músculo era limitada.

Existen numerosos estudios realizados con las células obtenidas de la grasa de diversos mamíferos como el caballo, el perro y el cerdo. Schwars y cols., han publicado 2 estudios en 2011. En uno analizan y comparan la capacidad de proliferación y diferenciación de las células estromales de la grasa en un medio suplementado con SBF y en un medio que contiene el sustituto de SBF UltroserG. En el otro han estudiado la viabilidad celular en una matriz de hidrogel de agarosa diseñada para la implantación “*in vivo*”.

Se ha notificado un estudio comparativo del comportamiento de las ADSC_s y las bMSC_s porcinas obtenidas de 3 cerdos castrados (Kim y cols., 2010).

López-Laguna y cols., en 2011, han marcado con óxido de hierro en nanopartículas las ADSC_s de 10 ovejas de la raza assaf, seguidamente han comprobado su capacidad de diferenciación y posteriormente las han implantado en la tibia siguiéndolas mediante resonancia magnética, han comprobado que las células marcadas se diferenciaban igual que las no marcadas y además se podían rastrear, con resonancia magnética, una vez implantadas.

Se ha comparado la capacidad de diferenciación condrocítica y el fenotipo de las ADSC_s humanas, de oveja y de conejo (Martínez-Lorenzo y cols., 2009).

Respecto a las ADSC_s de conejo, Peptan, Hong y Mao en 2006, de 3 conejos albinos New Zealand obtuvieron tejido adiposo subcutáneo e intraabdominal, aislaron las ADSC_s de las distintas muestras de grasa y las diferenciaron osteogénicamente comparando el grado de diferenciación alcanzado según el origen de la muestra de grasa, concluyeron que las ADSC_s provenientes de grasa intraabdominal alcanzaban mayores niveles de diferenciación osteogénica. Por el contrario, en 2011, se ha comunicado un estudio comparativo entre la capacidad de proliferación y diferenciación de las ADSC_s provenientes de la grasa obtenida en 3 regiones anatómicas diferentes, intraabdominal, interescapular e inguinal subcutánea, de conejos albinos New Zealand, concluyendo que con la grasa subcutánea de la región inguinal se obtiene la mayor tasa de éxito (Chen y cols., 2011).

El conejo también se ha empleado como modelo quirúrgico en terapia con ADSC_s. Pieri y cols., en 2010, han realizado regeneración ósea vertical, de lesiones en la calota, con hidroxiapatita y ADSC_s, en diferentes concentraciones, seguida de la colocación de implantes de titanio y posterior medida del nivel de oseointegración. También se ha comparado, en 12 conejos, la capacidad de curación de lesiones tibiales no tratadas, tratadas con hidroxiapatita, tratadas con ADSC_s y tratadas con

hidroxiapatita y ADSC_s (Girolano y cols., 2011). Los resultados de estos trabajos los contrastaremos con los nuestro más adelante.

El conejo albino New Zealand es un animal relativamente fácil de conseguir a un coste razonable, debido a su tamaño no presenta problemas de manipulación y además posee un tejido adiposo de fácil acceso. Estos datos junto a los que antes hemos citado, para confirmar la obtención de células trocales del tejido adiposo de los mamíferos, validan la adecuación del tejido adiposo de nuestro modelo de experimentación.

2. RENDIMIENTO CELULAR DEL TEJIDO ADIPOSO DE CONEJO.

Hemos observado que el rendimiento, considerado como nº de células por gramo de grasa, que hemos obtenido, por medio de la disgregación enzimática del tejido adiposo de conejo, es inferior a los reportados en la literatura científica.

Esta diferencia pensamos que es debida al momento en que se realiza el recuento, en nuestro caso el recuento se realiza siempre inmediato a la obtención de las células, justo antes de realizar la siembra del cultivo primario.

Otro dato que consideramos muy importante es que en nuestro procedimiento de obtención de las células, eliminamos los adipocitos y lissamos los eritrocitos. Estas células si no se eliminan antes de realizar los recuentos celulares los aumentan de forma notable.

Hemos constatado una gran disparidad en los resultados publicados, tanto en el ratio de células/ unidad de grasa, como en el momento de realizar el contaje. De esta manera en 2001 Zuk y cols., comunicaron la obtención de $2-6 \times 10^8$ células en 300 ml de lipoaspirado humano, lo que equivale a un promedio de $1,3 \times 10^6$ células/ml. En su

procedimiento aplica cloruro amónico para lisar los eritrocitos, pero al día siguiente lava el cultivo primario para eliminarlos, no especifica el momento del recuento ni el nº de lipoaspirados procesados.

De 3 mujeres sometidas a liposucción se comunicó la obtención de un promedio de $12,5 \times 10^6$ cel./300 ml, sin especificar el procedimiento de obtención ni el momento del recuento (Hattori y cols., 2004). Si que especifican el momento del contaje Yu y cols., quienes en 2010 publicaron los resultados obtenidos en una serie de 63 mujeres sometidas a liposucción, comunicando un promedio de $375 \pm 142 \times 10^3$ cel./ml, realizando el recuento celular al 4º día de cultivo.

Cuando la obtención del tejido graso se realiza por medio de lipectomía los resultados en humanos son más homogéneos. En un estudio realizado con una población de 3 pacientes sometidos a lipectomía abdominal, en el cual se correlacionó el rendimiento celular de la grasa con el índice de masa corporal, se obtuvo un valor promedio de $8,6 \pm 1,4 \times 10^4$ cel./gr., el recuento se realizó a las 24 horas de la siembra de las células (Halvorsen y cols., 2001).

En una investigación, sobre la capacidad de las ADSCs humanas de producir sustancia osteoide cuando se implantan en ratones atípicos, se comunicó el rendimiento del lipoaspirado en grs., obteniendo 70×10^3 cel./gr., a las 24 horas de la siembra (Hicok y cols., 2004).

Se ha publicado el rendimiento de 10 muestras, de entre 5 y 10 gr. de grasa obtenida de ovejas assaf adultas, realizando el contaje inmediatamente antes de la siembre del cultivo primario, el valor promedio hallado ha sido de $172 \pm 132 \times 10^3$ cel./gr. (López-Laguna y cols., 2011). En un estudio en 3 especies, 5 conejos, 5 ovejas y 4 humanos, se ha encontrado un rendimiento celular de $0,7 \times 10^6$, $0,39 \times 10^6$ y $0,3 \times 10^6$ cel./gr. grasa, respectivamente. Los autores obtuvieron la grasa, de las

ovejas, de los conejos y de 3 humanos, mediante lipectomía de la almohadilla grasa retrorrotuliana (grasa de Hoffa). La del 4º humano, incluido en el estudio, se obtuvo por lipectomía de la cadera. No se ha especificado el momento del contaje, pudiendo ser este hecho, unido a la diferencia en la cantidad de grasa de conejo utilizada, (retrorrotuliana versus interescapular), en su procedimiento respecto al nuestro, la causa de la discrepancia con nuestros resultados.

En lo que respecta al rendimiento celular, cuando se obtienen las células a partir del cultivo de explantes, no es posible establecer la discusión debido a la ausencia de publicaciones sobre este procedimiento, pensamos que la posible causa es el pobre rendimiento obtenido, en cuanto a rapidez, comparado con el conseguido mediante el procedimiento de disgregación enzimática.

3. PROLIFERACIÓN CELULAR DEL CULTIVO.

Las ADSCs de conejo, sembradas en medio de expansión, proliferan fácilmente, adhiriéndose al sustrato de la placa formando una monocapa.

En ningún caso hemos apreciado la formación de colonias, a diferencia de lo que puede suceder en otras especies como la porcina, modelo en el que, tanto las ADSCs como las bMSCs, se ha visto que proliferan formando colonias, las cuales posteriormente confluyen, siendo más numerosas las formadas por las ADSCs (Kim y cols., 2010). Pensamos que el hecho de no formar colonias nuestros cultivos se debe, por lo menos en parte, a la densidad de siembra y al homogenizar la suspensión celular en el momento de la siembra.

Esta facilidad de proliferación también se ha visto en las células provenientes de otras especies como en la equina, en la cual se ha estudiado la capacidad de proliferación

utilizando medio suplementado con SBF y medio con un sustituto de este (Schwarz y cols., 2011) y en las células obtenidas del tejido adiposo canino, cuando se expanden en un sustrato de hidroxiapatita coralina (Cui y cols., 2007).

El tiempo de duplicación de la población celular, considerado como valor promedio de dos de nuestros cultivos, hallado ha sido de $2,5 \pm 0,4$ días, equivalente a $60 \pm 9,6$ horas, tiempo ligeramente superior al comunicado en 2001 por Halvorsen y cols., quienes encontraron un tiempo de duplicación de entre 45 y 56 horas para ADSC_s humanas cultivadas en medio de expansión, cuando el medio fue suplementado con dexametasona y thiazolidina el tiempo de duplicación aumento hasta 127 horas.

Por otro lado nuestro tiempo coincide con el descrito en la expansión de las ADSC_s de 20 pacientes humanos en los que se realizaron los cultivos con 10 lotes diferentes de SBF y se calculó el tiempo de duplicación desde el pase 1 hasta el pase 13, 165 días, (Zuk y cols., 2001). Se han comunicado tasas de proliferación parecidas en ADSC_s de diferentes especies, en el estudio de Schwarz y cols., comparando la proliferación y la capacidad de diferenciación en cultivos suplementados con SBF o suplementados con UltroserG, un sustitutivo del SBF, se encontró un tiempo de duplicación de la población de ADSC_s de 48 a 68 horas para las de origen canino, de 54 a 65 horas para las porcinas y de 54 a 70 horas para las equinas.

Para las obtenidas del tejido adiposo de oveja se ha comunicado que confluyen en 9 días, con una tasa de expansión media de 4 veces por placa, sembrando a una densidad, en placas de 24 pocillos, ($2 \text{ cm}^2/\text{pocillo}$), de 5×10^3 células por cm^2 (López-Laguna y cols., 2011). También se ha visto, en cultivos llevados hasta el pase 10 que las de origen ovino proliferan más rápido que las humanas y las de conejo hasta el pase 3, igualándose después su tasa de proliferación (Martínez-Lorenzo y cols., 2009).

Cuando reducimos el porcentaje de SBF con el que suplementamos el medio de cultivo hemos encontrado que disminuye la tasa de proliferación, no consiguiendo duplicar la población celular cuando las concentraciones de SBF en el medio de cultivo son del 1,25% y del 2,50%. Si el medio de cultivo lo suplementamos con un 5% de SBF el tiempo de duplicación celular aumenta hasta 4,21 días o lo que es lo mismo a 101 horas.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la capacidad de proliferación de las ADSC_s cuando se expanden en medios en los que se sustituye el SBF por otros suplementos. En 2007 se publicó el primer estudio de la proliferación de ADSC_s en un medio con 3 condiciones de cultivo diferentes:

1^a, el medio se suplementó con 10% de SBF.

2^a, se suplementó con un 10% de suero humano homólogo del grupo AB, AB-HS.

3^a, con un suplemento del 10% de plasma rico en plaquetas, PRP, activado con trombina humana y al que se añadió heparina para evitar la coagulación.

Las células expandidas en AB-HS y en PRP mostraron un mayor ratio de proliferación, en especial las expandidas con PRP, que las expandidas con SBF. No obstante los autores aconsejan el uso del suplemento AB-HS, pues los resultados del PRP pueden estar aumentados por el uso de la heparina y de la trombina (Kocacoemer y cols., 2007).

Por otro lado, en la universidad de Tempere, en Finlandia, se ha llevado a cabo un estudio comparando la proliferación de las ADSC_s humanas cuando se expanden en un medio de cultivo suplementado con suero humano homólogo, alloHS, a unas concentraciones del 5%, 10%, 15% y 20% respectivamente, frente al mismo medio

suplementado con 10% de SBF, encontrando que a los 7 días de cultivo solamente el medio con un 20% de alloHS consiguió un ratio de proliferación comparable al obtenido con el SBF al 10% (Lindroos y cols., 2010).

Las ADSC_s de origen canino y equino proliferan mejor en un medio suplementado con SBF al 10% que en mismo medio suplementado con UltroserG, por el contrario las de origen porcino mostraron el mismo ratio de proliferación con ambos suplementos (Schwarz y cols., 2011).

Nosotros, a la vista de nuestros resultados, hemos considerado que el patrón más predecible para la proliferación de las ADSC_s de conejo es el SBF al 10%. Solamente hemos empleado suero autólogo, sin fines de expansión de la población, en la preparación de los constructos previa a la cirugía.

4. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

Cuando la población celular está en confluencia presenta una citomorfología alargada, similar a la de los fibroblastos, presentando diversas morfologías cuando se encuentran en niveles bajos de confluencia. Los factores que determinan la morfología particular de cada ADSC, en el cultivo en baja confluencia, no son del todo conocidos (Kocacoemer y cols., 2007), aunque pueden responder a variaciones en el entorno celular.

Nosotros hemos comprobado que modificando el sustrato de asiento de las células, como sucede al rayar la placa de cultivo, se influye en la morfología, y en la distribución espacial las células. Este hecho ha sido recientemente confirmado, en 2012, por las investigaciones de Abdul Kafi y cols., sobre la adhesión y proliferación celulares sobre 3 distintos sustratos artificiales. También la modificación del modo de

adhesión al sustrato puede iniciar diversas vías de señalización (Zhong y Rescorla, 2012).

