



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**MÁSTER EN: ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA**

**ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2013-14

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Diferenciación *in vitro* de células madre  
aisladas de médula ósea ovina sobre  
biomateriales de colágeno y  $\beta$ -fosfato  
tricálcico.**

**Tania Fernández Vázquez**

**21 de Junio de 2014**

Trabajo fin de Máster dirigido por las Doctoras: Silvia M<sup>a</sup> Díaz Prado y Tamara Hermida Gómez

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTADO DE TABLAS, ILUSTRACIONES Y FIGURAS.</b>	
Tabla I: Tipos de biomateriales según su naturaleza.....	24
Tabla II: Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo.....	82
Ilustración 1: Corte trasnversal de tejido óseo y cartilaginoso.....	14
Ilustración 2: Fotografías de la obtención de células madre mesenquimales de oveja.....	32
Ilustración 3: Células en cultivo monocapa.....	42
Ilustración 4: Diferenciación adipogénica, revelada con tinción Oil Red-O.....	44
Ilustración 5: Diferenciación osteogénica revelada con tinción rojo alizarina.....	45
Ilustración 6: Tinciones histoquímicas realizadas a micromasas.....	46
Ilustración 7: Biomateriales de Col1 sembrados con CMMo y sus controles sin CMMo en presencia de medio osteogénico.....	47
Ilustración 8: Biomateriales de $\beta$ -FTC sembrados con CMMo y sus controles sin CMMo en presencia de medio osteogénico.....	48
Ilustración 9: Tinción H-E del biomaterial $\beta$ -FTC.....	49
Ilustración 10: Tinción H-E del biomaterial Col1.....	50
Ilustración 11: MEB para $\beta$ -FTC sin CMMo.....	51
Ilustración 12: MEB para el biomaterial de $\beta$ -FTC con CMMo.....	52
Ilustración 13: MEB de Col1 sin CMMo.....	53
Ilustración 14: MEB de Col1 con CMMo.....	54
Ilustración 15: MET de Col1 con CMMo.....	55
Ilustración 16: MET de $\beta$ -FTC con CMMo.....	56
Ilustración 17: Análisis de precipitados del biomaterial de Col1 mediante EDX.....	57
Ilustración 18: Análisis EDX localizado en precipitados extracelulares de los biomateriales de Col1.....	58
Ilustración 19: Análisis EDX de CMMo en biomateriales de Col1.....	59
Figura 1. Principio de ingeniería tisular ósea.....	20
Figura. 2: Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo.....	43

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

# INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. EL TEJIDO ÓSEO.....</b>	<b>13</b>
1.1.1. COMPONENTES CELULARES DEL HUESO.....	14
1.1.2. MATRIZ ÓSEA .....	15
1.1.3. LA OSIFICACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO.....	15
1.1.4. FUNCIONES DEL TEJIDO ÓSEO.....	16
<b>1.2. LA PÉRDIDA DEL TEJIDO ÓSEO.....</b>	<b>16</b>
1.2.1. INCIDENCIA Y TRATAMIENTO.....	16
<b>1.3. LA REGENERACIÓN ÓSEA.....</b>	<b>18</b>
1.3.1. INGENIERÍA TISULAR.....	18
1.3.1.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	21
1.3.1.2. BIOMATERIALES.....	22
Biopolímeros naturales:.....	23
Biopolímeros Sintéticos: .....	25
1.4.1.1. Ventajas del uso de células madres mesenquimales ovinas	26
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OVINAS.....</b>	<b>30</b>
3.1.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	30
3.1.2. EXTRACCIÓN Y CULTIVO DEL CONJUNTO CELULAR PRESENTE EN LA MÉDULA ÓSEA .....	30
3.1.3. CULTIVOS PARA EL MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OVINAS OBTENIDAS.....	32
<b>3.1.4. PREPLATING.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3. ESTUDIO DE LA MULTIPOTENCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....</b>	<b>34</b>
3.3.1. DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA.....	35
3.3.2. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.....	35
Diferenciación <i>in vitro</i> de CMMo sobre biomateriales de Col1 y $\beta$ -FTC.	

3.3.3. DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA.....	35
<b>3.6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y CITOLÓGICO.....</b>	<b>37</b>
3.6.1. VALORACIÓN DE CÉLULAS DIFERENCIADAS EN CULTIVO SOBRE BIOMATERIALES...	37
3.6.1.1. Microscopía de barrido.....	37
3.6.1.2. Microscopía de transmisión.....	38
3.6.1.2.1. Análisis de energía dispersiva de rayos x.....	38
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. POBLACIÓN CELULAR DE MÉDULA ÓSEA DE OVEJA.....</b>	<b>41</b>
4.1.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA POBLACIÓN CELULAR.....	41
4.1.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN CELULAR.....	41
4.1.3.1. Adipogénesis.....	42
4.1.3.2. Osteogénesis.....	43
4.1.3.3. Condrogénesis.....	44
4.1.3.4. Histoquímica.....	44
4.1.3.5. Inmunohistoquímica.....	45
4.1.4. CULTIVO Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE OVEJA SOBRE BIOMATERIALES.....	45
4.1.5. ANÁLISIS CITOLÓGICO E HISTOLÓGICO DE LOS BIOMATERIALES.....	47
4.1.6.1. Analisis morfométrico.....	49
4.1.6.1.1. Microscopía electrónica de Barrido.....	49
4.1.6.1.2. Microscopía electrónica de Transmisión.....	53
4.1.6.1.2.1. Análisis de energía dispersiva de rayos x.....	55
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>71</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
ANEXO 1:.....	80
Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo.....	80
ANEXO 2:.....	82
Estrategia de búsqueda bibliográfica:.....	82
ANEXO 3:.....	84
Consentimiento informado.....	84
ANEXO 4:.....	85
Difusión de los resultados obtenidos en el presente TFM.....	85

## Listado de abreviaturas

Abs: Absorbancia

Ac: Anticuerpo

AH: Acido hialurónico

AT: Azul de Toluidina

CHUAC: Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña

cm<sup>2</sup>: centímetros cuadrados

CMM: Célula madre mesenquimal

CMMh: Célula madre mesenquimal humana

CMMo: Célula madre mesenquimal ovina

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

Col1: Biomaterial de Colágeno I

COLI: Colágeno tipo 1

COLII: Colágeno tipo 2

*DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

E.E.: Error estándar

EDX: Energía dispersiva de rayos x

*FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting*

Fig.: Figura

h: Hora/s

H-E: Tinción hematoxilina-eosina

INIBIC: Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

MEB: Microscopía electrónica de Barrido

MEC: Matriz extracelular

MET: Microscopía electrónica de Transmisión

min: Minuto/s

ml: Mililitros

MM: Tricrómico de Masson Modificado

P/E: Penicilina/Estreptomina

rpm.: revoluciones por minuto

Rx: rayos x

S: Pase celular

SBF: Suero bovino fetal (*Fetal bovine serum*)

SO: Safranina O

STF: Suero de ternero fetal (*Fetal calf serum*)

*TFGβ3*: Factor de crecimiento transformante β3. (*Transforming Growth Factor Beta3*)

β-FTC: β-fosfato tricálcico

μm: Micras

# Resumen

---

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

## Resumen

El objetivo de este trabajo consistió en el aislamiento, cultivo, caracterización y diferenciación de células madre mesenquimales ovinas, para posteriormente cultivarse sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC con el fin de poder aplicarlas en un futuro en un modelo ovino de ingeniería tisular ósea.

La población celular aislada de médula ósea y cresta ilíaca de oveja, se caracterizó por citometría de flujo para marcadores hematopoyéticos y mesenquimales, además, se valoró su capacidad de diferenciación celular (adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis). Las muestras obtenidas se analizaron mediante técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica. Los resultados se valoraron mediante un análisis semicuantitativo y estadístico. Caracterizadas las células madre ovinas se crecieron sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC induciendo su diferenciación a hueso. Se analizó su crecimiento y diferenciación a hueso mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión, con un posterior análisis de energía de dispersión de rayos x.

La población celular obtenida resultó homogénea y de aspecto fibroblástico. La caracterización fenotípica mediante citometría de flujo resultó positiva para CD29, CD44, CD166 y negativa para el resto de antígenos testados en este trabajo. La diferenciación celular mostró porcentajes bajos de tinción en los análisis histoquímicos llevados a cabo, tanto de adipogénesis como condrogénesis, siendo algo mayor en la osteogénesis. Se obtuvo crecimiento superficial sobre ambos biomateriales, con crecimiento interno únicamente en biomateriales de Col1, en donde también se aprecia diferenciación osteogénica temprana.

Con los resultados obtenidos, si podemos determinar a día de hoy que la población celular aislada es una población de células madre mesenquimales y los biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC son adecuados para el crecimiento celular. Se aprecia una mejor predisposición con respecto a ello en el biomaterial de Col1, pero sería necesario un mayor número de

espécimens que nos permitan obtener más resultados para la diferenciación de la población celular sobre ambos biomateriales y poder llevar a cabo estudios estadísticos.

## Resumo

O obxectivo de este traballo consistiu no illamento, cultivo, caracterización e diferenciación de células nai mesenquimais ovinas, para posteriormente cultivarse sobre biomateriais de Col1 e  $\beta$ -FTC co fin de poder aplicalas nun futuro nun modelo ovino de enxeñaría tisular ósea.

A poboación celular aislada de médula ósea e cresta ilíaca de ovella, caracterizouse por citometría de fluxo para marcadores hematopoiéticos e mesenquimais, ademais, valorouse a súa capacidade de diferenciación celular (adipoxénese, osteoxénese e condroxénese). As mostras obtidas analizáronse mediante técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica. Os resultados valoráronse mediante unha análise semicuantitativo e estatístico. Caracterizadas as células nai ovinas, creceronse sobre biomateriais de Col1 y  $\beta$ -FTC induciendo a súa diferenciación a hueso. Analizouse o crecemento e a diferenciación a oso mediante microscopía electrónica de barrido e transmisión con posterior análise de enerxía de dispersión de raios x.

A poboación celular obtida resultou homoxénea e de aspecto fibroblástico. A caracterización fenotípica mediante citometría de fluxo resultou positiva para CD29, CD44, CD166 e negativa para o resto de antíxenos testados neste traballo. A diferenciación celular mostrou porcentaxes baixos de tinción nos análisis histoquímicos levados a cabo, tanto de adipoxénese como condroxénese, sendo algo maior na osteoxénese. Obtívose crecemento superficial sobre ambos biomateriales, cun crecemento interno unicamente en biomateriais de Col1, onde tamén se aprecia diferenciación osteoxénica temprá.

Cos resultados obtidos, si podemos determinar a día de hoxe que a poboación celular aislada é unha poboación de células nai mesenquimais e os biomateriais de Col1 e  $\beta$ -FTC son adecuados para o crecemento celular. Apreciase unha mellor predisposición con respecto a elo no biomaterial de Col1 pero sería necesario un maior número de doantes que nos permitan obter mais resultados para a diferenciación da poboación celular sobre ambos biomateriais e poder levar a cabo estudos estadísticos.

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

## Abstract

The objective of this work is the isolation, culture, characterization and differentiation of ovine mesenchymal stem cells cultured on biomaterials Col1 and  $\beta$ -FTC in order to apply them in the future in an ovine model of bone tissue engineering.

The isolated cell population of bone marrow and iliac crest of sheep was characterized by flow cytometry for hematopoietic and mesenchymal markers furthermore, its capacity for cellular differentiation (adipogenic, osteogenic and chondrogenic) was assessed. The samples were analyzed by techniques of histochemistry and immunohistochemistry. The results were assessed using a semiquantitative and statistical analysis.

Characterized ovine stem cells were grown on biomaterials Col1 and  $\beta$ -FTC inducing their differentiation into bone. Growth and differentiation of bone were examined by scanning and transmission electron microscopy with a subsequent analysis of energy dispersive x-ray.

The cell population obtained was homogeneous and fibroblastic appearance. Phenotypic characterization by flow cytometry was positive for CD29, CD44, CD166 and negative for other antigens tested in this work. Cell differentiation showed very low percentages of staining on the histochemical analyses conducted both adipogenic and chondrogenic, being somewhat higher in osteogenic. Growth on both biomaterials surface was obtained, with only ingrowth Col1 biomaterials. We were also observed early osteogenic differentiation.

With the results, we can determine today that the isolated cell population is a population of mesenchymal stem cells and Col1 or  $\beta$ -FTC biomaterials are suitable for cell growth. However we are not yet able to determine the biomaterials's ability of bone regeneration. Predisposition better appreciated concerning that the biomaterial of Col1 but a greater number of donors that allow us to get more results for the differentiation of the cell population on both biomaterials and to carry out statistical studies would be necessary.