Todas las ADSC_s de conejo presentan unos rasgos morfológicos comunes como son el poder emitir prolongaciones transitorias de la membrana plasmática, el mostrar unos nucléolos muy marcados en diferentes momentos del ciclo celular, el encontrar un porcentaje significativo de células binucleadas y el concentrar los orgánulos celulares agrupados alrededor del núcleo, resultados que están de acuerdo con los que mostraron Roura y cols., en 2006.

Sin embargo en nuestro estudio un grupo de células, con morfología redondeada, sufre mínimas modificaciones en su forma durante las distintas circunstancias del cultivo, este hecho junto a la observación mediante microscopia de intervalos del desplazamiento que sufren los núcleos de estas células, puede sugerir que en el cultivo no se tenga una población celular homogénea, hecho que también han sugerido Prunet-Marcassus y cols., en 2006.

También hemos constatado que las modificaciones extremas del medio ambiente del cultivo, como por ejemplo su sobreestimulación, pueden originar cambios en la citomorfología como ya describieron Kocacoemer y cols., en ADSC_s humanas en cuyo medio de cultivo se habían añadido heparina y trombina humanas (Kocacoemer y cols., 2007).

En nuestro trabajo, a partir de las observaciones microscópicas, hemos clasificado las formas que adoptan las células, en cultivo a baja confluencia, en 5 formas básicas definidas: triangulares; cilíndricas o rectangulares; en C; redondeadas y tripolares. En lo referente a la morfología de las ADSC_s, en los cultivos estáticos, no hemos encontrado un estudio detallado de las variaciones morfológicas, si hemos encontrado pequeñas descripciones morfológicas, como en el estudio de Kocacoemer y cols., en

2007, sobre la sustitución del SBF como suplemento del cultivo, en el cual describen formas redondeadas y en huso. Se concreta, un poco más, en las morfologías de estas células en el trabajo sobre el marcaje celular para seguimiento con resonancia nuclear, llevado a cabo en 2011 por López-Laguna y cols., en el cual se describen formas bipolares, tripolares y redondeadas. No obstante en la observación de las imágenes y videos que acompañan a diferentes publicaciones hemos comprobado la presencia de las formas morfológicas descritas por nosotros (Mizuno, 2003; Kocacoemer y cols., 2007; Lindroos y cols., 2010; López-Laguna y cols., 2011).

5.- FENOTIPADO DE LAS ADSC_s.

Respecto a la identificación de esta población celular mediante marcadores de superficie, fenotipado, a pesar de que todavía no se ha encontrado un marcador específico definitivos que permita identificar a una célula como célula troncal mesenquimal (Lin y cols., 2010), sí que existe consenso entre los investigadores sobre los prerrequisitos fenotípicos mínimos que deben de darse en las células troncales mesenquimales humanas. Estos comprenden la expresión de los marcadores CD73, CD90, CD105, la ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 y la no expresión del HLA-DR y de CD117 ó c-kit (Dominici y cols., 2006).

En el presente trabajo, se ha procedido al fenotipado en los pases 4, 5 y 10, de las ADSC_s de 3 conejos.

El nivel de expresión del CD13, aminopeptidasa, hallado en nuestras células está en ratios comparables a los encontrados en ADSC_s humanas, en las cuales aumenta desde un 79% de positivos en el pase 1 hasta valores cercanos al 96% en el pase 5 (Mitchell y cols., 2006). También coincidimos con lo reportado en los marcadores CD14 y CD19, tanto nuestras células mesenquimales del tejido adiposo de conejo como del de humano son negativas para el CD14 y el CD19 (McIntosh y cols., 2006).

El CD31 es un marcador de células endoteliales que también se encuentra en las plaquetas, y que no se expresa en ADSC_s humanas, ovinas y de conejo (Zuk y cols., 2002; Martínez-Lorenzo y cols., 2009). No obstante Mitchell comunica que en la fracción vasculoestromal y en el pase 1 hasta un 20% de ADSC_s humanas lo expresan para después negativizarse, volviendo a expresarse, hasta un 20%, en el pase 5. En nuestras células se ha expresado en un 60%, pensamos que esto puede ser debido a la presencia de células endoteliales en el cultivo o bien a que se haya producido diferenciación celular espontánea hacia linaje endotelial, hechos que han sido descritos por Planat-Benard y cols., en cultivos semisólidos (Planat-Benard y cols., 2004).

Nuestras células apenas han expresado, menos del 5 %, el marcador de superficie CD 34, este se ha considerado un marcador fiable de los precursores de los tejidos hematopoyéticos y vasculares, así como una importante molécula de adhesión, no obstante se sabe poco sobre su función exacta. Nuestro resultado está en concordancia con lo comunicado para las mesenquimales de origen humano, en células mesenquimales humanas se ha descrito que se expresa en pasos tempranos del cultivo para desaparecer su expresión a partir del pase 3 (Glimbe y cols., 2007). Su expresión se ha reportado con gran variabilidad, expresándose en las células del cultivo primario y no en pasos posteriores (Varma y cols., 2007). Se ha descrito la existencia de variaciones en el fenotipo de las células mesenquimales en función de la especie estudiada (Peister y cols., 2004). Así Peister y cols., comunicaron que las MSC de 5 cepas de ratón expresaban CD34, Sca-1 y VCAM-1 (CD106), mientras que las humanas y las de rata no los expresaban. En otro trabajo tampoco se expresa, coincidiendo con nosotros, el CD34 en las ADSC_s humanas, ovinas y de conejo (Martínez-Lorenzo y cols., 2009).

El marcador CD45 se considera un marcador hematopoyético, en nuestro estudio más del 91% de las células fueron CD 45⁺, dato que coincide con prácticamente la totalidad de los autores (Zuk y cols., 2002; Lee y cols., 2004; McIntosh y cols., 2006).

Nuestro resultado en la expresión del CD73 es discordante con todas las comunicaciones, así su expresión se notifica muy positiva en las mesenquimales humanas, mientras que en otras especies, como oveja y conejo, su expresión se ha encontrado claramente negativa, por debajo de 5,5% y del 2% respectivamente (Martínez-Lorenzo y cols., 2009).

Nuestro resultado del 32% difiere claramente del 2% comunicado por Martínez-Lorenzo y cols., para las mesenquimales de conejo. Pensamos, como comentamos anteriormente que la discrepancia puede ser debida al distinto volumen y localización del tejido adiposo del que se han obtenido las células, esta misma argumentación justificaría el hecho de que, los citados autores, encuentren solo un 40% de células CD90⁺ en las ADSCs de conejo.

Respecto al CD 90, marcador de diversos tipos de células, entre ellas las trocales mesenquimales, coincidimos con la expresión unánime de su positividad en las células mesenquimales, tanto derivadas de la grasa como de la médula ósea, unanimidad que es semejante a la comunicada para la negatividad del marcador hematopoyético CD 45 de todas las especies revisadas (Zuk, 2002; Peister, 2004; Lee, 2004; Mitchell, 2006).

También hemos encontrado concordancia entre nuestros resultados y los notificados en mesenquimales humanas respecto a la negatividad del marcador HLA-DR, lo que sugiere que estas células no tiene capacidad antigénica, dato a tener en cuenta a la hora de poder realizar injertos heterólogos (Schäffler y Büchler, 2007)

En lo que concierne a otro antígeno leucocitario de histocompatibilidad, el HLA-AB, McIntosh y cols., comunicaron, en 2006, que las ADSC_s humanas son positivas, por encima del 90%, en todos los pases, nosotros lo hemos encontrado positivo en la mitad de las células mesenquimales de la grasa de conejo, atribuyendo esta diferencia a la variabilidad entre especies.

El CD105 o endoglina, es una glicoproteína de membrana que es componente del receptor del TGF_β que, para la mayoría de los autores, se expresa en un alto porcentaje de las células mesenquimales humanas (Zuk y cols., 2002; Bieback y cols., 2008; Maumus y cols., 2011);, y para otros autores se expresa de forma variable, oscilando entre el 42% y el 70% de positivos (Mitchell y cols., 2006). El nivel de expresión encontrado por nosotros, 26% de positivos, está en concordancia con lo obtenidos por Martínez-Lorenzo y cols., en conejo y oveja, con la salvedad de que en nuestro caso la citometría indica que casi toda la población lo expresa pero solamente el 26% lo expresa por encima del grupo control, este hecho podría sugerir la existencia de dos poblaciones celulares.

Expresiones muy variables se ha encontrado en el CD116, el cual es expresado por las células mesenquimales ovinas y humanas por encima del 70% y 90% respectivamente mientras que en nuestro trabajo lo han expresado menos del 1% de las células, dato que coincide con lo reportado por Martínez-Lorenzo y cols., para las ADSC_s de conejo.

El c-kit lo hemos analizado mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta con las células fijadas sobre la placa de cultivo. Este marcador es un receptor transmembrana del SCF que es expresado por las células troncales hematopoyéticas, las células pluripotenciales y las células intersticiales de Cajal entre otras (Junquera y cols., 2007). Apenas se ha expresado en las mesenquimales del conejo, dato que

coincide con lo publicado en la literatura científica. No obstante se expresan, por encima del 80%, en las mesenquimales ovinas (Martínes-Lorenzo y cols., 2009).

Todos estos datos no llevan a pensar que existe una gran variabilidad en el nivel de expresión de los marcadores de superficie, entre distintas especies e incluso dentro de una misma especie, según lo expandida que haya sido la población celular o la zona de obtención de la grasa (Bieback y cols., 2008). Incluso, a la vista de los resultados respecto al CD31, al HLA-AB y a la Endoglina, no deberíamos descartar la existencia de más de una población celular en nuestro cultivo, como han sugerido algunos autores (Planat-Benard y cols., 2004; Roobrouck y cols., 2008). Estas poblaciones celulares provendrían de los tejidos vasculares y de los restos de sangre presentes en la grasa.

6. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN.

Las células mesenquimales obtenidas del tejido adiposo, al igual que las obtenidas de la médula ósea (Pittenger y cols., 1999), pueden diferenciarse *“in vitro”* en múltiples tipos celulares mesodérmicos, como adipocitos, condrocitos, osteocitos y miocitos (Gimble y Guilak, 2003).

Se ha publicado que los cultivos de ADSC_s, bajo condiciones específicas, son capaces de cruzar la línea germinal del mesodermo y diferenciarse a células de tipo neural (Kang y cols., 2004) y epiteliales (Trottier y cols., 2008), propias de la capa embrionaria del ectodermo. No obstante, como vamos a discutir seguidamente, hay autores, como Phinney y Prockop que dudan de esta supuesta pluripotencialidad, atribuyendo la supuesta pluripotencialidad a errores en la evaluación de las diversas series de proteínas reguladoras que expresan las células mesenquimales (Phinney y Prockop, 2007).

6.1. Diferenciación osteogénica.

Desde los estudios de Pittenger y cols., sobre la diferenciación de las células mesenquimales adultas, se acepta que la adición al medio de cultivo de suplementos, necesarios para la formación y la mineralización de la matriz extracelular ósea “*in vivo*”, como el ácido ascórbico y la 1, 25, dihidroxcolecalciferol junto a una fuente de fosfatos orgánicos como el glicerofosfato- β produce la diferenciación de las células hacia osteoblastos, expresándose esta diferenciación con la formación de hidroxiapatita (Pittenger y cols., 1999).

Se han comunicado otras sustancias que inducen esta diferenciación, así Cheng y cols., en 1994, diferenciaron células estromales obtenidas de la médula ósea humana hacia osteoblastos suplementando el medio con dexametasona. También Na y cols., en 2007, suplementando un cultivo de ADSC_s de conejo con BMP₂ lograron su diferenciación a osteoblastos. Por el contrario Zuk y cols., en 2011, demostraron que la BMP₂ no influye en el grado de diferenciación osteogénica de las ADSC_s humanas.

En nuestro trabajo hemos conseguido la diferenciación osteogénica mediante la adición al medio de cultivo de dexametasona, ascorbato-fosfato, 1, 25, dihidroxcolecalciferol y glicerofosfato- β , la elección de estos suplementos se ha debido al hecho de ser los que mejores resultados obtienen en la diferenciación de células mesenquimales de distintos orígenes y de distintas especies según la revisión publicada en 2007 por Duplomb y cols., en *Stem Cells*.

La diferenciación temprana de estas células hacia osteoblastos inmaduros se caracteriza por la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, esta es frecuentemente usada, junto con la expresión de otros marcadores específicos osteogénicos, como indicador de osteogénesis. (Zuk y cols., 2001). En nuestro estudio, la actividad de la

ALF se ha comprobado mediante la prueba citoquímica de la tinción de los naftoles con Fast Blue B Salt.

La capacidad de mineralización de la matriz extracelular por los osteoblastos se puede evaluar “*in vitro*” mediante la tinción de Von Kossa o mediante la tinción con rojo alizarina (Duplomb y cols., 2007). Nosotros hemos comprobado, mediante las pruebas anteriormente citadas que las ADSCs de conejo diferenciadas a linaje óseo expresan fosfatasa alcalina y forman una matriz extracelular con depósito de sales cárnicas, hechos que siguiendo a Zuk y cols., en 2001, sugieren la diferenciación osteoblástica.

Los principales factores de transcripción que intervienen en el proceso de osteogénesis son Osterix (Cao y cols., 2005) y Cbfa-1, también llamado Runx₂, el cual activa al gen promotor de la osteocalcina y regula la expresión de la mayoría de los genes de las proteínas constitutivas de la matriz ósea, como la sialoproteína ósea, la osteopontina y el colágeno tipo I (Komori, 2008).

Nosotros mediante RT-PCR hemos detectado, en las células diferenciadas osteogénicamente, la presencia de los RNA_m de la osteonectina y del factor de transcripción Runx₂, lo que implica que sus genes se están expresando. No obstante la presencia del RNA_m no implica que se produzca necesariamente la diferenciación (Phinney y Prockop, 2007), pero sí que es un dato relevante si se considera junto a los citados anteriormente.

Así podemos afirmar con seguridad que hemos logrado la diferenciación osteogénica de nuestras células, pues estas presentan actividad de la ALP, expresan los genes del factor de transcripción Runx₂ y de la proteína de la matriz ósea osteonectina y forman una matriz extracelular con evidentes signos de calcificación, como hemos demostrado por las tinciones de Von Kossa y con rojo alizarina. La formación de esta matriz extracelular, con depósitos de hidroxiapatita, ha sido

especialmente evidente en la técnica, desarrollada por nosotros, de diferenciación en bola.

En nuestro trabajo el grado de diferenciación observado así como el tiempo necesario para conseguirlo ha sido similar al comunicado para las ADSC_s humanas. Estas expresan claramente calcificación a los 21 días de comenzar la diferenciación (Zuk y cols., 2001).

Hicok y cols., en 2004, estudiaron el grado de diferenciación osteocítica, en ADSC_s humanas, los días 7, 14 y 21 comprobando que ya el día 7 se expresaba ALP y al 14 comenzaba la mineralización de la matriz extracelular siendo muy evidente el día 21. En células porcinas Kim y cols., llevaron la diferenciación hasta el día 28, encontrando una matriz ya mineralizada a partir del día 21. Schwarz y cols., han comunicado ratios de diferenciación similares, en ADSC_s caninas y equinas, cuando se diferencian en un ambiente a 37°C o a T° ambiente.

6. 2.- Diferenciación condrogénica.

La diferenciación de las células mesenquimales al linaje condrogénico se realiza por la adición al medio de cultivo de varios factores solubles, como son el TGFβ, las BMP_s, la dexametasona y el IGF-I, existe controversia respecto a sus distintas combinaciones, así se ha demostrado la sinergia en la diferenciación condrogénica de la mezcla del TGF-β y el IGF-I (Mobasheri y cols., 2009).

Existe unanimidad en considerar al TGF-β como el factor fundamental en la diferenciación condrogénica, Mrugala y cols., en el año 2008, comunicaron la diferenciación a condrocito de células mesenquimales ovinas solo con la adición del TGF-β, siendo estos capaces de reparar lesiones cartilaginosas. También se ha utilizado la asociación del TGF-β con la dexametasona, añadiendo al medio de cultivo

ITS, en la diferenciación condrogénica (Pittenger y cols., 1999; Zuk y cols., 2001). Xu y cols., en 2005, describieron el procedimiento de diferenciación empleando TGF- β e ITS, sin añadir dexametasona.

En nuestro estudio hemos empleado un medio de inducción comercial que contiene la combinación de TGF- β y dexametasona, añadiendo nosotros el suplemento ITS al medio, el motivo de nuestra elección ha sido la alta predictibilidad del procedimiento, como se demostró por Zuk y cols., en 2001.

Hemos realizado la diferenciación mediante dos procedimientos:

El primero ha sido el procedimiento de uso habitual, descrito por Pittenger y cols., en 1999, mediante la formación, en un tubo falcon, de micromasas en suspensión. Con este procedimiento hemos obtenido unas micromasas con forma redondeada a partir del 2º día de diferenciación, estas no han aumentado ostensiblemente de volumen durante el procedimiento. Este dato es contradictorio con lo descrito por Zuk y cols., en 2001, en su procedimiento las micromasas iban aumentando de tamaño durante el proceso de diferenciación. El motivo de esta discrepancia de resultados podría imputarse tanto a la diferencia de especies como al medio de cultivo utilizados. Nosotros hemos empleado α -MEM con células de conejo mientras que Zuk y cols., emplearon DMEM con células humanas.

El segundo ha sido el procedimiento de cultivo de alta densidad en placa, en contra de la afirmación de que no se puede inducir la diferenciación condrogénica en cultivos en monocapa (Zuk y cols., 2002). Nosotros hemos obtenido unos agregados celulares, adheridos a la placa, con la mitad del tamaño de las obtenidas por la técnica anterior. Hemos empleado, en esta técnica, de DMEM como medio de cultivo, estos resultados coinciden con los comunicados por Schulze-Tanzil y cols., cuando describió el procedimiento en 2002. Este menor volumen puede ser debido a la disminución de

la tasa de agregación celular en este procedimiento, que suele ser la mitad respecto a la del procedimiento de micromasas, el cual favorece la condensación celular, aspecto esencial de la diferenciación condrocítica (Zuk y cols., 2001).

La diferenciación condrocítica se manifiesta por la formación de una matriz extracelular rica en colágeno de tipo II y en proteoglicanos, conteniendo condroitin-4-fosfato, que se unen formando grandes moléculas como el agrecan. Estas se hacen evidentes mediante la tinción, en medio ácido con el Azul Alcán (Lee y cols., 2004).

Las células mesenquimales de conejo cultivadas en medio de diferenciación condrogénico, han formando una matriz extracelular, con forma de bola, que contiene proteoglicanos sulfatados, como hemos demostrado mediante la tinción con el Azul Alcán, esta la hemos podido realizar fácilmente, sin tener que recurrir a la inclusión en parafina y realización de cortes con micrótomo, gracias al método de diferenciación en placa.

Los resultados obtenidos, tanto en la forma de los cultivos como en la composición de la matriz extracelular sugieren que se ha producido la diferenciación hacia linaje condrocítico de las ADSC_s de conejo.

6.3.- Diferenciación adipogénica.

La diferenciación adipogénica de las ADSC_s, tanto humanas como murinas, ha sido muy bien documentada (Zuk y cols., 2001; Gimble y Guilak, 2003), esta se caracteriza por la aparición, en un porcentaje significativo de las células, de múltiples gotas lipídicas intracitoplasmáticas que se tiñen con el aceite rojo O, este se considera un tinte específico de los lípidos.

Además se ha demostrado la capacidad, por estas células diferenciadas, de secretar leptina, lo cual es una propiedad distintiva de los adipocitos maduros (Halvorsen y cols., 2001). También se ha comprobado, en estas células diferenciadas, la sobreexpresión del ligando de la proteína 4 ácida grasa y del receptor y del receptor-activador de la peroxina, expresándose en mayor grado, este último marcador, cuando la diferenciación se lleva a cabo suplementando el medio con suero humano homólogo en vez de con SBF.

El suero humano homólogo parece que induce la diferenciación espontánea de las ADSC_s, ya que también se ha observado la sobreexpresión del citado marcador en los cultivos de control negativo de la diferenciación, además de haberse observado diferenciación adipogénica espontánea en cultivos con medio de inducción osteogénica y suero humano homólogo (Lindroos y cols., 2010).

La distribución intracitoplasmática de las gotitas lipídicas se ha mostrado con gran variabilidad, así Zuk y cols., en 2001, comunicaron que a partir del día 14 de inducción, se habían diferenciado el 42% de las células del cultivo, presentando estas células del 90% al 98% de su citoplasma ocupado por las gotas lipídicas, si el cultivo se prologaba por encima de 24 días las células no aumentaban su grado de diferenciación sino que se despegaban de la placa y morían.

Kim y cols., en 2010, observan gotas lipídicas, en ADSC_s porcinas, al 2º día de comenzar la diferenciación, comprobando que se tiñen con aceite rojo O y que expresan adipofilina, un marcador temprano de la diferenciación adipogénica. A los 14 días de diferenciación encontraron un 50% de células diferenciadas, las cuales presentaban un 70 % de su citoplasma ocupado por gotas lipídicas, si el cultivo se prologaba hasta los 28 días de diferenciación las células no se despegaban y se diferenciaban el 100% de las células, ocupando los lípidos el 80% del citoplasma. Estos autores sugieren que en el cultivo existen células con distinta sensibilidad al

medio adipogénico, también han comunicado que observan cambios en la morfología celular al comienzo de la diferenciación adoptando formas redondeadas, poligonales y estrelladas.

En nuestro trabajo hemos observado, coincidiendo con Kim y cols., desde una sola gotita lipídica intracitoplasmática, hasta todo el citoplasma ocupado por ellas, también, al igual que el grupo Zuk, hemos encontrado gotas que no se han teñido con el aceite rojo O.

El porcentaje de células diferenciadas, en nuestro caso, ha oscilado entre el 15-30%, observando que algunas se han diferenciado manteniendo la misma forma que poseían en estado indiferenciado. Estas observaciones nos inducen a pensar que las células mesenquimales de la grasa del conejo se diferencian a adipocitos en menor proporción que las de otras especies.

Un dato llamativo ha sido la presencia, en el cultivo, de hasta un 15% de células con la morfología típica de la sobreestimulación, esto junto a las observaciones anteriores nos lleva a pensar que no solo pueden haber en el cultivo células con diferente sensibilidad al medio adipogénico, sino que es posible que haya distintas subpoblaciones celulares, con diferente capacidad de diferenciación a adipocitos.

6.4.- Diferenciación neurogénica.

El proceso de diferenciación neurogénica de las ADSC_s humanas fue descrito por Zuk y cols., en el año 2002, la autora describió como el cultivo, de las células mesenquimales, en medio neurogénico provoca rápidas modificaciones en la morfología celular. Así entre la 1^a y 9^a horas de inducción se apreciaban cambios citomorfológicos en un rango de entre el 10% y el 70% de las células.

Estos cambios son similares a los que nosotros hemos observado en las ADSCs de conejo, consistiendo en retracción o pérdida citoplasmáticas, en la condensación del citoplasma alrededor del núcleo y en la aparición de prolongaciones ramificadas, conformando todos estos cambios un aspecto similar al que presentan las células neurales.

Zuk y cols., comunicaron que en 9 horas ya se había conseguido la diferenciación neurogénica, la cual mantenían hasta una semana utilizando un medio de mantenimiento de progenitores neurales, cuya composición no cita.

Nosotros hemos hallado células que se diferencian a los 3 y 4 días de iniciada la inducción neurogénica, el motivo de esta discrepancia de resultados se podría achacar al hecho de que en nuestro experimento no hemos empleado ningún medio de preinducción y hemos mantenido el suplemento neurogénico durante todo el tiempo de cultivo.

Kang y cols., en 2004, diferenciaron las células mesenquimales obtenidas de la médula ósea y de la grasa de monos Rhesus, en su procedimiento utilizaron como inductores neurogénicos el FGF básico, el BDNF (factor neurogénico derivado del cerebro) y el EGF, este suplemento lo suministraron de 4 a 7 días, observando cambios morfológicos similares a los que hemos encontrado en nuestro procedimiento de diferenciación. El grado de diferenciación que comunicaron fue muy alto, superior al 70% muy alejado, de nuestro discreto 10% de células diferenciadas. En nuestra opinión este alto grado de diferenciación conseguido fue debido a su procedimiento de diferenciación, ya que, hacen una selección previa, de las células a diferenciar, mediante un cultivo de alta densidad, escogiendo las células que proliferan formando de manera espontánea acúmulos celulares redondeados, fijados a la placa o que están flotando, que ellos consideran neuroesferas, las células así seleccionadas se llevan a otra placa donde procede a la inducción neurogénica.

Se han publicado resultados similares a los nuestros, en cuanto a los cambios morfológicos, en células mesenquimales humanas y murinas, expandidas en un medio de preinducción suplementado con EGF y con FGF, el cual aumenta la diferenciación, para después diferenciarlas suplementando el medio con ácido valproico e hidrocortisona, los cambios morfológicos se observaron a las pocas horas de comenzar la diferenciación (Safford y cols., 2004).

Las células que diferenciamos a linaje neural expresaron de forma discreta, nestina, tubulina β III, enolasa específica neuronal y proteína glifobrilar ácida, marcadores de neuronas y células gliales tipo astrocitos. Zuk y cols., comunicaron que, mediante técnicas de inmunofluorescencia, RT-PCR y western blot, las células mesenquimales humanas diferenciadas expresaban NSE y nestina y no expresaban la GFAP ni la proteína 2 asociada a los microtúbulos (MAP-2), concluyendo que tras el proceso de diferenciación se obtenía un cultivo de células precursoras de las neuronas (Zuk y cols., 2002).

Por el contrario se ha comunicado que las células mesenquimales de monos Rhesus expresan un 43% de nestina, un 53% de MAP-2_{ab} y un 55% de GFAP (Kang y cols., 2004).

Safford en su trabajo de 2004 encontró, mediante tinción inmunocitoquímica y western blot, la expresión de nestina, GFAP y filamento intermedio N en las células mesenquimales murinas y humanas diferenciadas neurogénicamente.

Esta disparidad en los resultados, que incluye a los nuestros, pensamos que se debe a la diversidad de procedimientos de diferenciación empleados, los cuales provocarían distintas tasas de diferenciación.