# Introducción

---

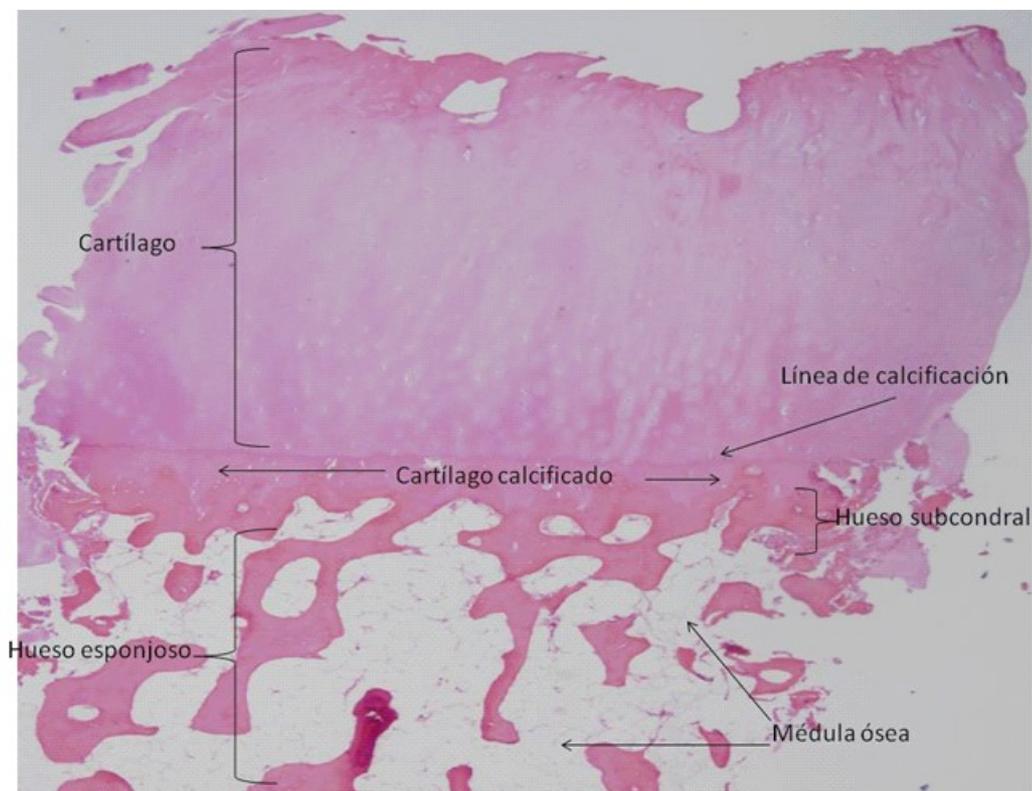
Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

## 1. Introducción

### 1.1. El tejido óseo

El tejido óseo es uno de los tejidos más fuertes del cuerpo humano, siendo el constituyente principal del esqueleto. La función principal del tejido óseo es soportar el peso de las estructuras blandas y la protección de órganos vitales mediante la formación de cavidades, como la cavidad que contiene y protege a la médula ósea, la cavidad del cráneo y la cavidad torácica.

El tejido óseo se encuentra altamente vascularizado y actúa como una gran fuente mineral, la cual sirve como reserva homeostática de los niveles de calcio en sangre (Lanyon E. L. *et al.*, 2009). Además, el tejido óseo actúa como punto de anclaje de las múltiples fuerzas que se generan durante la contracción muscular, transformándolas en movimientos corporales como por ejemplo la acción de caminar o de masticar (Arvidson K. *et al.*, 2010). De forma general observamos su disposición y localización (Ilustración 1)



Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

### 1.1.1. Componentes celulares del hueso

El tejido de hueso se caracteriza por regular la formación ósea, el mantenimiento y su reparación mediante cuatro tipos celulares diferentes. Los osteoblastos, las células de revestimiento óseo y los osteoclastos se encargan de recubrir las superficies óseas, mientras que los osteocitos se encargan de recubrir el interior de la matriz ósea (Bornstein M. *et al.*, 2009).

Los osteoblastos, formados a partir de la maduración de células osteoprogenitoras, juegan un papel fundamental en la osteogénesis (Shrivats R. A. *et al.*, 2014), formando una capa única que cubre toda la superficie perióstica y endóstea, en donde se produce una formación ósea activa. Además, se encargan de la síntesis, el ensamblaje y la mineralización de la matriz ósea (Bornstein M. *et al.*, 2009).

Las células de revestimiento óseo participan en el inicio de la reabsorción ósea mediante la liberación de factores de activación. Se caracterizan por presentar una escasa síntesis proteica y actividad metabólica (Bornstein M. *et al.*, 2009).

Los osteoclastos son células de la línea hematopoyética. Su función primaria es degradar la matriz del tejido además de participar activamente en la homeostasis ósea, a través de su implicación en el recambio e intercambio de iones, junto la detección de señales mecánicas óseas (Bornstein M. *et al.*, 2009).

Los osteocitos son moléculas de señalización para la comunicación de los diferentes componentes celulares del tejido, éstos se encuentran atrapados en la matriz ósea, e interconectados por prolongaciones citoplasmáticas a través de un denso sistema canalicular que permite la difusión de metabolitos (Bornstein M. *et al.*, 2009).

### 1.1.2. Matriz ósea

La matriz ósea está constituida por agua, minerales, colágeno y macromoléculas no colágenas de hueso, entre las que se encuentran las glicoproteínas, proteoglucanos y proteínas derivadas del plasma (Bornstein M. *et al.*, 2009).

El colágeno desempeña un papel estructural y morfológico importante, aportando un entramado para el asentamiento de los cristales minerales (Ilustración 1) al interactuar con las diferentes proteínas no colágenas de la matriz (Bornstein M. *et al.*, 2009).

La matriz ósea está formada por macromoléculas excretadas al ambiente extracelular por los osteoblastos, en donde se encuentran el osteoide o prehueso. En ella se lleva a cabo el depósito y mineralización del tejido.

En el frente de mineralización, a una determinada distancia del osteoblasto, encontramos el osteoide, que *a posteriori* se convertirá en hueso mineralizado (Bornstein M. *et al.*, 2009).

### 1.1.3. La osificación del tejido óseo

Existen dos modos diferentes de osificación: la osificación intramembranosa y la osificación condral (endocondral).

La osificación intramembranosa es aquella en la que el tejido conectivo sirve como plantilla para el depósito de matriz ósea. Mientras que la osificación condral es una osificación indirecta y se produce por la calcificación del cartílago de crecimiento (Bornstein M. *et al.*, 2009).

Varias investigaciones han demostrado que precursores de osteoblastos son derivados de células madre mesenquimales (CMM) y de líneas celulares osteoblásticas. Tanto las CMM como las líneas celulares osteoblásticas producen la mineralización de la MEC cuando se cultiva sobre una matriz tridimensional (Jones E. y Sanjurjo-Rodríguez C. 2014). La mineralización se ve mejorada por el crecimiento de las células sobre una matriz, la cual actúa como un biorreactor, encargado de mejorar el transporte de nutrientes que favorece la diferenciación (Sittichockechaiwut A. *et al.*, 2009).

#### **1.1.4. Funciones del tejido óseo**

El tejido óseo posee funciones que van más allá del mero soporte. Estas funciones son de vital importancia para el hueso, otorgándole de una capacidad excepcional de cicatrización, reparación y regeneración (Bornstein M. *et al.*, 2009).

### **1.2. La Pérdida del tejido óseo**

#### **1.2.1. Incidencia y tratamiento**

La pérdida de tejido óseo se ve desencadenada por un fracaso en la acción fisiológica normal del tejido. Esto puede ser debido a una fractura, a grandes defectos óseos después de un traumatismo o a una formación tumoral que requiera intervención quirúrgica (Seebach C. *et al.*, 2010; Rosset P. *et al.*, 2013).

Actualmente hay una gran cantidad de estrategias diferentes para aumentar el proceso de la regeneración ósea que ha sido alterada o es insuficiente, siendo el mejor de los métodos el auto injerto de hueso. El auto injerto de hueso, se caracteriza por ser un injerto seguro y efectivo, proporcionando así un sustrato natural para el crecimiento de las células, que serán reemplazadas y remodeladas en la nueva formación de hueso (Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011; Rosset P. *et al.*, 2013).

Por otra parte, el éxito clínico de un auto injerto es notable, presentando una gran fiabilidad para la zona dadora del paciente al no desencadenar ningún tipo de respuesta inmune, junto con un mayor potencial de diferenciación, con respecto a los demás injertos (Kokemüller. H. *et al.*, 2013). Pero su procedencia puede ser problemática, suponiendo problemas de morbilidad, dolor y posibles infecciones; además de una limitada disponibilidad de muestra (Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011; Shrivats R. A. *et al.*, 2014). La implantación de otro tipo de injerto, como el alo injerto, se encuentra altamente estandarizado y analizado de forma previa al implante, mediante el empleo de un biobanco óseo, el cual se encarga del procesamiento de las muestras óseas donadas. Este tipo de implantaciones se utiliza como tratamiento temporal (Shrivats R. A. *et al.*, 2014), junto con el uso de factores de crecimiento o soportes osteoconductivos (Dimitriou R. *et al.*, 2011). Por tanto, su utilización es limitada temporalmente por sus posibles rechazos inmunológicos (Seebach C. *et al.*, 2010; Oryan A. *et al.*, 2012).

Otra alternativa al alo injerto, son los xenoinjertos, que son injertos procedentes de otras especies. Comúnmente, estos xenotransplantes proceden en su mayoría de derivados de coral, pero también de cerdo u oveja. Entre sus beneficios se encuentran su teórica ilimitada disponibilidad. Pero como inconvenientes: su utilización es temporal, puede causar problemas inmunológicos, además de su potencial transmisión de enfermedades (Oryan A. *et al.*, 2012).

Como consecuencia de ello, hay un incremento en la demanda de injertos óseos sintéticos, como sustitutos, de manera que se puedan evitar las complicaciones anteriormente descritas (Seebach C. *et al.*, 2010; Shrivats R. A. *et al.*, 2014). A pesar de que la mayoría de los sustitutos óseos presentan las mismas propiedades beneficiosas de un autoinjerto, éstos no presentan todavía todos los beneficios de un hueso autólogo (Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011).

En vista de las limitaciones que los injertos sintéticos presentan y debido al aumento en la necesidad de injertos óseos disponibles, se han buscado terapias más avanzadas. De forma que, actualmente, la ingeniería tisular

incorpora también en su estrategia la terapia celular (Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011).

### 1.3. La regeneración ósea

En el tejido óseo se puede distinguir entre regeneración fisiológica y la regeneración reparativa (Bornstein M. *et al.*, 2009). Muchos tejidos están sometidos a una regeneración fisiológica, es decir, al reemplazo continuado de elementos celulares o tisulares, presentando reemplazamiento de células y matriz.

El hueso posee el potencial único de restaurar completamente su arquitectura original, pese a tener ciertas limitaciones. La inflamación juega un papel muy importante en el inicio del proceso de restauración, estimulando la angiogénesis de la zona dañada que necesita la reparación (González Suárez D. *et al.*, 2013). Los tipos celulares indispensables, e inmediatamente estimulados tras el proceso inflamatorio, son la producción de citosinas, factores de crecimiento e interleucinas que activan a las CMM, directamente involucradas en la reparación ósea (Rosset P. *et al.*, 2013). Además se produce la conjunción de varios procesos, que también se encuentran directamente involucrados, como un suministro de sangre muy abundante junto a una gran cantidad de células osteogénicas, citosinas y una matriz osteoconductiva que le proporcione un ambiente estable necesario en los procesos de reparación (Bornstein M. *et al.*, 2009; Rosset P. *et al.*, 2013).

#### 1.3.1. Ingeniería tisular

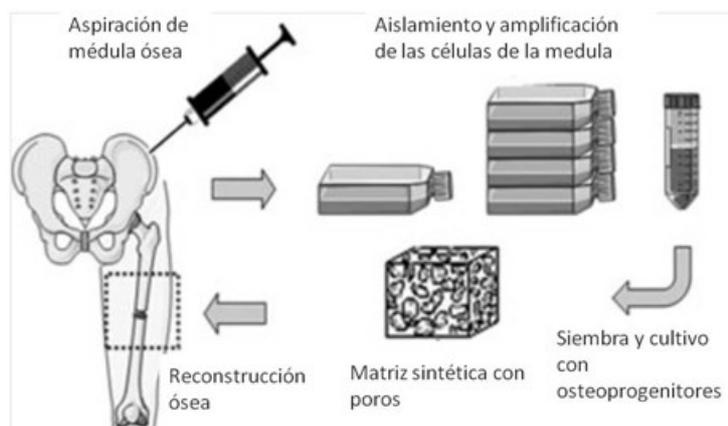
La ingeniería tisular está basada en la combinación de diferentes tipos celulares, como las CMM, con un soporte sintético adecuado y la producción de señales moleculares como factores de crecimiento y de diferenciación. Estas señales se observan también durante la formación de tejido en un individuo. De manera que se formará una construcción

que soporte la formación de tejido, permitiendo la adhesión, migración y organización celular (

Figura 1) (Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011; Paschos K. N. *et al.*, 2014).

La ingeniería tisular ósea debe encargarse, no solo de la restauración de las propiedades mecánicas del tejido, sino también de la generación de un tejido completamente funcional en términos de metabolismo de calcio, hematopoyesis y producción linfocítica (Paschos N.K. *et al.*, 2014).

La ingeniería tisular consiste, por tanto, en la obtención de una muestra del paciente, el cultivo *in vitro* de las células obtenidas (alcanzando un número adecuado) y su posterior siembra en una matriz adecuada, que servirá para implantarse en el mismo paciente. Una vez implantada tendrá lugar su diferenciación y regeneración tisular (Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011).