La diferenciación neurogénica de las células mesenquimales no está exenta de controversias. Se ha comunicado que los cambios producidos en la citomorfología, durante el proceso de diferenciación, podrían ser debidos a la retracción del citoplasma por roturas de la red de actina, así los antioxidantes y los agentes que aumentan el AMP cíclico provocarían este efecto induciendo a la morfología neural, además inducirían la expresión de varias proteína neurales con la nestina, la GFAP y la tubulina β III (Neuhuber y cols., 2004).

Lu y cols., en 2004, demostraron que la exposición a agentes causantes de estrés celular puede inducir un fenotipo neural en las células mesenquimales, en los fibroblastos y en los queratinocitos. Esta observación coincide con nuestra descripción de los cambios morfológicos que se producen en las ADSCs de cultivos sobreestimulados. Estudios de microarrays han demostrado que los genes que se activan en las células mesenquimales diferenciadas a neural son diferentes a los que se observan activos en las células nerviosas (Choi y cols., 2006).

Los resultados que hemos obtenido en el estudio de la capacidad de diferenciación de las células mesenquimales obtenidas de la grasa de conejo son coincidentes con el consenso existente sobre, como mínimo, la multipotencialidad de las células mesenquimales.

Este consenso desaparece cuando se postula su pluripotencialidad, hay autores que en absoluto dudan de ella (Kang y cols., 2004; Seo y cols., 2005; Timper y cols., 2006; Wagner y Ho, 2007; Trottier y cols., 2008; Asti y cols., 2010; Zuk, 2010), mientras que otros las cuestionan (Koç y Lazarus, 2001; Jiang y cols., 2002), atribuyendo las observaciones descritas a artefactos en los procedimientos de cultivo (Neuhuber y cols., 2004; Schäffler y Büchler, 2007), o a fenómenos de fusión con células de otras estirpes presentes, en el tejido adiposo, en el momento de la obtención de la población celular (Spees y cols., 2003).

Se ha planteado el que entre la población celular aislada pudiese existir algún tipo celular pluripotencial procedente de los tejidos vasculares, ya que es seguro que al triturar la grasa también se deshacen los pequeños capilares que indudablemente irrigan al tejido adiposo, llegando a proponer un origen vascular de las células mesenquimales (Lin y cols.,, 2010).

También se ha postulado que en determinadas circunstancias las células mesenquimales podrían expresar marcadores de células de origen ectodérmico porque derivarían de células troncales mesoteliales a través del mecanismo de la transición epitelio-mesenquimal, (EMT), similar al que acontece en los mamíferos durante la formación del mesénquima embrionario primitivo (Phinney y Prockop, 2007).

A pesar de la disparidad de criterios respecto al origen y capacidad de transdiferenciación de las células mesenquimales, por los resultados que hemos obtenido en la diferenciación celular sabemos que contamos con una población celular válida para pasar a la fase de experimentación “*in vivo*”

7. CULTIVO EN MATRICES.

Actualmente, el tratamiento de los defectos del tejido óseo se basa sobre todo en la implantación de diversos tipos de injertos, siendo los injertos de hueso autólogo el patrón de oro, el hueso autólogo aventaja al homólogo en su histocompatibilidad y en no ser vehículo de transmisión, al receptor, de nuevas patologías, no habiendo sido superados sus resultados con otros tipos de injertos, como comprobaron Samartzis y cols., en 2005, en su estudio sobre los resultados de la artrodesis cervical en 65 pacientes.

Desde los trabajos de Langer y Vacanti en 1993 hasta la actualidad, se han propuesto gran cantidad de biomateriales para su uso en la ingeniería de tejidos, de este modo, en la ingeniería del tejido óseo se están utilizando materiales poliméricos naturales o sintéticos; materiales cerámicos naturales o sintéticos; materiales compuestos y vidrios bioactivos (Jones y cols., 2010). Estos materiales deben de poseer unas propiedades mecánicas similares a las del hueso, al menos hasta la regeneración de este, tiene que ser biocompatibles y biodegradables, porosos, como mínimo deben de ser osteoconductores y además debe de haber una biodisponibilidad abundante a un coste razonable (Fröhlich y cols., 2008; Jones y cols., 2010).

La fibrina es una proteína polimérica, insoluble en medio acuoso, que se origina a partir del fibrinógeno plasmático formando una red tridimensional, esta red de juega un papel fundamental en el proceso de curación de las heridas.

“*In vitro*”, Gardin ha comunicado en 2011 que las ADSC_s y las células troncales epiteliales obtenidas de 7 pacientes han proliferado y se han diferenciado a linajes neurales en matrices de fibrina y de ácido hialurónico, no habiendo encontrado diferencias en la capacidad de proliferación y diferenciación entre ambas matrices.

“*In vivo*”, se ha evaluado la vitalidad de ADSC_s de ratón diferenciadas a adipocitos, al implantarse en ratones mediante constructos de fibrina y de matrigel. Se ha comunicado que la matriz de fibrina ha sido muy efectiva en la supervivencia celular, más de 28 días, después de su trasplante, no hallándose diferencia significativa entre los resultados hallados en la matriz de fibrina y los encontrados con el matrigel, matriz comercial ampliamente contrastada (Aoyagi y cols., 2011).

Estos datos son coincidentes con nuestros resultados en cuanto a la proliferación y mantenimiento del cultivo de las ADSCs de conejo en fibrina autóloga y validan su uso *“in vivo”*.

Nosotros hemos demostrado que las células mesenquimales penetran en la matriz de fibrina autóloga formada, adoptando en su interior una distribución tridimensional y que proliferan dentro de la matriz, lo que nos permite afirmar que los nutrientes del medio de cultivo pueden difundir entre los filamentos de la matriz de fibrina.

El hueso se puede considerar como un material compuesto natural, formado por la mezcla de una red de polímero y de un mineral (Jones y cols., 2006).

La parte mineral del hueso está formada por ortofosfatos cárnicos que cristalizan formando la hidroxiapatita, (HA), esta es un material ampliamente usado en clínica para la regeneración ósea por su elevada biocompatibilidad y su similitud con la estructura ósea, Pjetursson y cols., en su excelente artículo de revisión sobre la tasa de éxito en la cirugía de osificación parcial del suelo sinusal encontraron que en más del 70% de los 839 artículos revisados se había utilizado hidroxiapatita, sola o mezclada con hueso autólogo, como material de injerto (Pjetursson y cols., 2008).

Un problema asociado al uso de bloques de HA en regeneración ósea es que se produce una buena regeneración en la periferia del bloque y una nula regeneración en el centro, esto hecho se ha tratado de paliar mediante la creación de canales alineados en el constructo sin variar el tamaño de los poros. Estos canales no han alterado las propiedades de resistencia del material y han aumentado la tasa de penetración celular *“in vitro”* (Rose y cols., 2004).

Una manera muy común de solucionar este problema es mediante el empleo, ampliamente difundido en la práctica clínica, de HA particulada (Pjetursson y cols.,

2008). Este procedimiento es el que hemos utilizado en nuestro trabajo. De esta manera hemos compactando las partículas de HA con fibrina autóloga, hemos demostrado que las células en esta nueva matriz han mantenido su tasa de viabilidad y conservado su capacidad de proliferación.

Así hemos observado, tanto con microscopía de contraste de fases como con microscopía confocal, que las células se han relacionado con la superficie de la hidroxiapatita a través de prolongaciones citoplasmáticas.

El hecho de utilizar un material autólogo, que participa en los procesos de curación ósea *“in vivo”*, junto con un biomaterial cuya eficacia clínica está ampliamente testada nos asegura que la matriz así constituida será totalmente compatible cuando se implante *“in vivo”*.

Se han comunicado resultados similares a los obtenidos por nosotros, en lo que concierne a la formación de la matriz, en un estudio donde se comparó la capacidad de osificación *“in vivo”*, en la calota de 134 ratas, de una matriz de HA coralina con plasma rico en plaquetas y células mesenquimales de médula ósea, con la de una matriz de ácido poliláctico con plasma rico en plaquetas y células mesenquimales de médula ósea (Kretlow y cols., 2010). La diferencia con nuestro procedimiento radica en que nosotros empleamos un plasma obtenido previamente y conservado refrigerado, con lo cual las plaquetas ya están lisadas en el momento de la activación, además no hemos empleamos trombina para activar el fibrinógeno.

Podemos concluir que hemos diseñado una matriz que complementa las cualidades de la HA y de la fibrina autóloga, y en la que, a diferencia de las reportadas en la literatura científica, las células en el momento de la siembra no se ven influenciadas por ningún factor de señalización proveniente de las plaquetas.

8. IMPLANTACIÓN EN EL MODELO ANIMAL.

Una vez que comprobamos que las células mesenquimales obtenidas del tejido adiposo de conejo eran capaces, “*in vitro*”, tanto de diferenciarse osteogénicamente como de anidar y proliferar en la matriz de experimentación, procedimos a la implantación celular en el modelo de experimentación animal.

Se han reportado diversas técnicas de ingeniería de tejido óseo “*in vivo*”.

Se ha descrito la implantación de matrices cerámicas, compuestas por un 65% de HA y un 35% de fosfato tricalcico β , en lesiones cilíndricas femorales, de 21 mm de diámetro, en 12 perros, en 4 casos las matrices se sembraron con bMSC indiferenciadas, en otros 4 se implantaron sin células y en otros 4 casos se dejaron las lesiones sin tratamiento. En el estudio histológico no hubo regeneración en los casos sin tratar, en los casos tratados la regeneración fue mayor en los que se implantaron células mesenquimales de médula ósea, no obstante el buen resultado, la regeneración solo penetró 3,14 mm como máximo en el constructo (Bruder y cols., 1998).

Ya hemos comentado que este era uno de los inconvenientes del empleo de bloques cerámicos, en nuestro caso la compactación con la fibrina nos permite asegurar el flujo de nutrientes al interior del constructo.

En 2009, Matsushima y cols., compararon la capacidad de producir osificación “*in vivo*” de 2 matrices, una de HA y la otra de fosfato tricalcico β , sembradas con bMSCs humanas, diferenciadas “*in vitro*” a osteoblastos e implantadas, durante 8 semanas, en el tejido subcutáneo de 7 ratas atímicas, se encontró osificación ectópica en todos los casos, comprobando mediante microtomografía computarizada que el grado de osificación era mayor en las matrices de hidroxiapatita. Se concluyó que las matrices

de cerámicas de fosfatos cálcicos mantenían la capacidad osteogénica de las células diferenciadas al implantarse en zonas ectópicas.

Recientemente se ha comprobado la eficacia, de un novedoso hidrogel sintético llamado RAD 16, en la capacidad de sustentar la diferenciación osteogénica “*in vitro*” y la osificación ectópica “*in vivo*”, para esto se diferenciaron “*in vitro*” bMSC de rata wistar en más de 200 matrices de RAD 16. Posteriormente se confeccionaron constructos de RAD 16 con o sin HA, incluyendo las células diferenciadas a osteoblastos y se implantaron en el tejido subcutáneo de las ratas, a las 4 semanas se evaluaron los implantes, observando más proliferación de osteoblastos y células sanguíneas y más expresión de los RNA_m de ALP, OPN y OCN en los implantes con RAD 16 + AH que en los de RAD 16 solo. En ninguno de los 2 tipos de implantes se observó mineralización ectópica (Ozeki y cols., 2011).

La utilización de hidrogeles ya ha sido reportada con anterioridad, así Vacanti y cols., en 2001, comunicaron como, mediante ingeniería de tejido óseo, habían formado una falange distal en un paciente de 36 años que la había perdido en un accidente laboral, implantaron un constructo de HA coralina con forma de falange, inmediatamente después le inyectaron, en el interior de la matriz, 20×10^6 células troncales autólogas obtenidas del periostio y seguidamente encapsularon el constructo con un gel de alginato cálcico. A los 3 meses el paciente volvió a trabajar, en 28 meses recuperó parcialmente la sensibilidad en el dedo. Mediante una biopsia observaron la formación de hueso en el interior de la matriz y su neovascularización.

Otra opción empleada ha sido el modificar genéticamente las ADSC_s humanas, para inducirles a la formación de BMP-2, e implantarlas, mediante matrices de colágeno e hidroxiapatita, en fracturas completas femorales producidas en ratones atípicos, los implantes de ADSC_s productoras de BMP-2 lograron curar las fracturas,

mientras que en el grupo de HA y colágeno sin células no hubo reparación (Peterson y cols., 2005).

También se ha empleado la BMP-2 impregnando el constructo, de este modo se ha descrito por investigadores de la universidad de Tampere y Helsinki el primer caso de reconstrucción maxilar humana mediante un constructo de fóstato tricalcico β , diseñado a medida del defecto, empapado de BMP-2 y con ADSCs que previamente se había implantado en tejido muscular para lograr su microvascularización y calcificación ectópica, tras lograr estas se ha fijado al maxilar mediante un colgajo pediculado, (Mesimäki y cols., 2009).

No obstante hay autores que ponen en cuestión la utilidad de la inducción de las ADSCs con BMP-2. Así se trataron durante 8 semanas defectos femorales en ratas atímicas mediante constructos con un 70% de AH compactada con un 30% de PLA, con o sin ADSCs humanas y con diferentes concentraciones de BMP-2 recombinante. En los resultados se encontró que la asociación ADSCs/BMP-2, independientemente de la concentración de BMP-2, no mejoraba la capacidad de osificación respecto al empleo de la BMP-2 sola (Chou y cols., 2011).

Seguidamente se ha evaluado la vía de señalización de la diferenciación osteogénica en ADSCs humanas tratadas con BMP-2, con o sin la adición dexametasona en el medio de diferenciación, encontrando que no se producen cambios en los niveles de fosforilación de Smad 1/5/8, tampoco se activaron 3 factores de transcripción, dlx3, dlx5 y osterix que se incluyen en la vía que señala la BMP-2, de estos hechos, junto al resultado de la experimentación “*in vivo*” anteriormente citada, los autores sugieren que la diferenciación osteogénica de las ADSCs podría no estar influenciada por la BMP-2 (Zuk y cols., 2011).

Otra forma de aplicación ha sido mediante la combinación de terapia celular e ingeniería de tejido óseo, de este modo, Tadokoro y cols., en 2009, comunicaron un caso de hipofosfatemia, una rara enfermedad hereditaria que afecta a la fosfatasa alcalina no específica de tejido, en un bebé de 3 meses. Se trataron las lesiones localizadas mediante la implantación de constructos de HA con las MSC_s, diferenciadas a osteoblastos, obtenidas de la médula ósea paterna y expandidas “*in vitro*”. Al mismo tiempo se realizó la perfusión sistémica de una mezcla de MSC_s indiferenciadas y diferenciadas. En un principio el tratamiento fracaso, se retiraron los constructos y se realizó una segunda perfusión sistémica de las células, entonces el paciente mejoró. El estudio histológico de los constructos retirados mostro la presencia de osificación de novo originada tanto de las células del padre como de las del bebe.

Las matrices de fibrina se han utilizado “*in vivo*”, así en 2004, Lendeckel y cols., comunicaron la curación de lesiones óseas, refractarias al tratamiento convencional, en la calota de una niña de 7 años, mediante la implantación, en las lesiones, de una matriz de fibrina sembrada con una mezcla de MSC_s y ADSC_s autólogas y estabilizada con una membrana de regeneración reabsorbible y un colgajo de tejidos blandos.

También se ha evaluado la posible incidencia en la osificación, “*in vivo*”, de los constructos de fibrina/HA y células progenitoras humanas procedentes del cordón umbilical. De este modo, se utilizó un constructo de partículas de hueso bovino desmineralizado compactadas con una matriz de fibrina, se sembró con MSC_s y células progenitoras endoteliales humanas, solas o en combinación, y se implantaron en lesiones producidas en la calota de ratones atípicos, se observó que los implantes de las células endoteliales solas no producía regeneración ósea pero si un aumento en la vascularización del injerto, cuando los injerto portaban MCS_s se produjo regeneración ósea, pero esta no se vio influenciada por la presencia o ausencia de células progenitoras endoteliales (Koobs y cols., 2011).

En nuestro estudio hemos comparado el grado de osificación obtenido en el tratamiento de lesiones óseas críticas, con la implantación de constructos de hidroxiapatita compactada con fibrina sembrados con ADSCs autólogas, diferenciadas osteogénicamente ó indiferenciadas, con el obtenido tratando dichas lesiones con hueso autólogo y con el obtenido sin aplicar ningún tipo de tratamiento.

Para nosotros la comparación mediante la evaluación radiológica de las lesiones no ha sido relevante debido a la radioopacidad que presenta la hidroxiapatita empleada en la matriz. Pensamos que serían necesarios intervalos de tiempo mayores para poder objetivar signos de osificación en las matrices con base cerámica. Este es uno de los inconvenientes de la radiología cuando se emplean matrices de cerámicas radiopacas de reabsorción lenta, hecho que ya comunicaron Peterson y cols., en 2005.

No obstante otros autores la consideran de utilidad para seguir la evolución de los constructos y su integración con el hueso circundante (Bruder y cols., 1998; Vacanti y cols., 2001). Justificamos nuestra discrepancia con estos autores en que el periodo de tiempo del seguimiento radiológico que han hecho es mayor, ellos hacen un seguimiento muy largo, de varios años el grupo de Vacanti, y sobre todo no hablan de grado de osificación sino de integridad del constructo. En este último punto si que consideramos válido el seguimiento radiológico, pues, en nuestro caso, podríamos valorar signos de reabsorción temprana del constructo, por ejemplo en caso de inflamación aguda severa o infección del injerto.

En el estudio histológico hemos encontrado que en todos los casos tratados con injerto de hueso autólogo hemos obtenido un nivel óptimo de osificación, evidenciando osteoblastos activos, con morfología cuboidea, también se ha observado una gran celularidad en las trabéculas óseas neiformadas junto a la presencia de distintas líneas de osificación. Este grado de osificación fue significativamente mayor que los obtenidos con el resto de tratamientos. Estos resultados están en concordancia con el

criterio general de considerar, todavía, el injerto de hueso autólogo como el patrón de oro en regeneración ósea (Tressler y cols., 2011)

No obstante no hay consenso entre los investigadores en los resultados conseguidos con injertos autólogos *versus* implantes celulares.

De este modo se ha comunicado un estudio en 27 conejos en los cuales se realizó fusión espinal entre L4 y L5 con injerto de hueso autólogo, en 15 ejemplares, y con injerto de hueso autólogo suplementado con MSC_s autólogas previamente diferenciadas, “*in vitro*”, a linaje óseo en 12 ejemplares. La tasa de éxito en el grupo tratado solo con injerto autólogo fue del 53%, mientras que todos los casos del grupo con MSC_s fracasaron (Urrutia y cols., 2010).

Por otro lado, se han reportado estudios como el de Nakajima y cols., en 2007, donde se realizaron artrodesis intervertebrales lumbares en 24 conejos japoneses blancos, en 6 casos se utilizó un injerto autólogo, en otros 6 un injerto de HA sola, en otros 6 un constructo con HA sembrada con MSC autólogas indiferenciadas y por último en otros 6 un constructo de HA y MSC_s diferenciadas osteogénicamente. A las 6 semanas encontraron fusión espinal y formación de hueso nuevo en el 66% de los casos tratados con injerto autólogo de hueso y con constructo HA/MSC_s diferenciadas, no habiendo diferencias significativas entre los 2 grupos. El grupo HA/MSC_s indiferenciadas la tasa de éxito fue del 33% observándose un menor grado de regeneración. En el injerto de HA sola no se produjo la fusión vertebral en ningún caso, apareciendo tejido fibroso cicatricial.

Nuestros resultados con los implantes celulares han sido dispares, en los casos donde las células fueron expandidas en los constructos no hubo regeneración ósea. Achacamos este fracaso uso de SBF, el cual provoca, como hemos comprobado, una reacción inmunológica severa con la aparición de un infiltrado inflamatorio crónico y la

presencia de células gigantes multinucleadas. Creemos que esta reacción no puede ser atribuida a la fibrina, pues es autóloga, ni a la HA del constructo, pues se trata de una HA ampliamente testada en el uso clínico.

Así se ha comunicado que el uso, “*in vivo*”, de células cultivadas en medios con SBF puede provocar reacciones inmunológicas severas. Esto ha llevado a la búsqueda de diferentes sustitutos, como el suero humano homólogo al 20%, con el que se ha conseguido mantener el mismo grado de viabilidad y proliferación celulares que con el uso del SBF. No obstante, en la diferenciación osteogénica temprana, el suplemento de SBF se ha mostrado superior al suero homólogo (Lindroos y cols., 2010).

Pensamos que los resultados comunicados por Urrutia y cols., podrían, al igual que nos ha sucedido a nosotros, estar condicionados por la presencia de trazas de SBF en los implantes celulares. En nuestro caso cuando hemos cambiado el procedimiento de fabricación del constructo, sustituyendo el SBF por suero autólogo, ha desaparecido la reacción inflamatoria y se ha logrado regeneración ósea.

Este hecho apoya la hipótesis de que el SBF provoca una respuesta inmunitaria que inhibe el proceso de regeneración. Esta respuesta, en nuestra opinión, es tan intensa que no puede ser modulada por las ADSC_s, las cuales se postula que poseen propiedades inmunosupresoras, como comunicaron por primera vez Puissant y cols., en 2005. Este realizó cocultivos de células mesenquimales, de la grasa y de la médula ósea, con células mononucleares de la sangre periférica, linfocitos y monocitos, observando que cuando los ADSC_s se exponían a los linfocitos en un ratio de 1 a 1 no se estimulaba la proliferación de estos, mientras que si los linfocitos se exponían a células HLA-DR incompatibles (grupo control) proliferaban rápidamente. También

demostró que las ADSC_s en contacto con los linfocitos inhibían la proliferación de estos ante la exposición a los agentes mitogénicos fitohematoaglutinina y concanavalina A. Esta inhibición esta en dependencia del número de ADSC_s y precisa del contacto de estas con los linfocitos, de hecho cuando en los cocultivos se separaban las células no se producía la inhibición de la proliferación linfocitaria.

Nosotros mediante el análisis histológico y el análisis histomorfométrico no hemos podido encontrar diferencias significativas, en el grado de regeneración ósea, entre las lesiones tratadas con implantes de células indiferenciadas y las tratadas con las células diferenciadas. Sugerimos que esto puede ser debido a que “*in vitro*” el estímulo de diferenciación es muy intenso y en cuanto cesa las células no mantienen la diferenciación, al implantarlas “*in vivo*” tanto las células diferenciadas como las indiferenciadas reciben el mismo estímulo, con lo cual su comportamiento será similar.

En la literatura científica la formación ósea se ha comunicado con procedimientos muy dispares. Así con la aplicación de células indiferenciadas, “*in vivo*” se comparó el grado de osificación ectópica, en ratones atípicos, de matrices de HA/PGLA con y sin células indiferenciadas y dentro de este 2º grupo con o sin la adición de BMP-2. A las 8 semanas de la implantación se apreció un área mayor de formación ósea en los grupos que incorporaban ADSC_s indiferenciadas, siendo mayor la expresión de ALP, OPN y OCN en el grupo que asociaba BMP-2 a las células indiferenciadas (Jeon y cols., 2008).

En 2011, Rhee y cols., compararon la capacidad de reparar lesiones de 8mm de diámetro, en la calota de 50 ratas, utilizando, en grupos de 10 ratas, una matriz ósea desmineralizada sola; esta matriz más las células de la FVS de la grasa; la matriz junto a ácido poliláctico y la misma matriz junto a ácido poliláctico y células de la FVS de la grasa, un 5º grupo se dejó sin tratamiento. A las 8 semanas se evaluó el grado de osificación en cada grupo encontrando que los grupos con FVS presentaban más

osificación y dentro de estos el que no contenía ácido poliláctico, 52% y 42% respectivamente, también se encontró mayor osificación en el grupo que contenía matriz ósea desmineralizada sola comparado con el que asociaba ácido poliláctico. El grupo control presentó reacción fibrosa sin osificación, resultado similar al encontrado en nuestro trabajo, esta ausencia de regeneración puede ser debida al tamaño crítico de las lesiones que anula en mecanismo natural de regeneración a partir del coágulo sanguíneo.

VII.- CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en nuestra investigación podemos concluir que:

1. El tejido adiposo del conejo albino New Zealand, (*Oryctolagus cuniculus*), proporciona, mediante el procedimiento de disgregación enzimática de la grasa, una buena fuente de células madre mesenquimales con gran capacidad de proliferación, por lo que puede ser propuesto como un modelo de experimentación adecuado.
2. Mediante el cultivo de explantes de grasa, por el método empleado por nosotros, se obtiene la misma población celular que la obtenida por la disgregación de la grasa.
3. La proliferación de las ADSC_s de esta especie animal es dependiente de la concentración de suero bovino fetal en el medio de cultivo, siendo la concentración óptima, para la proliferación de estas células, del 10%.
4. Hemos definido con detalle 5 morfologías características de estas células en los cultivos. Determinando que algunas de ellas están inducidas por las condiciones del cultivo.
5. Este estudio morfológico nos ha permitido establecer la existencia de, al menos, dos subpoblaciones celulares distintas en el cultivo. Una que presenta cambios fenotípicos constantes y una segunda subpoblación con una morfología que permanece invariable durante la progresión dinámica del cultivo.

6. El estudio de la progresión dinámica de los cultivos, mediante microscopia de intervalos seriada en video, nos ha permitido definir dos hechos inéditos:

 - Los núcleos de las células mesenquimales poseen un movimiento de rotación y pueden desplazarse por el citoplasma celular.
 - Ante situaciones de estrés celular se produce la pérdida de fragmentos citoplasmáticos, mediante un proceso de vacuolización.
7. El perfil fenotípico de las ADSC_s de conejo difiere del establecido para las células madre mesenquimales humanas, estando en discordancia el nivel de expresión de los marcadores CD31, CD44, CD73, CD105 y CD166.
8. Las células mesenquimales que hemos obtenido de la grasa del conejo son pluripotenciales, pues las hemos diferenciado a estirpes celulares originarias de dos capas germinales diferentes.
9. Las ADSC_s se diferencian a linaje osteogénico mediante el procedimiento, desarrollado por nosotros, de diferenciación osteogénica en micromasas adheridas.
10. La matriz desarrollada en este trabajo es biocompatible, las células mesenquimales se adhieren a ella, mediante prolongaciones citoplasmáticas, y proliferan adecuadamente en su interior.
11. En el conejo albino New Zealand el tratamiento que proporciona mejores resultados, en la curación de lesiones óseas críticas, es el injerto de hueso autólogo. El tratamiento de estas lesiones mediante la implantación de

constructos con células madre mesenquimales consigue mejores resultados que el tratamiento a expensas del coágulo sanguíneo.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

Abdul Kafi M, El-Said WA, Kim TH, Choi JW. Cell adhesion, spreading, and proliferation on surface functionalized with RGD nanopillar arrays. *Biomaterials*. 2012 Jan;33(3):731-9.