**Figura 1. Principio de ingeniería tisular ósea. Modificada de Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011.**

Cuando el tejido se ha perdido debido a una lesión o enfermedad se realiza un injerto óseo mediante materiales que permitan y favorezcan la reparación de los defectos óseos, proporcionando osteoconducción, soporte mecánico y estabilización (Bornstein M. *et al.*, 2009).

Los injertos óseos sintéticos o biomateriales, son sustitutos que deben no solo reemplazar el hueso perdido sino también alentar la osteointegración y la osteoconductividad. Además, deben actuar como un soporte que guíe el crecimiento óseo dentro del injerto (Seebach C. *et al.*, 2010) mientras el biomaterial se va degradando (Corrales P. L. *et al.*, 2014). El biomaterial para ello, debe estar compuesto de polímeros bioreabsorbibles que permitan la invasión y neo-formación de tejido óseo (Seechach C. *et al.*, 2010) y por tanto se produzca el mantenimiento de la viabilidad de las células y la regeneración del tejido óseo (Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011).

De manera que, con el tiempo, el hueso recién formado debe reemplazar la mayoría del injerto (Seebach C. *et al.*, 2010).

Uno de los problemas que se pueden presentar a la hora de colocar implantes realizados por ingeniería tisular, son posibles isquemias causadas por cambios asociados a cirugía o a la ingeniería vascular dentro del tejido. Las CMM juegan un papel muy importante en la angiogénesis, siendo muy utilizadas en cultivos de ingeniería vascular (González Suárez D. *et al.*, 2013). Como último objetivo de la ingeniería tisular está la creación de estructuras que puedan ser implantadas *in vivo* convirtiéndose en estructuras totalmente funcionales. Sin embargo, dicha funcionalidad, puede verse condicionada por posibles limitaciones en la capacidad de vascularización del implante (Paschos N.K. *et al.*, 2014).

Hay que tener en cuenta que en condiciones *in vitro*, al contrario que *in vivo*, no se produce esta limitación ya que el oxígeno no es limitante y accede por difusión (Paschos N.K. *et al.*, 2014).

### 1.3.1.1. Células madre mesenquimales

Las CMM son un tipo de células madre adultas capaces de dar lugar a los tejidos del mesoderma (Viña J. A. *et al.*, 2014).

El uso de las CMM, desde su descubrimiento, se ha visto expandido debido a las ventajas que presentan para la ingeniería y regeneración tisular de los tejidos. Gracias a sus características propias de autorrenovación junto con un alto potencial de diferenciación a diferentes linajes celulares, son responsables de la regeneración y mantenimientos de los tejidos mesenquimales adultos (Lyahyai J. *et al.*, 2012). Estas células son capaces de promover el crecimiento y la reparación del tejido, además de participar en su homeostasis y diferenciación terminal. Esta última es específica de CMM adultas capaces de sintetizar la matriz que componga el grueso del tejido (Paschos N. K. *et al.*, 2014).

Por otro lado, las CMM son beneficiosas en la ingeniería vascular como mejora de la señalización e interacciones celulares para promover la angiogénesis reduciendo los efectos de isquemia (Paschos K. N. *et al.*, 2014).

Por tanto, la utilización de las CMM, son muy buenas candidatas para su uso en terapia celular y tienen como objetivo la formación de tejidos de especialización, además, de ayudar a mejorar la diferenciación terminal de células que se encuentran a su alrededor (Lyahyai J. *et al.*, 2012).

Las CMM sirven como alternativa a trasplantes al no presentar reacciones adversas, siendo pues una alternativa a considerar frente a los aloinjertos, (Banasfsheh H. *et al.*, 2013) ya sea solas o combinadas con una matriz (Rosset P. *et al.*, 2013).

Las CMM son muy buenas precursoras de células osteoprogenitoras y son actualmente las células más apropiadas en la reparación ósea, debido a su gran potencial osteogénico, y su fácil obtención (Rosset P. *et al.*, 2013).

### 1.3.1.2. Biomateriales

Los biomateriales juegan un papel importante en la ingeniería tisular mejorando la fuerza mecánica y la integridad estructural de los injertos.

Se han desarrollado biomateriales que imiten lo máximo posible a las condiciones *in vivo* donde se pueden encontrar las células (Paschos N. K. *et al.*, 2014). De manera que para ser un buen sustituto óseo, éste debe presentar facilidad tanto en su manipulación como reabsorción, junto con una alta porosidad y osteoconductividad (Scaglione S. *et al.*, 2010).

En resultados previos se ha visto que la siembra de CMM ovinas (CMMo) solas y libres de cualquier tipo de matriz o biomaterial no producen propiedades osteogénicas (Viateau V. *et al.*, 2013). Por ello es importante la utilización de biomateriales que favorezcan su diferenciación y por tanto la regeneración ósea.

Los biomateriales utilizados hoy en día se pueden dividir en dos tipos: sintéticos y naturales (), los cuales comparten su estructura en 3D que imita lo máximo posible a la matriz extracelular (MEC) (Paschos N. K. *et al.*, 2014).

De todas las ventajas que supone la utilización de biomateriales, se presenta también la posibilidad de un diseño individualizado para cada paciente, debido a que cada una de las características específicas del biomaterial (como tamaño, forma y el grado de interconectividad de los poros) es diferente y característica para cada tipo de soporte (Seebach C. *et al.*, 2010). Por lo tanto, un biomaterial se adecuará mejor a unas indicaciones clínicas específicas frente a otro, con todo ello, se ha intentado desarrollar un biomaterial que imite lo máximo posible al tejido óseo maduro (Bornstein M. *et al.*, 2009). Para ello, se han construido materiales porosos con una composición 3D que recuerde a la estructura trabecular del tejido óseo. Entre los más comunes se encuentran los biomateriales con macroporos de fosfato cálcico (PCa), partículas de

Acido hialurónico (AH),  $\beta$  fosfato tricálcico ( $\beta$ -FTC) o mezclas bifásicas (BCP) (Gómez-Barrena E. *et al.*, 2011).

Hoy en día todavía no se ha identificado el biomaterial que cumpla todas las características ideales como sustituto óseo (Bornstein M. *et al.*, 2009).

<b>Biomateriales</b>	<b>Polímeros naturales</b>	<b>Polímeros sintéticos</b>
Colágeno	X	
Seda	X	
Alginato	X	
Acido Hialurónico	X	
Hidrogeles de péptidos	X	
Poliésteres		X
Copolimeros		X

**Tabla I: Tipos de biomateriales según su naturaleza.**

### Biopolímeros naturales:

Los polímeros naturales se caracterizan por presentar propiedades estructurales muy interesantes debido a su similitud con las estructuras naturales. Sus estructuras 3D son biocompatibles y biodegradables (Corrales P L. *et al.*, 2014).

**El colágeno**, como componente primario de hueso, es un buen candidato para el diseño de biomaterial como injerto óseo. Su biocompatibilidad y biodegradabilidad inherente estimula la proliferación y diferenciación de

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

las células al igual que lo hace en la MEC (Corrales P. L. *et al.*, 2014). Es un elemento básico de la MEC y ha sido extensamente usado debido a su abundancia, su biodegradabilidad y biocompatibilidad en la reparación de heridas y regeneración tisular. Además, el colágeno, además, no solo es una estructura de soporte, en el tejido, sino que también actúa como regulador del comportamiento celular, influyendo en su adhesión, migración y diferenciación. Su estructura porosa aporta una estructura tridimensional muy beneficiosa para el crecimiento celular (Ding L. *et al.*, 2014). Sin embargo, sus características mecánicas no son tan destacables (Corrales P L. *et al.*, 2014).

El **citosan** es un excelente polímero natural a considerar en la ingeniería tisular ósea, con muy buenas propiedades biodegradables, biocompatibles, antibacterianas y cicatrizadoras (Corrales P. L. *et al.*, 2014).

La **seda** es un polímero natural extensamente usado para aplicaciones de ingeniería tisular por su gran estabilidad, biocompatibilidad y flexibilidad morfológica. Siendo muy utilizada en la mejora y distribución de la estructura porosa de aquellos soportes que estén formados con fosfato cálcico (Corrales P. L. *et al.*, 2014).

El **alginato** también se caracteriza por ser un biomaterial interesante para la regeneración tisular, ya que es soluble en agua y permite la formación de geles a temperatura ambiente y en presencia de cationes. Además, el alginato suele utilizarse sobre biomateriales inertes, a modo de baño sobre sus superficies, lo cual consigue una mayor aproximación mimética a una estructura natural del biomaterial (Corrales P. L. *et al.*, 2014).

El **AH**, es también un biomaterial con potencial demostrado como soporte óseo y usándolo en combinación con otros materiales, factores o drogas

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

se ha visto su capacidad de inducción osteogénica (Corrales P. L. *et al.*, 2014).

Los **hidrogeles peptídicos** son una nueva clase de biomateriales que actualmente están siendo investigados por sus posibles aplicaciones en la ingeniería tisular. Son fácilmente modificables y sus unidades básicas hacen que este biomaterial también sea biocompatible y biodegradable (Corrales P. L. *et al.*, 2014).

### Biopolímeros Sintéticos:

Los **poliésteres**, tales como los ácidos poliglicólico y poliláctico junto con el policaprolactona, son los más comunes para aplicaciones de ingeniería tisular. Sus productos de degradación están presentes en el cuerpo humano, pudiendo ser eliminados por las mismas vías metabólicas naturales (Corrales P. L. *et al.*, 2014).

Los **copolímeros**, son generalmente, materiales atractivos para la aplicación en ingeniería de tejidos por sus propiedades fisicoquímicas. Estas propiedades los hace sumamente controlables, otorgándoles características mecánicas y propiedades de degradación muy aprovechables para este uso (Corrales P. L. *et al.*, 2014).

El  **$\beta$ -FTC** es el material más estudiado para la regeneración ósea (González Suarez D. *et al.*, 2013), debido a su composición característica, muy semejante a la fase inorgánica del tejido óseo (Scaglione S. *et al.*, 2010) junto con muy buenas propiedades osteoconductoras y de reabsorción (Bornstein M. *et al.*, 2009). Se ha visto que los biomateriales óseos basados en  $\beta$ -FTC muestran una rápida cicatrización ósea y reabsorción del biomaterial, creando un espacio para la regeneración del hueso (Bornstein M. *et al.*, 2009).

## 1.4. Modelos animales

### 1.4.1. Modelo animal ovino

#### 1.4.1.1. Ventajas del uso de células madres mesenquimales ovinas

En los últimos años, las CMM han adquirido un gran interés como nueva estrategia en la medicina regenerativa, junto con la posibilidad de combinación con los biomateriales adecuados y una posible aplicación clínica satisfactoria (Kalaszczynska I. *et al.*, 2013). Por ello, son interesantes los estudios preclínicos mediante modelos animales que se asemejen lo máximo posible a las características fisiológicas del humano. Para ello se utiliza, cada vez más, la oveja como modelo animal en investigación por su similitud con el ser humano en su relación tamaño/peso junto con la forma de regeneración y desarrollo del tejido óseo (McCarty C.R. *et al.*, 2008; Feitosa Tarja L. M. *et al.*, 2010). Posibilitando, además, una opción de gran interés como es el seguimiento y la evolución del espécimen durante un largo período de tiempo, pudiendo seguir procesos lentos de cicatrización (Atayade L.M. *et al.*, 2014). Por otro lado, el modelo animal de oveja presenta una serie de ventajas como su bajo coste, su disponibilidad y su aceptación ética (Atayade L.M. *et al.*, 2014). Otra de las ventajas del modelo animal ovino es su potencial de diferenciación ósea, habiendo mostrado que las CMMo son inmunológicamente privilegiadas para su aplicación como alotransplante (Berner A. *et al.*, 2013). Debido a que no se ha observado inmunorespuesta de forma preclínica, posibilita una cómoda utilización en la regeneración ósea con humanos (Berner A. *et al.*, 2013).

# Objetivos

---

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

## 2. Objetivos

1. Aislar y caracterizar morfológicamente, fenotípicamente y funcionalmente las células provenientes de cresta ilíaca y médula ósea ovina.
2. Estudiar la posible utilidad de los biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC como soporte para el cultivo de células ovinas aisladas.
3. Analizar la capacidad osteogénica de las células ovinas aisladas cultivadas sobre los biomateriales de Col1 y la posibilidad de formación de constructos osteogénicos.
4. Analizar la capacidad osteogénica de las células ovinas aisladas cultivadas sobre los biomateriales de  $\beta$ -FTC y la posibilidad de formación de constructos osteogénicos.

# Material y Métodos

---

### 3. Material y Métodos

#### 3.1. Obtención de muestras y aislamiento de células madre mesenquimales ovinas

##### 3.1.1. Obtención de las muestras

Las muestras de médula obtenidas pertenecen a diferentes ejemplares de ambos sexos de oveja (*Ovis Aries*).

En un primer momento se han obtenido muestras por aspirado de cresta ilíaca y posteriormente se han obtenido células de la médula, mediante lavados de la cabeza femoral, previo sacrificio y donación del animal tras estudios propios de la Unidad de Cirugía. De acuerdo con las directrices de la Unidad de Cirugía Experimental del Centro Tecnológico de Formación del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC).

Este estudio ha sido aprobado previamente por el comité ético correspondiente de experimentación animal.

##### 3.1.2. Extracción y cultivo del conjunto celular presente en la médula ósea

El procesado de las muestras se ha llevado a cabo siguiendo los protocolos estandarizados en el área de Cultivo Celular del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

Del primer espécimen se obtuvieron células mediante aspirado de la cresta ilíaca de oveja (Ilustración 2 A). Éstas se centrifugaron a 1500rpm durante 7 min, se retiró el sobrenadante por decantación, para obtener un precipitado de células (botón celular) y se resuspendió en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Lonza, España) suplementado al 20% (DMEM 20%) con suero bovino fetal (SBF) (*biowest*, Francia) y 1% penicilina estreptomina (P/E) (*Gibco*, Inglaterra). Posteriormente, se llevó a cabo la siembra de las células en placas de cultivo adherentes de 150 cm<sup>2</sup> con el medio de cultivo DMEM

20%. Las placas se introdujeron en una estufa a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridas 48 h, se realizó un lavado con suero salino (*Fresenius Kabi*, España) y se reemplazó el medio de cultivo, eliminándose las células no adherentes. A las placas de cultivo se les cambió el medio *DMEM* 20% cada 2-3 días.

Por otro lado, a partir de los últimos especímenes, se obtuvieron muestras de la cabeza femoral en condiciones de esterilidad. Éstas fueron sometidas a múltiples lavados, inyectando medio de cultivo *DMEM* suplementado al 5% con SBF y 1% P/E (*DMEM* 5%) (Ilustración 2B y C) mediante punciones con una jeringa estéril de 20 ml (*Kendall Monoject Syringe*, *Turquía*) a la que se le incorporó una aguja (BD *Microbalance*<sup>™</sup> 3, Irlanda) (Ilustración 2C).



**Ilustración 2: Fotografías de la obtención de células madre mesenquimales de oveja. A) Punción en la cresta ilíaca de oveja para la extracción de la muestra. B) Recogida de medio *DMEM* 5% con la jeringa en la placa. C) Punción de la jeringa en la médula e inyección del medio *DMEM* 5%. D, E y F) recogida del medio *DMEM* con las células de médula obtenidas tras los sucesivos lavados. G y H) gradiente de densidad mediante *Histopaque*<sup>®</sup> (*Sigma- Aldrich*, EE.UU.).**

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

Al finalizar los sucesivos lavados se recogió el medio resultante (Ilustración 2 D, E y F) y se procedió a la obtención de las células mononucleadas mediante gradiente de densidad empleando *Histopaque*® y siguiendo las indicaciones del proveedor (Ilustración 2 G y H).

Finalmente, las células de interés, que se encuentran en el botón celular, se resuspendieron en el medio de cultivo *DMEM* 20%. Posteriormente, se llevó a cabo el sembrado de las células en frascos de cultivo adherentes (*Costar Corning Incorporated*, EE.UU.) de 162cm<sup>2</sup> con medio de cultivo *DMEM* 20%. Los frascos se introdujeron en una estufa a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.1.3. Cultivos para el mantenimiento de las células madre mesenquimales ovinas obtenidas**

Cuando la confluencia celular fue de aproximadamente el 80%, se realizaron sucesivos subcultivos para aumentar el número de CMMo que nos permitiesen poder iniciar los experimentos. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavaron los frascos con suero salino y se incubaron a 37°C durante 2-3 min con tripsina-EDTA al 2X (*Sigma Aldrich* Química S.A., España). Para comprobar que las células no seguían adheridas a las placas, se observaron éstas a través de un microscopio invertido IX51 (*Olympus* España S.A., España) y una vez observado que las células no se encontraban adheridas a la placa, se inactivó la tripsina con medio *DMEM* 5%. Se recogió la suspensión y se centrifugó durante 7 min a 1500rpm. El botón celular se resuspendió en medio de cultivo *DMEM* 20% con un volumen conocido para poder repartirlo equitativamente en un número mayor de frascos para su expansión.

### 3.1.4. Preplating

La técnica de *preplating* es un procedimiento necesario en los primeros dos pases de nuestro cultivo celular para la eliminación de fibroblastos y macrófagos que pudieran ser arrastrados en la obtención de la muestra de CMMo.

La técnica se basa en la rápida capacidad de adhesión de los macrófagos y fibroblastos frente a una capacidad de adhesión más lenta de las CMMo.

Por tanto, la técnica consiste en que cuando las células están al 80% de confluencia, se elimina el medio de cultivo *DMEM* 20%, se realiza un lavado con suero salino, se añade tripsina y cuando las células no están adheridas, se procede a su inactivación dejando las placas a 37°C durante 15 min. Este tiempo será suficiente para la adhesión temprana de fibroblastos y macrófagos, frente a las CMMo que todavía se encontrarán en suspensión. Tras este tiempo, se recogerá esa suspensión y se centrifugará a 1500 rpm durante 7 min. El botón celular obtenido se resuspenderá en *DMEM* 20%, en un volumen conocido, para dividirlo equitativamente en un número mayor de placas que facilite la expansión del cultivo y conseguir así un número suficiente de células para iniciar los experimentos.

### 3.2. Caracterización fenotípica de las células madre mesenquimales mediante citometría de flujo

Para realizar el análisis de la expresión de los marcadores de superficie celular se analizaron las muestras de un espécimen macho y dos hembras en un citómetro de flujo FACScalibur (*Becton-Dickinson*, España). Se emplearon, para ello, Anticuerpos (Ac) para los siguientes marcadores: CD29, CD34, CD44, CD45, CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271, STRO, SSEA- 4 y antifibroblasto (Tabla II).

Tras la tripsinización de las células de cada espécimen se resuspendieron en tampón *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS; BD Biosciences)*,

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

en una placa de 96 pocillos (NUNCTM, VWR *International*, Dinamarca) y se transfirieron  $2 \times 10^5$  células/pocillo. Se centrifugó a 1500 rpm 5 min, se eliminó el sobrenadante y se homogeneizó la suspensión celular en un agitador.

Se procedió a una primera incubación añadiendo los Ac primarios para cada marcador en los pocillos correspondientes y se incubó durante 40 min a 4°C en oscuridad. Tras la primera incubación, se realizaron dos lavados con tampón *FACS* junto con dos centrifugaciones.

Finalmente se realizó una segunda incubación de 30 min a 4°C en oscuridad en aquellos pocillos en los que era necesario el marcaje con un Ac secundario *polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/FITC Rabbit F (ab')<sub>2</sub>* (*Dako Cytomation*, EE.UU.) y se realizaron otros dos lavados con *FACS* junto con dos centrifugaciones. Posteriormente, se traspasaron las células a tubos de citometría en un volumen final de 200 µl.

El análisis se realizó utilizando el citómetro junto con el programa *Cell-Quest* (Becton Dickinson, EE.UU.), observándose el porcentaje de positividad de cada uno de los marcadores.

### **3.3. Estudio de la multipotencialidad de las células madre mesenquimales**

Para valorar la capacidad de diferenciación de las poblaciones celulares (procedente de ovejas hembra y macho), se cultivaron las células en distintos tipos de medio de cultivo, para estimular la diferenciación de estas células hacia 3 linajes celulares diferentes, todas ellas de origen mesenquimal: adipocitos, osteoblastos y condrocitos.

### 3.3.1. Diferenciación adipogénica

Las células se sembraron en una *chamber-slide* (BD Falcon, Francia) en una densidad de  $10 \times 10^3$  células/pocillo. El primer día se incubaron con medio *DMEM* 20% hasta alcanzar la confluencia. Tres de esos pocillos se cultivaron con el kit *Bullekit Adipogenic Differentiation Medium* (Lonza, Bélgica) de diferenciación adipogénica para inducir la adipogénesis. Este kit está compuesto por un medio de inducción adipogénico y otro de mantenimiento, los cuales se alternaron cada tres días, comenzando la estimulación con el medio de inducción. El cuarto pocillo se utilizó a modo de control negativo de la diferenciación, cultivando las células sólo con *DMEM* 20%.

Transcurridos 21 días, se eliminó el medio de estimulación y el medio *DMEM* 20% de la *chamber-slide*. Los pocillos fueron lavados con suero salino y se fijaron las células, para su posterior tinción, con paraformaldehído al 4% (Panreac Química S.A., España). La tinción se llevó a cabo con el colorante *Oil Red O* (*Sigma Aldrich* Química S.A., España) y para este colorante se determinó mediante el programa informático. Analysis D de Olympus (Olympus).

### 3.3.2. Diferenciación osteogénica

Para poder testar la diferenciación osteogénica, las células se sembraron en una *chamber-slide* en una densidad de  $10 \times 10^3$  células/pocillo. Se cultivaron en cuatro pocillos y durante el primer día se incubaron con medio *DMEM* 20% hasta alcanzar confluencia. En tres pocillos se trataron las células con el medio de diferenciación osteogénica *hMSC Bullekit Osteogenic Differentiation Medium* (Lonza, Bélgica) para inducir la osteogénesis y un cuarto pocillo se utilizó a modo de control negativo sólo con *DMEM* 20%. Tras 21 días se fijaron las células en paraformaldehído y se tiñeron con Rojo Alizarina (*Sigma Aldrich* Química S.A., España) y para este colorante se determinó mediante el programa informático. Analysis D de Olympus (Olympus).

### 3.3.3. Diferenciación condrogénica

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

Para testar la diferenciación condrogénica se utilizó la técnica de formación de micromasas (Johnstone *et al.*, 1998). Para ello, se sembraron con una densidad celular de  $25 \times 10^4$  células en tubos con fondo cónico de polipropileno (J.C. Catalán S.L., España). Se cultivaron de cada espécimen dos réplicas para la estimulación condrogénica y una réplica para control de condrogénesis cultivadas en *DMEM* 20%.

Para la formación de las micromasas, las células se centrifugaron a 1500rpm durante 7 min. La formación de este agregado tridimensional por parte de las células facilita la comunicación celular, y por tanto, la formación de MEC.

El medio de estimulación condrogénica utilizado fue *hMSC Bullekit Osteogenic Differentiation Medium* (Lonza, Bélgica) suplementado con TFG $\beta$  3 10ng/ml (Prospec, EE.UU.)

A los controles de condrogénesis, se les añadió tras la siembra de las células *DMEM* 20%. Las muestras se mantuvieron en cultivo durante 21 días y se reemplazó el medio cada tres días.

Una vez transcurrido este tiempo, las micromasas se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se cortaron en el microtomo. A los cortes se les realizaron diferentes tinciones histológicas como Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrómico de Masson Modificado (MM), Azul de Toluidina (AT) y Safranina O (SO).

### **3.4 Tipos y descripción de biomateriales utilizados**

Los biomateriales fueron suministrados por la empresa italiana *Opocrin, S.P.A., Corlo di Formigine-Modena* para el caso del colágeno tipo 1, mientras que el  $\beta$ -FTC fue suministrado por el Instituto Coruñés de Implantología Oral y Cirugía (Iciro). Para este estudio, los biomateriales de  $\beta$ -FTC presentaron una granulometría de 1000-2000  $\mu$ m.

### **3.5. Cultivo tridimensional de las células madre mesenquimales sobre los biomateriales**

#### **3.5.1. Siembra del grupo celular en los biomateriales**

En una placa estéril de 24 pocillos (*Costar Corning Incorporated*) para cada espécimen, se introdujo el biomaterial de Col1, previamente cortado con un sacabocados de 1 cm<sup>2</sup>, de forma independiente en cada pocillo correspondiente de la placa.

Se incluyeron entonces para cultivo 6 réplicas de biomaterial y células, sembrando un total de 2x10<sup>5</sup> células /cm<sup>2</sup> y 2 réplicas control con el biomaterial sin células.

Para el primer biomaterial de β-FTC se utilizaron también 6 réplicas de tubos de polipropileno con el biomaterial y células, sembrando un total de 2x10<sup>5</sup> células/ tubo, y dos replicas control sin células.

#### **3.5.2. Cultivo**

A cada pocillo de la placa y a cada tubo de polipropileno se le añadió medio osteogénico de diferenciación *hMSC Commercial Chondrogenic Differentiation Medium*. Cada 3 días se recogió el sobrenadante de cada pocillo y cada tubo para cambiarlo por medio nuevo. Los sobrenadantes retirados, en cada cambio de medio de cultivo, se congelaron en tubos independientes a -20°C.

Tras 30 días de diferenciación, se recogieron ambos biomateriales para realizar análisis histológico/citológicos, análisis de expresión génica y análisis de microscopía.

### **3.6. Análisis histológico y citológico**

#### **3.6.1. Valoración de células diferenciadas en cultivo sobre biomateriales**

##### **3.6.1.1. Microscopía de barrido**

A los biomateriales con células y a los biomateriales control sin células se les realizaron varios lavados con suero salino. Se fijaron con tampón

cacodilato y glutaraldehído al 3% diluido en tampón cacodilato continuándose el protocolo en los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI). Una vez allí, las muestras se tiñeron con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, ya que éste es miscible con el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). El  $\text{CO}_2$  se eliminó en un equipo de deshidratación en punto crítico Bal-Tec CPD 030 (Balzers, Alemania) y posteriormente, se realizó una metalización en oro con un equipo de electrodeposición catódica Bal-Tec SCD 004 (Balzers). Las muestras se observaron en un microscopio de barrido (MEB) (JEOL JSM-6400, Japón), para un análisis morfométrico de las CMMo diferenciadas sobre cada biomaterial.