Alevizopoulos A, Mermod N. Transforming growth factor-beta: the breaking open of a black box. *Bioessays*. 1997 Jul;19(7):581-91.

Antoniades HN. Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc Natl Acad. Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7314-7.

Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. Fibrin glue increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice. *Exp Mol Med*. 2011 Mar 31;43(3):161-7.

Armitage JO. Bone marrow transplantation *N Engl J Med*. 1994 Mar 24;330(12):827-38. Review

Asakura A, Rudnicki MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol*. 2002 Nov;30(11):1339-45.

Asakura A, Seale P, Grgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2002 Oct 14;159(1):123-34.

Asti A, Gastaldi G, Dorati R, Saino E, Conti B, Visai L, Benazzo F. Stem Cells Grown in Osteogenic Medium on PLGA, PLGA/HA, and Titanium Scaffolds for Surgical Applications. *Bioinorg Chem Appl*. 2010:831031. Epub 2010 Dec 23

Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press; 1996 p.51-67.

Baron R. Anatomy and biology of bone matrix and cellular elements. Chapter 1 General principles of bone diseases and disorders of mineral metabolism, fifth edition 2003. American society for bone and mineral research, Washington, DC Pp 1-8.

Bellusci S. Lung stem cells in the balance. *Nat Genet*. 2008 Jul;40(7):822-4.

Bertrand Baschwitz L. La implantología en tiempos de crisis. *Gaceta Dental*, 196 jul 2009;45-47.

Bieback K, Kern S, Kocaömer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng*. 2008;18(1 Suppl):S71-6.

Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 10;26(17):2828-38.

Botchwey EA, Dupree MA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT. Tissue engineered bone: measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Oct 1;67(1):357-67.

Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT. Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system *J Biomed Mater Res*. 2001 May;55(2):242-53

Bowen-Pope D F, Vogel A, Ross R. Production of platelet-derived growth factor- Like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptor accompany transformation by a wide spectrum of agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81.2396, 1984.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):139-46.

Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1:S1.

Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep*. 2007 Sep;5(3):98-104.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42.

Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, Triplett RG. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Dec;63(12):1693-707.

Braddock M, Houston P, Campell C. Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News Physiol Sci* 2001; 16: 208-213.

Brammer KS, Choi C, Frandsen CJ, Oh S, Jin S. Hydrophobic Nanopillars Initiate Mesenchymal Stem Cell Aggregation and Osteo-Differentiation. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):683-90.

Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994 Nov;56(3):283-94.

Bruder S P, Jaiswal N, Haynesworth S E. Growth kinetics, self-renewal, and the Osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive Subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem*. 64,279, 1997.

Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998 Jul;80(7):985-96

Buckingham M, Montarras D. Skeletal muscle stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Aug;18(4):330-6. Burgess W H, Maciag T. The eparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Ann Rev Cell Biol* 1989; 58:575-606.

Burt DW, Law AS. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res.* 1994;5(2):99-118.

Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007;450(7169):497–502.

Canfield AE, Doherty MJ, Wood AC, Farrington C, Ashton B, Begum N, Harvey B, Poole A, Grant ME, Boot-Handford RP. Role of pericytes in vascular calcification:a review. *Z Kardiol.* 2000;89 Suppl 2:20-7.

Cao Y, Zhou Z, de Crombrugghe B, Nakashima K, Guan H, Duan X, Jia S, Kleinerman ES. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Res.* 2005 Feb 15;65(4):1124-8.

Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 1994 Jul;21(3):429-35

Cassinelli C, Morra M, Bruzzone G. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implants surfaces: 2 in vitro experiments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003 January; 18 (1):46-52.

Celeste A J, Ross A J, Yamaji N, Wozney JM. The molecular cloning of human Bone morphogenetic proteins 10-11-12 three news members of the TGH β super Family. *J. Bone Miner Res* 1995.

Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Shirasaki Y, Ochiai N, Tateishi T. The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Dec 15;67(4):1170-80.

Chen L, Peng EJ, Zeng XY, Zhuang QY, Ye ZQ. Comparison of the Proliferation, Viability, and Differentiation Capacity of Adipose-Derived Stem Cells from Different Anatomic Sites in Rabbits. *Cells Tissues Organs.* 2011 Aug 19.

Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology.* 1994 Jan;134(1):277-86.

Choi CB, Cho YK, Prakash KV, Jee BK, Han CW, Paik YK, Kim HY, Lee KH, Chung N, Rha HK. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Nov10;350(1):138-46.

Chou YF, Zuk PA, Chang TL, Benhaim P, Wu BM. Adipose-derived stem cells and BMP2: Part 1. BMP2-treated adipose-derived stem cells do not improve repair of segmental femoral defects. *Connect Tissue Res.* 2011 Apr;52(2):109-18.

Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest.* 1993 May;91(5):1888-96.

Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res.* 2008 Oct;43(5):531-6.

Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005;309(5739):1369–1373.

Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol.* 2006 Mar;198(1):54-64.

Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J, Yin S, Liu W, Cao Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials.* 2007 Dec;28(36):5477-86.

Daley G Q, Goodell M A, Snyder E Y. Realistic prospects for stem cell Therapeutics. *Hematology* 2003; 1:394-418.

DeAngelis PL. Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: Implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria. *Anat Rec.* 2002 Nov 1;268(3):317-26.

De Jong DS, Vaes BL, Dechering KJ, Feijen A, Hendriks JM, Wehrens R, Mummery CL, van Zoelen EJ Olijve W, Steegenga WT. Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *J Bone Mine Res.* 2004 Jun;19(6):947-58.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101-9.

Desbaillets J, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies:An invitro Model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000;85:645-51.

Díaz Curiel M, Gil Hernández A, Mataix Verdú J. Nutrición y salud ósea. Ed Argón 2004. ISBN 84-609-0514-4.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7

Dorozhkin SV. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomater.* 2011 Sep 6.

Du C, Moradian-Oldak J. Tooth regeneration: challenges and opportunities for biomedical material research. *Biomed Mater.* 2006 Mar;1(1):R10-17.

Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Concise review: embryonic stem cells:a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells.* 2007 Mar;25(3):544-52.

Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Differentiation of osteoblasts from mouse embryonic stem cells without generation of embryoid body. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007 Jan;43(1):21-4

Eaker SS, Hawley TS, Ramezani A, Hawley RG. Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype. *Methods Mol Biol.* 2004; 263:108-117.

Egli D, Rosains J, Birkhoff G, Eggan K. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 2007;447(7145):679-685.

Epikhina SI, Latsinik NV. Proliferative activity of stromal cells--bone marrow precursors possessing clonogenic properties. *Biull Eksp Biol Med.* 1976 Jan;81(1):55-7

Falke G F, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr* 2000; 98(2): 103-105.

Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Fisher LW. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB J.* 2004 Apr;18(6):734-6.

Fedorovich NE, Haverslag RT, Dhert WJ, Alblas J. The role of endothelial progenitor cells in prevascularized bone tissue engineering: development of heterogeneous constructs. *Tissue Eng Part A.* 2010 Jul;16(7):2355-67.

Ferrara N. Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Cancer J.* 2007 Nov-Dec;13(6):345-8.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto- Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Jan 1;11(1):E47-51.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Mar 1;11(2):E151-7.

Flasza M, Shering AF, Smith K, Andrews PW, Talley P, Johnson PA. Reprogramming in interspecies embryonal carcinoma-somatic cell hybrids induces expression of pluripotency and differentiation markers. *Cloning Stem Cells* 2003;5(4):339–354.

Fodor W L. Tissue engineering and cell based therapies, from de bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 2003 Nov 13,1(1):102

Fraser JK, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z. Adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol.* 2008;449:59-67.

Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 1976;47:327-59

Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnić M, Vunjak-Novaković G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008 Dec;3(4):254-64.

Fu X, Sun X, Li X, Sheng Z. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo. *Lancet.* 2001 Sep 29;358(9287):1067-8.

Fulka J Jr, Loi P, Fulka H, Ptak G, Nagai T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends Biotechnol* 2004;22(6):279-283.

Gao X, Chen J. Direct Isolation of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2008 Aug;25(8):985-95.

Gardin C, Vindigni V, Bressan E, Ferroni L, Nalessi E, Puppa AD, D'Avella D, Lops D, Pinton P, Zavan B. Hyaluronan and fibrin biomaterial as scaffolds for neuronal differentiation of adult stem cells derived from adipose tissue and skin. *Int J Mol Sci.* 2011;12(10):6749-64.

Gascard C, Boulanger F, Lambilotte A, Depret S, Nelken B, Royez-Brovelli M, Mazingue F, Jouet JP, Subtil D. Cord blood collection for potential stem cell transplantation to a family member: the long-term experience of A level III maternity unit. *Presse Med.* 2008 Dec;37(12):1731-8.

Gehron-Robey P. Stem cells near the century mark. *J. Clin. Invest.* 2000; 105:1489-91.

Gimble JM, Guilak F. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol.* 2003;58:137-60.

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007 May 11;100(9):1249-60.

Girolamo L, Arrigoni E, Stanco D, Lopa S, Di Giancamillo A, Addis A, Borgonovo S, Dellavia C, Domeneghini C, Brini AT. Role of autologous rabbit adipose-derived stem cells in the early phases of the repairing process of critical bone defects. *J Orthop Res.* 2011 Jan;29(1):100-8. doi: 10.1002/jor.21184.

González Y, Posada A, Fariñas L, Meléndez M. Stem cells in cellular therapy: Ethical considerations. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2007 Dic; 26(4)

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 Jun;8(6):607-12.

Grinnell KL, Yang B, Eckert RL, Bickenbach JR. De-differentiation of mouse interfollicular keratinocytes by the embryonic transcription factor Oct-4. *J Invest Dermatol* 2007;127(2):372-380.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001 Oct;189(1):54-63.

Guerra DM, Giometti IC, Price CA, Andrade PB, Castilho AC, Machado MF, Ripamonte P, Papa PC, Buratini J. Expression of fibroblast growth factor receptors during development and regression of the bovine corpus luteum. *Reprod Fertil Dev.* 2008;20(6):659-64.

Halvorsen YD, Bond A, Sen A, Franklin DM, Lea-Currie YR, Sujkowski D, Ellis PN, Wilkison W, Gimble JM. Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism.* 2001 Apr;50(4):407-13.

Hamada T, Ui-Tei K, Miyata Y. A novel gene derived from developing spinal cords, SCDGF, is a unique member of the PDGF/VEGF family. *FEBS Lett.* 2000 Jun 16;475(2):97-102.

Hamada T, Ui-Tei K, Imaki J, Miyata Y. Molecular cloning of SCDGF-B, a novel growth factor homologous to SCDGF/PDGF-C/fallotene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan 26;280(3):733-7.

Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4 (suppl 3): S62-S68.

Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs.* 2004;178(1):2-12.

Haynesworth S E, Goshima J, Goldberg V, Caplan A I. Characterization of cells with osteogenic potential from human bone marrow. *Bone* 13, 81, 1992.

He Y, Zhang ZY, Zhu HG, Qiu W, Jiang X, Guo W. Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate. *J Craniofac Surg.* 2007 Jul;18(4):800-5.

Heineken F G, Skalar R. Tissue engineering: a brief overview. *J Biomechanical Engineering.* 1991;113: 111-120

Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, Laine J. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells*. 2007 Jan;25(1):197-202.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1283-316.

Hernández –Ramírez P, Dorticos-Balea E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Rev Cub Herat* 2004; 20(3): 1-17.

Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen YD, Hitt DC, Cooper LF, Gimble JM. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng*. 2004 Mar-Apr;10(3-4):371-80.

Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development*. 2003 Oct; 130(20):4769-84.

Hutmacher D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. Vol 21, 2000; p2529-2543.

Ichida J, Blanchard J, Lam K, Son E, Chung J, Egli D, et al. A small molecule inhibitor of TGF β signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing Nanog. *Cell Stem Cell* 2009;5:491–503.

Ide LM, Javazon E, Spencer HT. Transduction of murine hematopoietic stem cells and in vivo selection of gene-modified cells. *Methods Mol Biol*. 2008;433:213-28

Ilizarov G. Tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The Influence of stability of fixation and soft tissue preservation. *Clin Orthop Rel Res* 1989; 238:249-81

Ilizarov G. Tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II. The Influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Rel Res* 1989; 239:263-85

Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Oct;13(10):845-53.

Jeon O, Rhee JW, Kwon IK, Kim JH, Kim BS, Lee SH. In vivo bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue Eng Part A*. 2008 Aug;14(8):1285-94.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez 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 Jul 4; 418(6893) :41-9.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie C M. Multipotent Progenitor cells can be isolate from postnatal murine bone marrow, muscle and Brain Exp Hematol 2002;30:896-904.

Jimenez Planas A. Comportamiento de los materiales en el medio biológico. Biocompatibilidad de los materiales. Arte y Ciencia de los Materiales Odontológicos. Ed. Avances, 2003; cap 3.