### **3.6.1.2. Microscopía de transmisión**

A los biomateriales con células se les realizaron varios lavados con suero salino. Se fijaron con tampón cacodilato y glutaraldehído al 3% diluido en tampón cacodilato. En el SAI, se continuó el proceso y se realizó una tinción biológica con  $\text{OsO}_4$ , para ofrecer un mayor contraste debido a su unión a los lípidos. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona y se incluyeron en Spurr. Se realizaron cortes en un ultramicrotomo *Reichert Ultracut E* (Leica, Alemania) y se observaron en un microscopio de transmisión (MET) (JEOL JEM 1010, Japón), para un análisis ultraestructural de las CMMo diferenciadas sobre cada biomaterial.

#### **3.6.1.2.1. Análisis de energía dispersiva de rayos x**

Para la realización de esta técnica de análisis de energía dispersiva de rayos x (EDX) se obtuvo una sección transversal de la muestra previamente incluida en spurr, según el protocolo habitual para MET. Con la ayuda de un ultramicrotomo se obtuvieron secciones de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de grosor, que fueron recogidas y depositadas en un portaobjetos de MEB. La muestra se dejó secar al aire libre y a continuación se recubrió con una fina capa de carbono grafito puro. Para el recubrimiento de la muestra se realizó la técnica de evaporación de carbono al vacío y posterior depósito por gravedad sobre esta en un

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

equipo BAL-TEC CEA 035. Posteriormente, se analizó en un MEB (JEOL JSM-6400) equipado con un sistema de microanálisis química por dispersión de energía de rayos x (OXFORD INCA ENERGY 200, Inglaterra).

### **3.7. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa SPSS 19.0 (IBM, España). Los p-valores <0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar (E.E.).

# Resultados

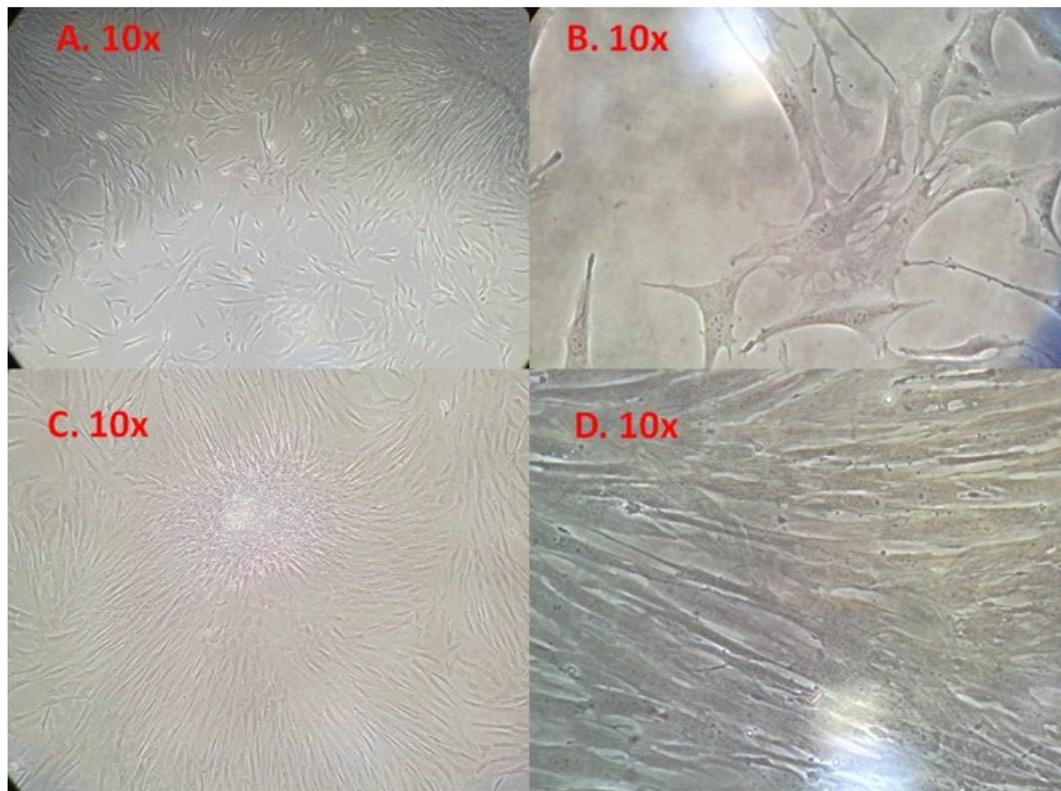
---

## 4. Resultados

### 4.1. Población celular de médula ósea de oveja

#### 4.1.1. Caracterización morfológica de la población celular

La población celular obtenida tiene una morfología irregular y con grandes prolongaciones citoplasmáticas, típicamente fibroblástica, siendo característica de CMM (Ilustración 3).



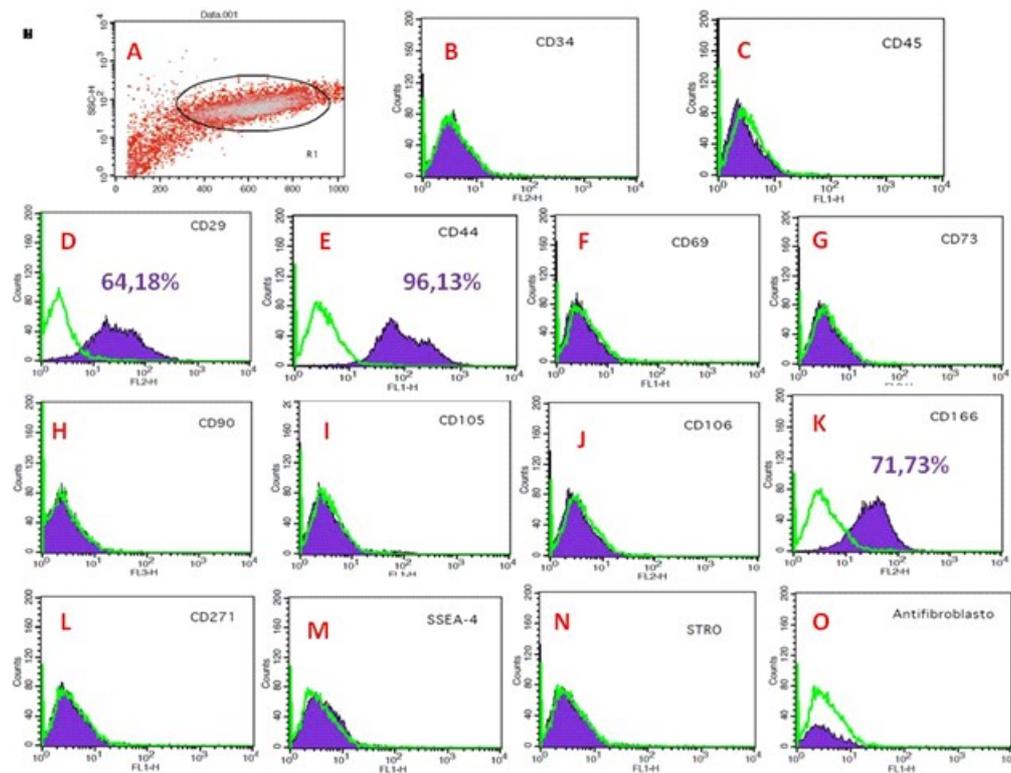
**Ilustración 3: Células en cultivo monocapa. A y B: CMMo en fase celular 14 (S14). C y D: CMMo en S13.**

#### 4.1.2. Caracterización fenotípica de la población celular

La población de células fue caracterizada fenotípicamente por citometría de flujo, probándose la expresión de diferentes receptores de membrana descritos para las CMMh y CMMo. Esta población celular (Figura. 2 A) resultó negativa para los antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45 (Fig. B y C), mientras que para los antígenos CD29, CD44 y CD166 descritos en la bibliografía para CMMo (Figura. 2 D, E y K) la población celular

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

mostró positividad. Para el resto de antígenos descritos para CMMh, la citometría resultó negativa: CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD271, SSEA4, STRO y antifibroblasto (Fig. 2 F, G, H, I, J, L, M, N y O).



**Figura 2: Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo. A:** Población de células acotada en una región donde son más homogéneas. **B y C:** En verde el histograma correspondiente al fluorocromo control comparándolo con el histograma violeta, correspondiente a la fluorescencia para el anticuerpo utilizado en cada caso. En este caso nos indican negatividad para los anticuerpos de células hematopoyéticas, CD34 y CD45. **D, E y K:** muestran rangos de fluorescencia positivos frente a sus controles, para anticuerpos de células madre mesenquimales, CD29, CD44 y CD166. **F, G, H, I, J, L, M, N y O:** nos indican negatividad para cada uno de estos anticuerpos testados.

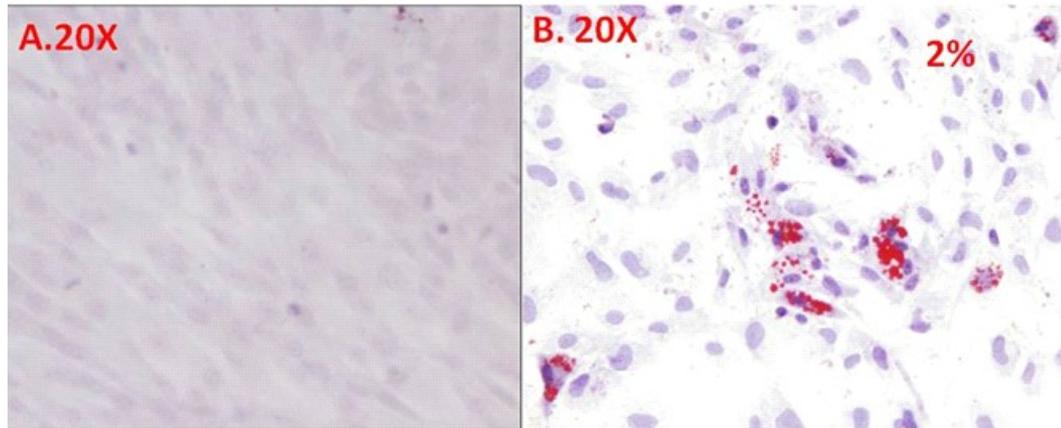
#### 4.1.3. Potencial de diferenciación de las células estudiadas

##### 4.1.3.1. Adipogénesis

Después de cultivar las células en medio de diferenciación adipogénica y teñirlas con *Oil Red O*, se observó que sólo un 2% de media de las células presentaban las vacuolas lipídicas típicas de adipocitos (Ilustración 4). El control negativo de diferenciación no fue cuantificado debido a no presentar tinción.

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

### Tinción Oil Red O-adipogénesis



A. Control sin estimular

B. Células estimuladas

Ilustración 4: Diferenciación adipogénica, revelada con tinción *Oil Red-O*.

#### 41.3.2. Osteogénesis

Tras cultivar las células en medio de estimulación osteogénica y teñirlas con Rojo Alizarina, se observó que células presentaban depósitos cálcicos, característicos de la diferenciación osteogénica, en un 81% de media de los precipitados de PCa (Ilustración 5). El control negativo de diferenciación no fue cuantificado debido a no presentar tinción.

### Tinción Rojo alizarina-osteogénesis

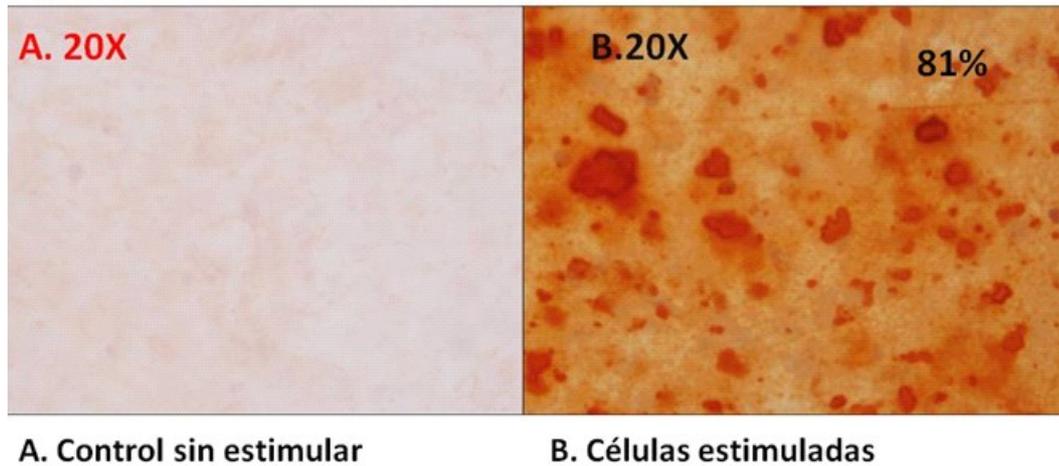
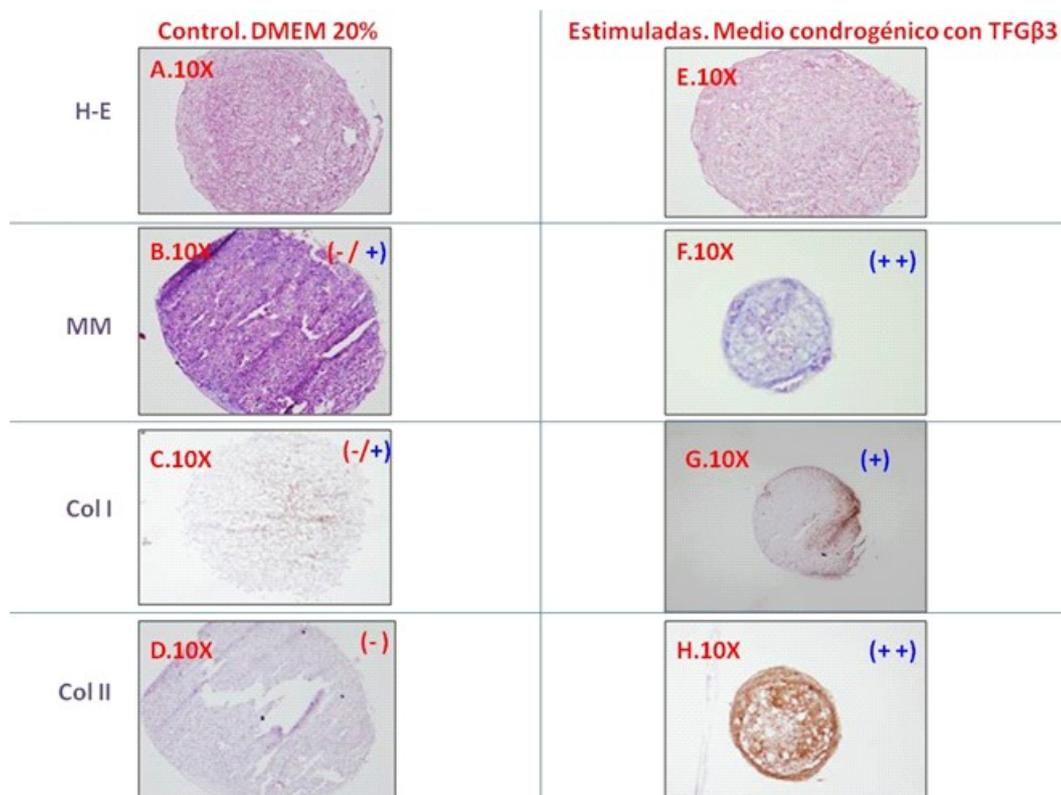


Ilustración 5: Diferenciación osteogénica revelada con tinción rojo alizarina.

#### 4.1.3.3. Condrogénesis

#### 4.1.3.4. Histoquímica

La tinción con HE revela, tanto en las micromasas estimuladas (Ilustración 6 E) como en las no estimuladas (Ilustración 6 A), la estructura celular de la micromasa. Se observan células de aspecto redondeado con núcleos resaltados con una coloración azulada y los citoplasmas de color rosa, de apariencia condrocítica. La tinción con MM evidencia una coloración azulada en las micromasas estimuladas (Ilustración 6 F) debido a la presencia de colágeno. Sin embargo, en las micromasas presentan una ligera coloración azulada para las no estimuladas. (Ilustración 6 B).



**Ilustración 6: Tinciones histoquímicas realizadas a micromasas. A, B, C y D: Micromasas control en DMEM 20%. E, F, G y H: Micromasas estimuladas.**

#### 4.1.3.5. Inmunohistoquímica

Con respecto a los análisis de Col I y Col II, se observa una fuerte tinción positiva de Col II y una tinción débil de Col I para las micromasas estimuladas ( Ilustración 6 G y H). Con respecto a las micromasas no estimuladas se observa para Col II, ningún tipo de tinción positiva (Ilustración 6 D), mientras que en el caso del Col I aparece una ligera tinción (Ilustración 6 C).

#### 4.1.4. Cultivo y crecimiento de células madre mesenquimales de oveja sobre biomateriales

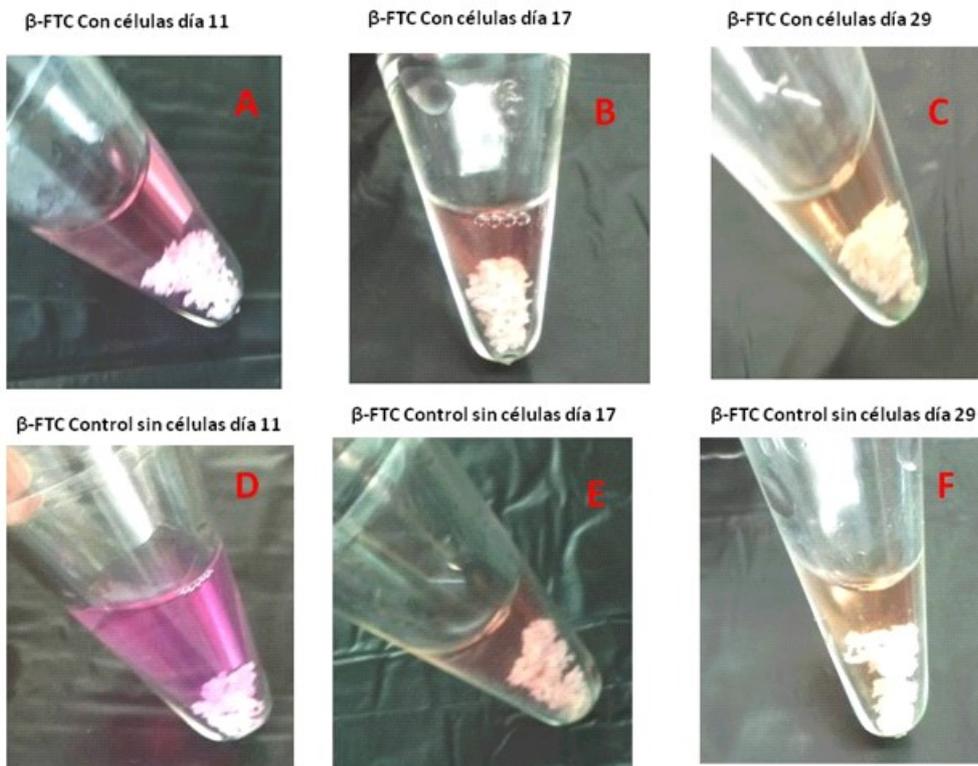
Tras sembrar las CMMo sobre los biomateriales de Col1, se pudo observar cambios en la morfología del biomaterial (Ilustración 7) en donde a simple vista se aprecia, como con el paso del tiempo de cultivo, se reduce el tamaño del biomaterial. A mayores se observan cambios en la morfología, debido a una mayor colonización de las células en la parte central de este biomaterial. Esta disposición celular solo es apreciable al posicionar la placa a contra luz.

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y β-FTC.**



**Ilustración 7: Biomateriales de Col1 sembrados con CMMo y sus controles sin CMMo en presencia de medio osteogénico. A: Réplicas de biomateriales con CMMo y sus controles sin CMMo, tras 11 días de cultivo. B: Réplicas de biomaterial con CMMo con sus controles, tras 17 días. C: tras 29 días.**

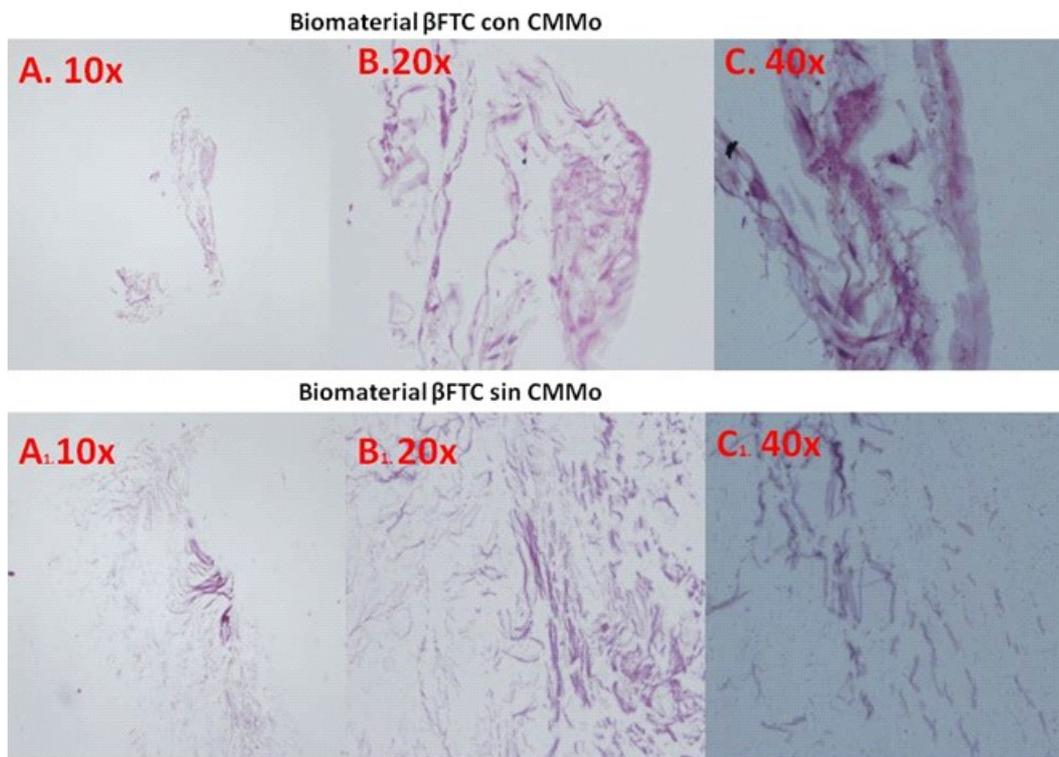
Por otra parte, en la siembra de los materiales de  $\beta$ -FTC apenas se observan cambios morfológicos a simple vista. Con respecto al  $\beta$ -FTC (Ilustración 8), se aprecia una posible consistencia de los biomateriales con células con respecto a los biomateriales control sin células. Estos últimos carecen de compactación, como en los estadíos iniciales del cultivo en donde el biomaterial esta suelto.



**Ilustración 8: Biomateriales de  $\beta$ -FTC sembrados con CMMo y sus controles sin CMMo en presencia de medio osteogénico. A, B y C: Biomaterial con células que con el paso del tiempo en cultivo, parece que presenta una estructura más compacta. D, E y F: Biomaterial sin células que presenta una estructura carente de compactación.**

#### 4.1.5. Análisis citológico e histológico de los biomateriales

Tras el análisis mediante tinción de H-E se han podido observar diferencias entre los biomateriales. Con respecto al biomaterial de  $\beta$ -FTC se observan grandes diferencias en la disposición del biomaterial, al verse una consistencia más estructurada y definida en presencia de CMMo (Ilustración 9 A, B y C). Se observan pocas células y éstas de forma estirada y aglomerada, entrelazándose, únicamente en la parte superficial del biomaterial, quedando así espacios internos de éste totalmente vacíos. En el caso del biomaterial sin células esta estructura definida se pierde (Ilustración 9 A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> y C<sub>1</sub>) y en ella solo observamos restos del biomaterial, con una apariencia totalmente dispersa sin ningún tipo de estructura.

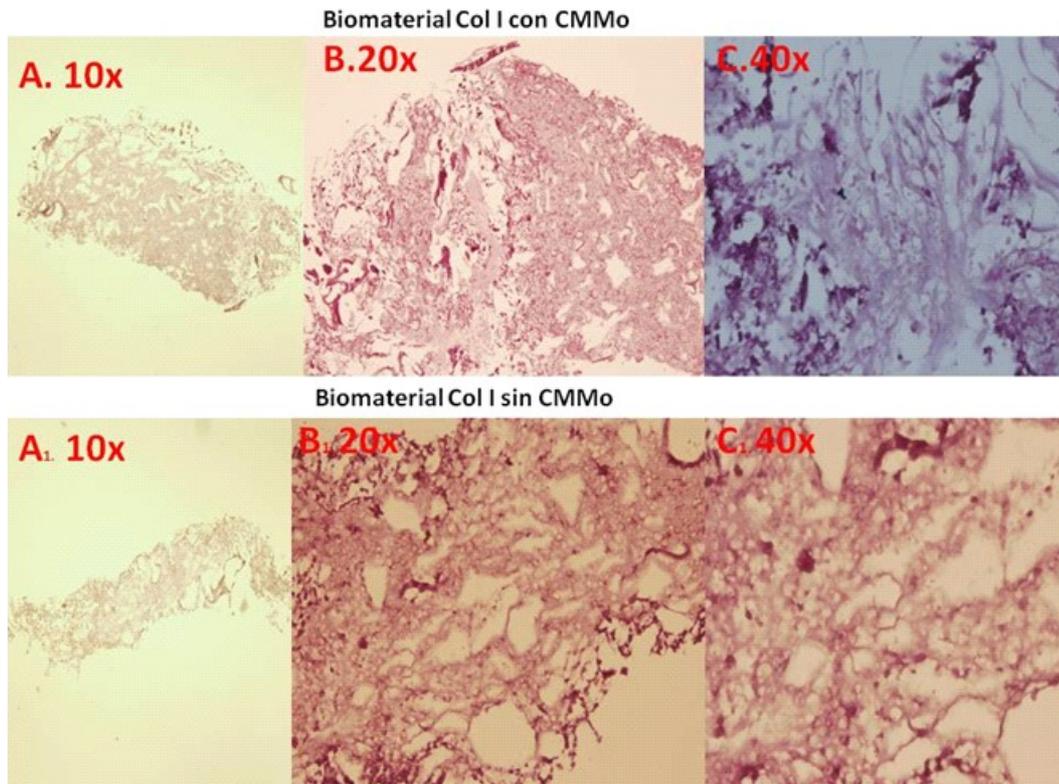


**Ilustración 9: Tinción H-E del biomaterial  $\beta$ -FTC. Para el biomaterial con CMMo se observa, A: Imagen general de la formación del biomaterial con células a 10x visualizando una estructura compacta y con forma definida. B: Imagen a 20x donde vemos la estructura compactada con células aglomeradas solo en la zona derecha. C: Imagen a 40x del biomaterial con células dispuestas de forma estirada en la zona superior del biomaterial. En el caso del biomaterial sin CMMo. A1: Imagen general del biomaterial totalmente disperso a 10x. B1 y C1: Imagen a 20x y 40x y por tanto a más aumentos, donde se siguen observando los restos del biomaterial sueltos, sin ningún tipo de unión entre ellos.**

La tinción de H-E realizada al biomaterial de Col1 no es tan llamativa de los posibles cambios por presencia celular como en el caso del  $\beta$ -FTC, siendo las diferencias que aparecen en él mucho más sutiles. Podemos ver que para el biomaterial de Col1 con células (Ilustración 10 A, B y C) está más engrosado. Su estructura porosa interna, característica, apenas muestra espacios libres. Esto se debe a una presencia celular, ocupando la mayoría de dichos espacios. En ellos se encuentran de forma mucho menos estiradas que el caso anterior. Las zonas superficiales del biomaterial se observan más libres, no observándose apenas presencia celular sobre él.