Jones JR, Lee PD, Hench LL. Hierarchical porous materials for tissue engineering. Philos Transact A Math Phys Eng Sci. 2006 Jan 15;364(1838):263-81.

Jones JR, Lin S, Yue S, Lee PD, Hanna JV, Smith ME, Newport RJ. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation. Proc Inst Mech Eng H. 2010 Dec;224(12):1373-87.

Jovin IS, Giordano FJ. Differentiation by association: is a cell's fate determined by the company it keeps?. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 Apr;294(4):H1503-4.

Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. Cell Tissue Res. 2008 Jun; 332(3):469-78.

Junquera C, Martínez-Ciriano C, Castiella T, Serrano P, Azanza MJ, Junquera SR. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum. Presence of a single cilium. J Cell Mol Med. 2007 Jul-Aug;11(4):776-87.

Kabelitz D, Geissler EK, Soria B, Schroeder IS, Fändrich F, Chatenoud L. Toward cell-based therapy of type I diabetes. Trends Immunol. 2008 Feb;29(2):68-74.

Kadiyala S, Young R, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant. 1997 Mar-Apr;6(2):125-34

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. Nature 2009a-b; 458(7239):771–775.

Kakudo N, Shimotsuma A, Miyake S, Kushida S, Kusumoto K. Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold. J Biomed Mater Res A. 2008 Jan;84(1):191-7.

Kang, S. K., Putnam, L. A., Ylostalo, J., Popescu, I. R., Dufour, J., Belousov, A., and Bunnell, B. A. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. J. Cell Sci. 2004 Aug 15; 117, 4289–4299.

Kawaguchi J. Generation of osteoblasts and chondrocytes from embryonic stem cells. Methods Mol Biol. 2006;330:135-48

Kerbel R S. Tumor angiogenesis. *N Eng J Med.* 2008; 358: 2039-2049.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and Characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT4 and other embryonic stem cell markers. *CellsTissuesOrgans.* 2006; 184(34):105-16.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cell* 2006;24:1294-1301.

Khoury F, Antoun H, Missika P. Bone augmentation in oral implantology. London. Quintessence Publishing Co, Ltd. 2007.

Khurana S, Mukhopadhyay A. In vitro transdifferentiation of adult hematopoietic stem cells: An alternative source of engraftable hepatocytes. *J Hepatol.* 2008 Dec; 49(6):998-1007

Kim B S, Baez C E, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology.* Vol. 18, no. 1 (Feb 2000), p. 2-9.

Kim D, Monaco E, Maki A, de Lima AS, Kong HJ, Hurley WL, Wheeler MB. Morphologic and transcriptomic comparison of adipose- and bone-marrow-derived porcine stem cells cultured in alginate hydrogels. *Cell Tissue Res.* 2010 Sep;341 (3):359-70. Epub 2010 Aug 3.

Kim JB, Sebastian V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009;136(3):411-419.

Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastian V, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008;454(7204):646-650.

Kingsley DM, The TGF β superfamily: New members, new receptors, new genetic test of function in different organisms. *Genes Dev.* 1994; 8:133.

Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ, McIntosh KR. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;12(1):47-57.

Koç ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Feb;27(3):235-9.

Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells.* 2007 May;25(5):1270-8.

Koli K, Ryynänen MJ, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs)- 1 and – 3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human Mesenchymal stem cells. *Bone*. 2008 Oct;43(4):679-88

Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:898-903.

Koob S, Torio-Padron N, Stark B, Hannig C, Stankovic Z, Finkenzeller G. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A*. 2011 Feb;17 (3-4):311-21.

Körbling M, Estro Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N Eng J Med* 2003; 349:570-82

Krause DS, Theise N D, Collector M I, Henegariu O, Hwang S, Gardner R et al. Multiorgan, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105:369-377.

Kretlow JD, Spicer PP, Jansen JA, Vacanti CA, Kasper FK, Mikos AG. Uncultured marrow mononuclear cells delivered within fibrin glue hydrogels to porous scaffolds enhance bone regeneration within critical-sized rat cranial defects. *Tissue Eng Part A*. 2010 Dec;16(12):3555-68.

Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997 Sep;12(9):1335-47.

Kuznetsov SA, Luriia EA, Genkina EN. Stromal tissue differentiation in bone marrow organ cultures *Probl Gematol Pereliv Krovi*. 1978;23(11):42-8.

Laurencin CT, Attawia MA, Elgendi HE, Herbert KM. Tissue engineered bone regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices. *Bone*. 1996 Jul;19(1 Suppl):93S-99S.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260: 920-926.

Langman J. *Embriología Médica*. Ciudad de la Habana: Pueblo y Educación; 1977: 21-32

Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int*. 1993;53 Suppl 1:S102-6;

Laranjeira MS, Fernandes MH, Monteiro FJ. Innovative macroporous granules of nanostructured-hydroxyapatite agglomerates: Bioactivity and osteoblast-like cell behaviour. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Sep 15.

Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 10;26(17):2806-12.

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 (4-6):311-24.

Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*. 2004 Dec;32(6):370-3.

Leong DT, Nah WK, Gupta A, Hutmacher DW, Woodruff MA. The osteogenic differentiation of adipose tissue-derived precursor cells in a 3D scaffold/matrix environment. *Curr Drug Discov Technol*. 2008 Dec;5(4):319-27.

Levesque JP, Winkler IG. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the Art. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008 Feb;13(1):53-8.

Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. 2010 Jun;25(6):807-15.

Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Søballe K, Eriksen EF, Bünger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors *APMIS*. 1995 Feb;103(2):140-6.

Lindroos B, Aho KL, Kuokkanen H, Räty S, Huhtala H, Lemponen R, Yli-Harja O, Suuronen R, Miettinen S. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jul;16(7):2281-94

Logeart A, Anagnostou F, Bicos R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005 January; 9(1): 72-84.

López-Laguna M, et al. Marcaje de células madre mesenquimales derivadas de tejido Adiposo para su localización y seguimiento mediante RM en terapias de regeneración ósea. *Rev esp cir ortop traumatol*. 2011. doi:10.1016/j.recot.2011. 06.001.

López Moratalla N, González de la Tajada I. Human pluripotent stems cells I. *Rev Med Univ Navarra*. 2003 Jul-Sep;47(3):34-42.

Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, Bader A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2008 Nov;17(11):925-32

Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):2883-8.

Lu P, Blesch A, Tuszyński MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res*. 2004 Jul 15;77(2):174-91.

Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Jan 14; 60(2):184-98.

Ma S, Chan KW, Guan XY. In Search of Liver Cancer Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 2008 Sep;4(3):179-92

Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yacheccho R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):55-70.

Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface.* 2007 Dec 22;4(17):999-1030.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):115-37.

Mantur M, Koper O. Platelet- derived growth factor--the construction, role and it's receptors]. *Pol Merkur Lekarski.* 2008 Feb;24(140):173-6.

Marino G, Rosso F, Cafiero G, Tortora C, Moraci M, Barbarisi M, Barbarisi A. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study. *J Mater Sci Mater Med.* 2010 Jan; 21(1):353-63.

Martínez-Lorenzo MJ, Royo-Cañas M, Alegre-Aguarón E, Desportes P, Castiella T, García-Alvarez F, Larrad L. Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *J Orthop Res.* 2009 Nov;27(11):1499-507.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmie SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.

Maumus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumié A, Casteilla L, Sengenès C, Bourin P. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond).* 2011 Sep;35(9):1141-53. doi:10.1038/ijo.2010.269.

Matsushima A, Kotobuki N, Tadokoro M, Kawate K, Yajima H, Takakura Y, Ohgushi H. In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate. *Artif Organs.* 2009 Jun;33 (6):474-81.

Mauney J, Volloch V, Kaplan D. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering application: current status and future prospects. *Tissue Eng.* 2005 May;11(5-6): 787-802.

McCarthy T L, Centrella M, Canalis E. Insulin-like factor and bone. *Connect Tissue Res.* 1989; 20:277-282.

McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1246-53.

Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, Miettinen S, Suuronen R. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Mar;38(3):201-9.

Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2007 Oct;25(10):1177-81.

Mias C, Trouche E, Seguelas MH, Calcagno F, Dignat-George F, Sabatier F, Piercecchi-Marti MD, Daniel L, Bianchi P, Calise D, Bourin P, Parini A, Cussac D. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells*. 2008 Jul;26(7):1749-57.

Migliaccio S, Brama M, Spera G. The differential effects of bisphosphonates, SERMS (selective estrogen receptor modulators), and parathyroid hormone on bone remodeling in osteoporosis. *Clin Interv Aging*. 2007;2(1):55-64.

Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*. 2002;3(1):REVIEWS3001.

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray R, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell. antigen:isolation, characterization, and molecular cloning *Blood*. 1997 Dec. 15;90(12):5013-21.

Misch C, Ditsh F. Bone grafting materials in implant dentistry. *Implant dent*. Vol 2 (3) 1993

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Inmunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):376-85.

Miyazaki M, Masaka T, Akiyama I, Nakashima E, Sakaguchi M, Huh NH. Propagation of adult rat bone marrow-derived hepatocyte-like cells by serial passages in vitro. *Cell Transplant*. 2004;13(4):385-91.

Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*. 2003 Aug;70(4):300-6.

Mobasheri A, Csaki C, Clutterbuck AL, Rahmazadeh M, Shakibaei M. Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy. *Histol Histopathol*. 2009 Mar;24(3):347-66.

Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, Zuk P, Elbarbary A, Ashjian P, Benhaim P, Chen IS, Hedrick MH. Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther*. 2003 Jan 1;14(1):59-66.

Moyer-Mileur LJ, Slater H, Jordan KC, Murray MA. IGF-1 and IGF-Binding proteins and Bone Mass, Geometry and Strength: Relation to Metabolic Control in Adolescent Girls with Type 1 Diabetes. *J Bone Miner Res*. 2008 Jul 29.

Mrugala D, Bony C, Neves N, Caillot L, Fabre S, Moukoko D, Jorgensen C, Noël D. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Ann Rheum Dis*. 2008 Mar;67(3):288-95.

Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec;8 Suppl 2:S505-10.

Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1825-6.

Muñoz-Torres M, de la Higuera López-Frías M, Fernández García D. Advances in osteoclast biology: the osteoprotegerin-RANK ligand system. *Med Clin (Barc)*. 2004 Jan 24;122(2):75-7.

Na K, Kim SW, Sun BK, Woo DG, Yang HN, Chung HM, Park KH. Osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells in thermo-reversible hydrogel constructs containing hydroxyapatite and bone morphogenic protein-2 (BMP-2). *Biomaterials*. 2007 Jun;28(16):2631-7.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26(1):101–106.

Nakajima T, Iizuka H, Tsutsumi S, Kayakabe M, Takagishi K. Evaluation of posterolateral spinal fusion using mesenchymal stem cells: differences with or without osteogenic differentiation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007 Oct 15;32(22):2432-6. 42

Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. 2004 Jul 15;77(2):192-204.

Ng AM, Tan KK, Phang MY, Aziyati O, Tan GH, Isa MR, Aminuddin BS, Naseem M, Fauziah O, Ruszymah BH. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone. *J Biomed Mater Res A*. 2008 May;85(2):301-12.

Niemeyer P, Szalay K, Luginbühl R, Südkamp NP, Kasten P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomater*. 2010 Mar;6(3):900-8.

Ode A, Duda GN, Glaeser JD, Matziolis G, Frauenschuh S, Perka C, Wilson CJ, Kasper G. Toward biomimetic materials in bone regeneration: Functional behavior of mesenchymal stem cells on a broad spectrum of extracellular matrix components. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Sep 28

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448(7151):313–317.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuc I, Anderson S M, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701-705.

Ozeki M, Kuroda S, Kon K, Kasugai S. Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells into Osteoblasts in a Self-assembling Peptide Hydrogel: In Vitro and In Vivo Studies. *J Biomater Appl*. 2011 Mar;25(7):663-84

Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008 Jan 10;451(7175):141-6.

Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev*. 2010 Sep;6(3):367-80.

Patrick C W jr, Mikos A, McIntire L V. Prospectus of Tissue engineering, in “Frontiers inTissue Engineering” Ed CW Patrick, A G Mikos, L V McIntire, Elsevier Science Ltd, UK, 1998 p.3

Pearce DJ, Ridler CM, Simpson C, Bonnet D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2541-6.

Pecora AL. Progress in clinical application of use of progenitor cells expanded with hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol*. 2001 May;8(3):142-8.

Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1662-8.

Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Apr 15;117(5):1462-70.

Pera C. Cirugía: fundamentos, indicaciones y opciones técnicas. Tomo 2, Barcelona. Ed. Masson. 1996, Pp 124-126.

Petersen BE. Hepatic "stem" cells: coming full circle. *Blood Cells Mol Dis*. 2001 May-Jun ;27(3):590-600.

Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Lieberman JR. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng*. 2005 Jan-Feb;11(1-2):120-9.

Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl*. 2002;38:7-12.

Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des.* 2005;11(10):1255-65.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11):2896-902.

Picha M, Turano M, Tipsmark C, Borski R. Regulation of endocrine and paracrine sources of insulin-like growth factors and growth hormone receptor during compensatory growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) *J Endocrinol.* 2008 Oct;199(1):81-94.

Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A, Dozza B, Donati D, Marchetti C. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials.* 2010 May;31(13):3527-35.

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 Apr 2;284(5411):143-7.

Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004 Jul 9;95(1):9-20. Review

Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):216-40.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004 Feb 10;109(5):656-63.

Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003; 422:688-694

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):71-4

Prósper F, Verfaillie CM. Adult stem cells. *An Sist Sanit Navar.* 2003 Sep- Dec; 26(3): 345-56.

Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res.* 2006 Apr 1;312(6):727-36.

Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005 Apr;129(1):118-29

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 Jan 3; 346(1):5-15.

Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):702-12.

Ralston SH. Genetics of osteoporosis. *Proc Nutr Soc.* 2007 May;66(2):158-65.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie C M. Purification And ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitors Cells. *Blood* 2001; 98:2615-25.

Riancho-Moral J, González-Macías J. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del tejido óseo. Madrid. Jarpo editores SA. 2004

Rhee SC, Ji YH, Gharibjalian NA, Dhong ES, Park SH, Yoon ES. In vivo evaluation mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem Cells Dev.* 2011 Feb;20(2):233-42.

Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, Van der Pluijm G, Mintz KP, Young MF, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res.* 1993 Dec;8Suppl 2:S483-7.

Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res.* 2008 Jun 10;314(9):1937-44.

Rose FR, Cyster LA, Grant DM, Scotchford CA, Howdle SM, Shakesheff KM. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials.* 2004 Nov;25(24):5507-14.

Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem cell promise. *N Eng J Med* 2003;349: 267-74.

Rossant J. Developement of extraembryonic lineages. *Sem Cell Dev Biol* 1995; 6:237-47.

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 Oct;8(6):555-63.

Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone.* 1999 Jul;25(1):97-106

Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose- derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jun 7;294(2):371-9.

Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol.* 2004 Jun;187(2):319-28.

Sakai T, Li R, Weissel RD, et al. Fetal cell transplantation: a comparison of three cell types. *J. Thorac Cardiol Surg* 1999; 118:715-725

Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004 augut 9; 4(8): 743-65

Samartzis 7. D, Shen FH, Goldberg EJ, An HS. Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid anterior plate fixation? *Spine* 2005; 30:1756-61.

Samitier J. I Reunión anual de la Plataforma Española de Nanomedicina. Sept 2006 Barcelona.

Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 2007 Apr;25(4):818-27.

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 Jan 15;99(2):507-12.

Schliephake H, Knebel JW, Aufderheide M, Tauscher M. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Dec;30(6):531-7.

Schönau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism-problems and perspectives in paediatrics. *Horm Res.* 1997;48 Suppl 5:50-9.

Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res.* 2002 Jun;308(3):371-9.

Schwarz C, Leicht U, Drosse I, Ulrich V, Luibl V, Schieker M, Röcken M. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Vet Res Commun.* 2011 Dec;35(8):487-99.

Schwarz C, Leicht U, Rhote C, Drosse I, Luibl V, Röcken M, Schieker M. Effect of Different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Res Vet Sci.* 2011 Sep 20.

Secker GA, Daniels JT. Corneal Epithelial Stem Cells: Deficiency and Regulation. *Stem Cell Rev.* 2008 Sep;4(3):159-68

Seebach C, Henrich D, Kähling C, Wilhelm K, Tami AE, Alini M, Marzi I. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jun;16(6):1961-70.

Seibel MJ. Biochemical markers of bone remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003 Mar;32(1):83-113.

Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 4;328(1):258-64.

Shieh S J, Vacanti J P. State of the art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery* 2005 January; 137 (1): 1-7.

Shing T, Date I, Yoshida H, Ohmoto T. Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2002; 69:946-54

Shojaei F, Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*. 2002 Dec; 29 (6 suppl 16): 10-14.

Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res*. 2002 Oct;62(1):136-48.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19.

Skalar R, Fox C F. Tissue engineering. Granlibakken, Lake Tahoe: Proc workshop; New York: Liss; 1988.

Slivka MA, Leatherbury NC, Kieswetter K, Niederauer GG. Porous, resorbable, fiber-reinforced scaffolds tailored for articular cartilage repair. *Tissue Eng*. 2001 Dec; 7(6):767-80.

Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, Hsu SC, Smith J, Prockop DJ. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther*. 2004 May;9(5):747-56.

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 Mar 4;100(5):2397-402.

Stich S, Loch A, Leinhase I, Neumann K, Kaps C, Sittinger M, Ringe J. Human periosteum-derived progenitor cells express distinct chemokine receptors and migrate upon stimulation with CCL2, CCL25, CXCL8, CXCL12, and CXCL13. *Eur J Cell Biol.* 2008 Jun;87(6):365-76.

Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen.* 2001 Nov-Dec;9(6):429-42.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999 Jun;20(3):345-57.

Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J* 1997; 16(21):6510-6520.

Tadokoro M, Kanai R, Taketani T, Uchio Y, Yamaguchi S, Ohgushi H. New bone formation by allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in a patient with perinatal hypophosphatasia. *J Pediatr.* 2009 Jun;154(6):924-30.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5):861-872.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76

Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells . *Mol Biol Cell* 2005;16(12):5719-5735.

Tavassol F, Schumann P, Lindhorst D, Sinikovic B, Voss A, von See C, Kampmann A, Bormann KH, Carvalho C, Mülhaupt R, Harder Y, Laschke MW, Menger MD, Gellrich NC, Rücker M. Accelerated angiogenic host tissue response to poly(L-lactide-co-glycolide) scaffolds by vitalization with osteoblast-like cells. *Tissue Eng Part A.* 2010 Jul;16(7):2265-79.

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 Apr 4;416(6880):542-5

Theise ND. On experimental design and discourse in plasticity research. *Stem Cell Rev.* 2005;1(1):9-13.

Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 2000 Jan;31(1):235-40.

Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000 Jul;32(1):11-6.

Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 24;341(4):1135-40.

Tobin JF, Celeste AJ. Bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors as drug targets in cardiovascular and metabolic disease. *Drug Discov Today*. 2006 May;11(9-10):405-11.

Trejo J, Piriz J, Llorens-Martin M V, Fernandez AM, Bolós M, LeRoith D, Nuñez A, Torres-Aleman I. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Molecular Psychiatry* (2007) 12, 1118–1128; doi:10.1038/sj.mp.4002076; published online 11 September 2007

Tressler MA, Richards JE, Sofianos D, Comrie FK, Kregor PJ, Obremskey WT. Bone morphogenetic protein-2 compared to autologous iliac crest bone graft in the treatment of long bone nonunion. *Orthopedics*. 2011 Dec 6;34(12).

Trottier, V., Marceau-Fortier, G., Germain, L., Vincent, C., and Fradette, J. IFATS collection: using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells* 2008 Oct; 26, 2713–2723.

Tzannetou S, Efstratiadis S, Nicolay O, Grbic J, Lamster I. Comparison of levels of inflammatory mediators IL-1beta and betaG in gingival crevicular fluid from molars, premolars, and incisors during rapid palatal expansion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008 May;133(5):699-707.

Ulloa-Montoya F, Kidder BL, Pauwelyn KA, Chase LG, Luttun A, Crabbe A, Geraerts M, Sharov AA, Piao Y, Ko MS, Hu WS, Verfaillie CM. Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol*. 2007;8(8):R163.

Urrutia J, Mery P, Martínez R, Pizarro F, Apablaza D, Mardones R. Cultured autologous bone marrow stem cells inhibit bony fusion in a rabbit model of posterolateral lumbar fusion with autologous bone graft. *J Clin Neurosci*. 2010 Apr;17(4):481-5.

Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med*. 2001 May 17;344(20):1511-4.

Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng*. 2006;12:1137-42

Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006;10:569-76.

Van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*. 1994;10:251-337.

Varghese M, Olstorn H, Berg-Johnsen J, Moe M, Murrell W, Langmoen I. Isolation of Human Multipotent Neural Progenitors from Adult Filum Terminale. *Stem Cells Dev.* 2009 May;18(4):603-13.

Varkey M, Gittens SA, Uludag H. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. *Expert Opin Drug Deliv.* 2004 Nov;1(1):19-36

Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Feb;16(1):91-104

Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cell: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2002:369-91

Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* 2007 Dec;3(4):239-48.

Wang L, Fan H, Zhang ZY, Lou AJ, Pei GX, Jiang S, Mu TW, Qin JJ, Chen SY, Jin D. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2010 Sep 23.

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 Apr 24;422(6934):897-901.

Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448 (7151):318–324.

Weissman I L, Anderson D J, Gaje F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:387-403.

Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009 Apr 9;458 (7239):766-70.

World Health Organization. Assessment of fracture risk and its applications to Screening for menopausal osteoporosis. Report of a WHO study group. WHO Technical Report Series 843. Geneve 1994.

Wu G, Deng Z, Fan X, Ma Z, Sun Y, Ma D, Wu J, Shi J, Jin Y. Odontogenic Potential of Mesenchymal Cells from Hair Follicle Dermal Papilla. *Stem Cells Dev.* 2009 May;18(4):583-9.

Xu C, Wang Y, Yu X, Chen X, Li X, Yang X, Li S, Zhang X, Xiang AP. Evaluation of human mesenchymal stem cells response to biomimetic bioglass-collagen hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Jan;88(1):264-73

Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liu Z, Verfaillie C, Zweier J, Gupta K, Liu Z. MAPK/ERK signaling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J Cell Mol Med*. 2008 Feb 4.

Xu Y, Liu L, Li Y, Zhou C, Xiong F, Liu Z, Gu R, Hou X, and Zhang C. Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose derived stem cells in vitro. *Brain Res*. 2008 Nov 6; 1239, 49–55.

Xu Y, Malladi P, Wagner DR et al. Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. *Curr Opin Mol Ther*. 2005 Aug;7(4):300-5.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*. 2000 Aug;21(4):393-411.

Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):39-49.

Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010 Jun 10;465(7299):704-12.

Yang S, Leong K, Du Z, Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001 Decembre;7(6):679-689

Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med*. 2002 Jul;8(7):340-5.

Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 2007;39(3):295–302.

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):545-8.

Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int*. 2003. Jan; 72(1):2-4.

Yu G, Wu X, Dietrich MA, Polk P, Scott LK, Ptitsyn AA, Gimble JM. Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes. *Cytotherapy*. 2010 Jul;12(4):538-46.

Yu J, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917–1920.

Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT. Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 3;101 (31):11203-8.

Zavan B, Michelotto L, Lancerotto L, Della Puppa A, D'Avella D, Abatangelo G, Vindigni V, Cortivo R. Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues. *Neurol Res*. 2010 Feb;32(1):47-54.

Zeng L, Rahrmann E, Hu Q, Lund T, Sandquist L, Felten M, O'Brien TD, Zhang J, Verfaillie C. Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem Cells*. 2006 Nov;24(11):2355-66.

Zhang G, Zhou J, Fan Q, Zheng Z, Zhang F, Liu X, Hu S. Arterial-venous endothelial cell fate is related to vascular endothelial growth factor and Notch status during human bone mesenchymal stem cell differentiation. *FEBS Lett*. 2008 Jul 28.

Zhang X, He H, Yen C, Ho W, Lee LJ. A biodegradable, immunoprotective, dual nanoporous capsule for cell-based therapies. *Biomaterials*. 2008 Aug 9

Zhang Y, Fisher N, Newey SE, Smythe J, Tatton L, Tsaknakis G, Forde SP, Carpenter L, Athanassopoulos T, Hale SJ, Ferguson DJ, Tyler MP, Watt SM. The Impact of Proliferative Potential of Umbilical Cord-derived Endothelial Progenitor Cells and Hypoxia on Vascular Tubule Formation in vitro. *Stem Cells Dev*. 2009 Mar;18(2):359-75.

Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Lee ES, Tan LG, Mattar CN, Fisk NM, Choolani M, Chan J. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femora defects. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(4):608-20

Zheng B, Cao B, Li G, Huard J. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng*. 2006 Jul;12(7):1891-901.

Zhong X, Rescorla FJ. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: Understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Signal*. 2012 Feb;24(2):393-401

Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*. 2010 Jun 1;21(11):1783-7.

Zuk P, Chou YF, Mussano F, Benhaim P, Wu BM. Adipose-derived stem cells and BMP2: Part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res*. 2011 Apr;52(2):119-32.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):21

ÍNDICE DE VIDEOS.

Microscopia de intervalos:

Video 1. En el centro de la imagen una célula binucleada que mantiene constante su morfología. Sus 2 núcleos están en constante rotación y traslación. También se ven varias mitosis.

Video 2. Dinámica del cultivo. Las células se van alargando y adelgazando conforme confluye el cultivo.

Tinción con faloidina de las ADSC_s en la matriz de HA/Fibrina antóloga:

Video 3. Relación de una ADSC binucleada con la HA.

Videos 4 y 5. Las ADSC_s contactan mediante filopodios con la HA.

Video 6. Célula de morfología redondeada sobre unos gránulos de HA. Se ve la impronta de estos en la célula.

Tinción con faloidina de las ADSC_s en la matriz de fibrina antóloga:

Video 7. Disposición tridimensional, en la fibrina, de células con diferentes morfologías, incluida la de la mitosis.

Video 8. Disposición tridimensional de las células. Detalle de la disposición de la actina inmediatamente después de la mitosis.

Video 9. Cultivo control. Las ADSC_s en monocapa sobre la base de la placa de Cultivo.