Por otro lado, el biomaterial de Col1 sin células (Ilustración 10 A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> y C<sub>1</sub>) se corresponde con un biomaterial menos engrosado, visualizando su

estructura porosa interna. Por tanto en la parte central como superficial, quedan espacios libres por la ausencia de células.



**Ilustración 10: Tinción H-E del biomaterial Col1. A:** Estructura del biomaterial engrosada con CMMo a 10x, teniendo una imagen general en donde se ve un material grueso y sin apenas espacios libres. **B:** Imagen de la estructura del biomaterial con células 20x, igualmente sin espacios libres y sin CMMo, observables, en su superficie. **C:** finalmente la estructura en detalle, a 40x, del conjunto del biomaterial confirma el recubrimiento, de la porosidad interna de éste, por un gran número de CMMo dispuestas de forma interconectada y encogida rodeadas del biomaterial, ocupando así todo el hueco disponible. En el caso del biomaterial sin CMMo. **A<sub>1</sub>:** Presenta a 10x una estructura del biomaterial mucho menos engrosada, debido a un aspecto de mayor vacío en sus estructuras internas, al comparar la imagen con la de biomaterial con CMMo. **B<sub>1</sub>:** Se observa a 20x la típica estructura porosa del biomaterial de Col1 en donde se puede comparar mejor ese vacío del interno. **C<sub>1</sub>:** de forma mucho más clara a 40x, se observan los huecos en la imagen.

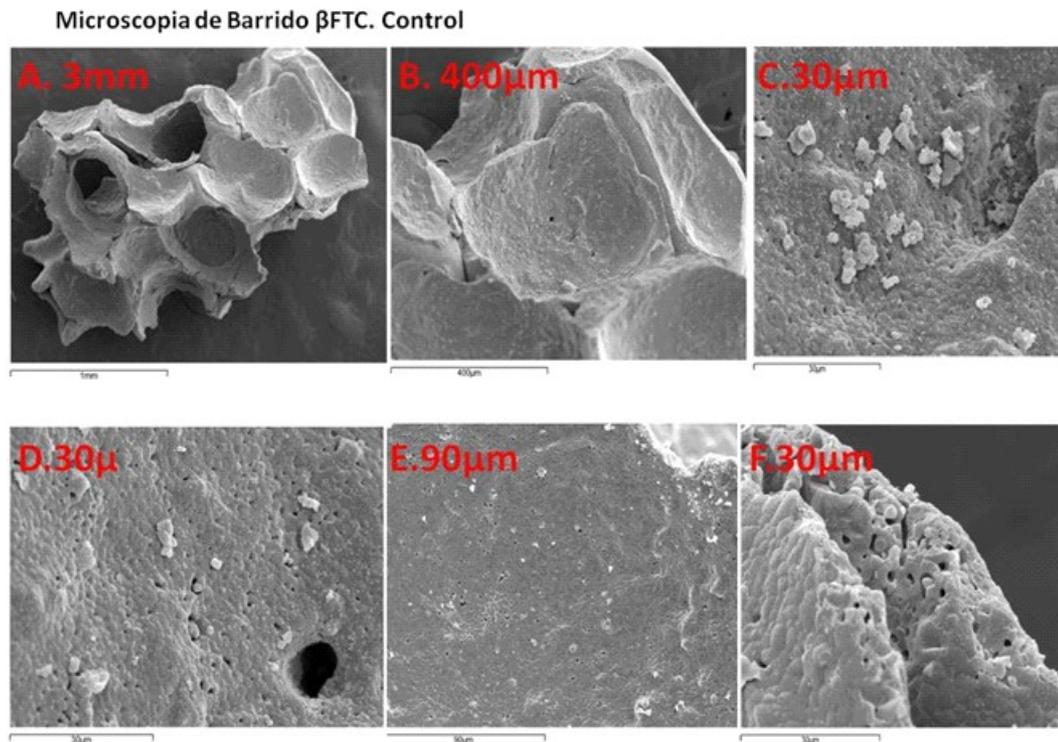
#### 4.1.6. Análisis de la diferenciación osteogénica sobre biomateriales

##### 4.1.6.1. Analisis morfométrico

##### 4.1.6.1.1. Microscopía electrónica de Barrido

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

Con esta técnica (MEB), hemos observado grandes diferencias entre los biomateriales con células y sin células, observando en el caso del biomaterial de  $\beta$ -FTC sin células una estructura dura y rígida sin apenas porosidad o con poros muy pequeños (Ilustración 11).

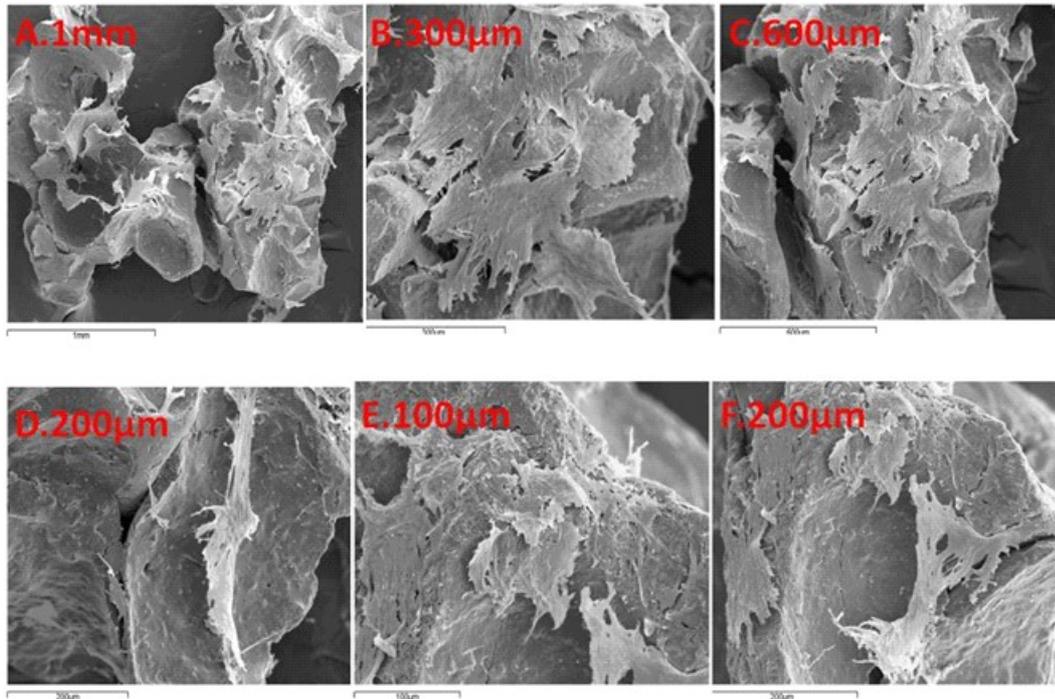


**Ilustración 11: MEB para  $\beta$ -FTC sin CMMo. A: Se observa la estructura general del biomaterial de  $\beta$ -FTC sin células. B, C, D, E: Se ve en más detalle la estructura del biomaterial, donde se observa la rigidez y la compactación del mismo junto con la ausencia casi absoluta de porosidad, el único poro visible puede verse en la imagen D. F: Observamos una imagen superficial con un posible desgaste, debido a la posible permanencia del biomaterial en cultivo durante 30 días.**

En el caso del biomaterial con CMMo, debido a su estructura, nos encontramos un gran número de células capaces de crecer en presencia de éste, de forma totalmente estirada sobre su superficie (Ilustración 12).

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

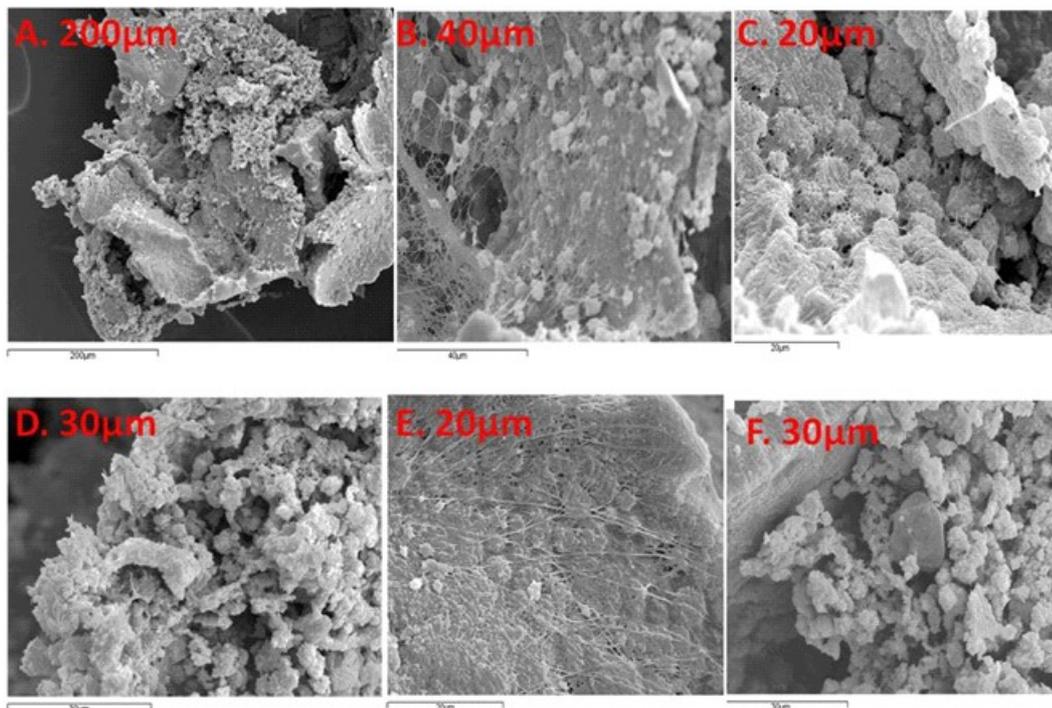
## Microscopia de Barrido $\beta$ FTC. Con células



**Ilustración 12: MEB para el biomaterial de  $\beta$ -FTC con CMMo. A: vemos de forma general el biomaterial totalmente colonizado superficialmente por las células. B, C, D, E y F: La disposición expandida del conjunto de células que colonizan la superficie del biomaterial.**

Gracias a la MEB hemos podido ver diferencias estructurales entre los biomateriales, y por tanto, ver como ésta influye directamente en la disposición de las CMMo sobre ellos. En este caso, para el biomaterial de Col1, observamos en el control sin CMMo una estructura mucho más compleja imitando al medio natural en donde se encuentran las células, recordando incluso a una MEC (Ilustración 13).

### Microscopia de Barrido Colágeno Control

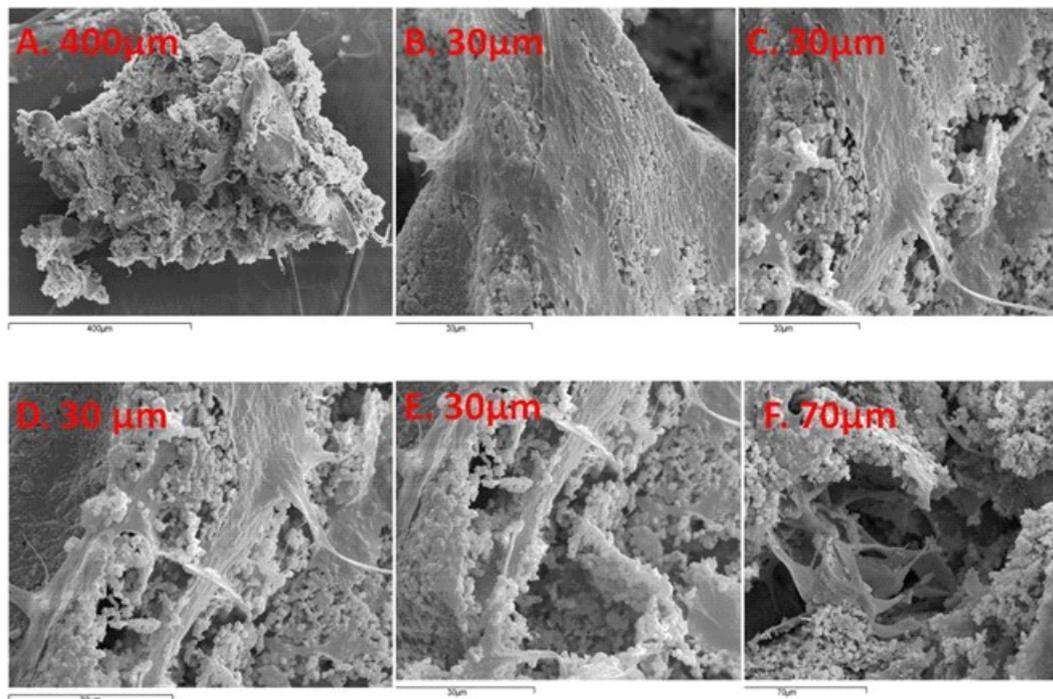


**Ilustración 13: MEB de Col1 sin CMMo. A: observamos una imagen de la estructura globosa general que presenta el biomaterial. B: en este caso se puede ver un poro del biomaterial junto con un entramado de fibras que hace pensar en una MEC. Complementando esto se observa en las imágenes C, D, E y F una estructura totalmente intrincada de fibras y estructuras globosas, características de la estructura del biomaterial de Col1.**

Con respecto al biomaterial de Col1 con CMMo se observó una colonización superficial más compleja al apreciarse las células estiradas y sus interconexiones celulares (Ilustración 14 A, B, C, D y E). Además, se pudo observar como las células no solo colonizan la superficie del biomaterial sino que, en este caso, también son capaces de disponerse en el interior de la estructura de forma interconectada (Ilustración 14 F).

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

## Microscopia de Barrido Colágeno con células

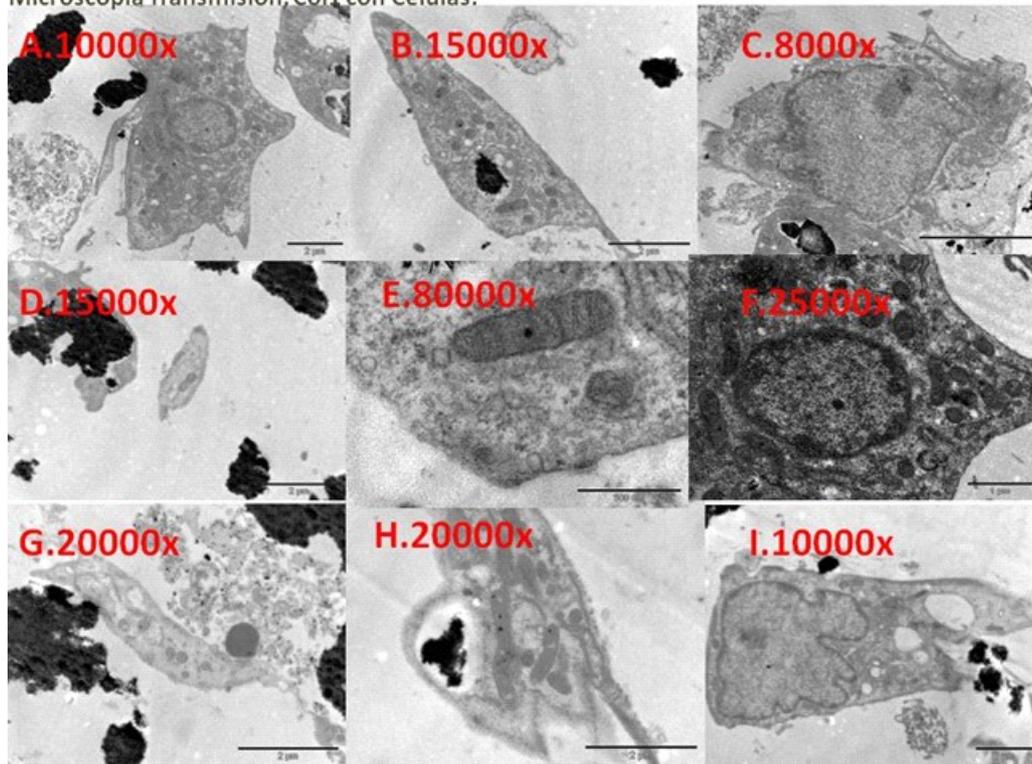


**Ilustración 14: MEB de Col1 con CMMo. A: Biomaterial de Col1 de forma muy similar al control, con alguna célula en su superficie. B, C, D y E: En donde las células fueron más fácilmente observables al obtener imágenes a más aumentos, viéndose una colonización celular más mimética con el biomaterial, apareciendo conexiones intercelulares entre ellas. F: imagen perteneciente a una zona de hueco del biomaterial, en donde se produce la disposición de un número abundante de células conectadas de forma estirada colonizando así al biomaterial.**

### 4.1.6.1.2. Microscopía electrónica de Transmisión

Con esta técnica se evaluaron únicamente las muestras de biomaterial con células. En el caso del biomaterial Col1 visualizamos tanto las células como sus orgánulos de una forma perfectamente distinguible en cada una de las imágenes (Ilustración 15 E y F). Además, en ellas también podemos apreciar la producción de precipitados, tanto extracelulares (Ilustración 15 A, D, G y I) como precipitados intracelulares (Ilustración 15 B, C y H). Por otro lado, se aprecian en algunas de las imágenes posibles restos de biomaterial en el medio (Ilustración 15 A, G y I).

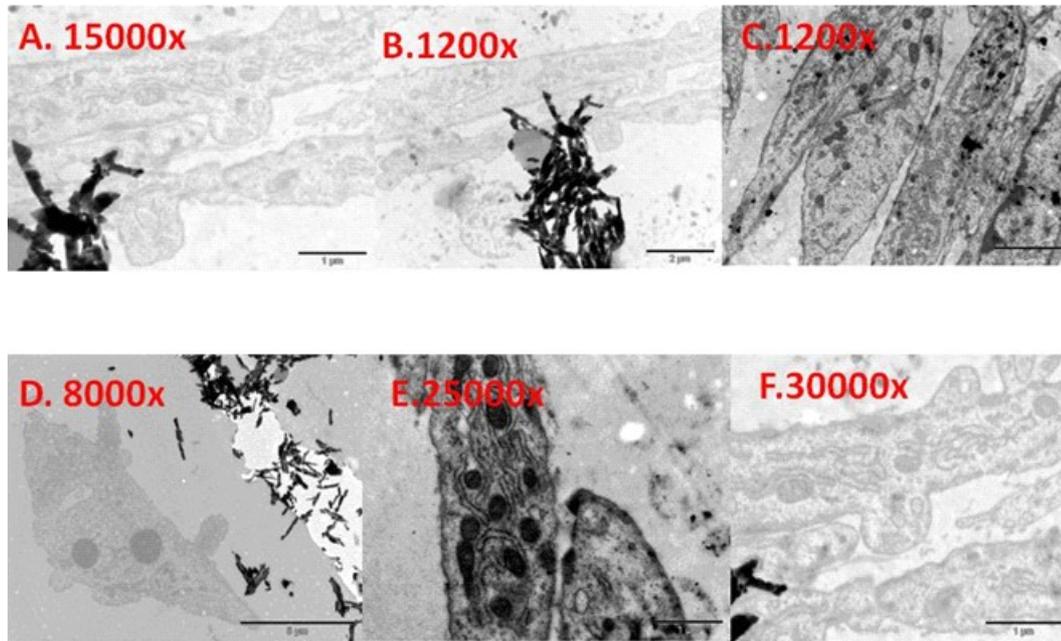
Microscopía Transmisión, Col1 con Células:



**Ilustración 15: MET de Col1 con CMMo.** A: Se observa una célula muy bien definida con precipitados en el exterior y posibles restos de biomaterial en el margen inferior izquierdo. B, C y H: Se observan células con precipitados en el interior de ellas, en forma de acumulo de cristalitas. D: imagen de precipitados de forma abundante, siendo incluso de mayor tamaño que la célula. E y F: Nos muestran células a mayor aumento apreciando sus orgánulos. E: Imagen de una mitocondria en el interior celular. G e I, también encontramos restos del biomaterial de Col1, siendo mayor en la imagen G.

Por otra parte, en el caso del biomaterial de  $\beta$ -FTC, se observa también de forma clara las células que están presentes en la preparación, además de su estructura interna (Ilustración 16 C, E y F). En este caso también apreciamos de forma menos abundante precipitados, únicamente de forma extracelular (Ilustración 16 A, B y D).

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

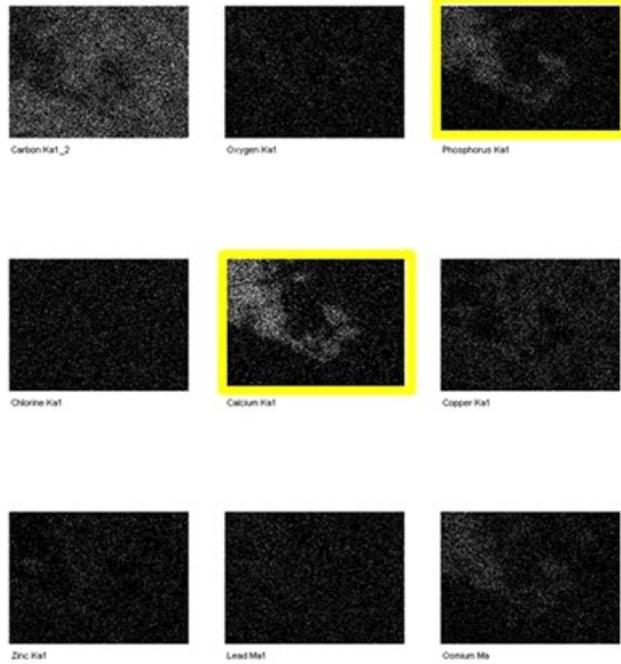


**Ilustración 16: MET de  $\beta$ -FTC con CMMo. C, E y F: Observamos las células de forma más estirada con respecto al biomaterial de Col1. Además también vemos posibles precipitados, pero en menor abundancia que para el biomaterial de Col1 en la imagen A, B, D, y E.**

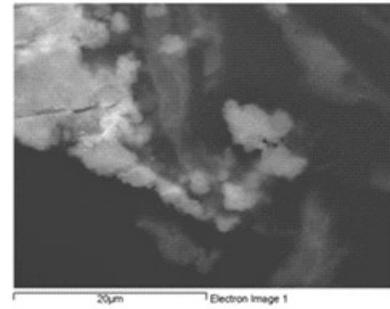
#### 4.1.6.1.2.1. Análisis de energía dispersiva de rayos x

Tras la visualización de precipitados, dispuestos tanto extracelular como intracelularmente, en las preparaciones de MET del biomaterial de Col1 se ha decidido realizar un estudio más exhaustivo para conocer la composición de los precipitados observados. Se han realizado cortes de las muestras en la zona de interés, y se ha estudiado la composición mediante análisis de energía dispersiva de rayos x (EDX) (Ilustración 17). En este análisis por mapas de rayos x (Rx) se puede observar una nube de puntos, con la misma forma que el precipitado, en la que aparecen los compuestos de los que está formado. En este caso abundan, para los dos tipos de precipitados (Ilustración 17 A y B, con mapas marcados de amarillo), compuestos de calcio y fosfato.

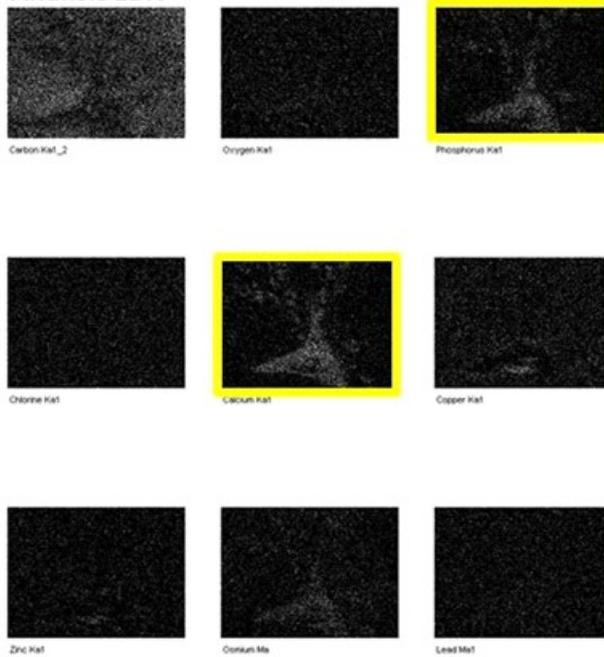
### Análisis EDX.



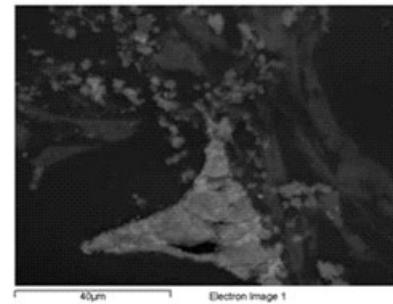
A



### Análisis EDX



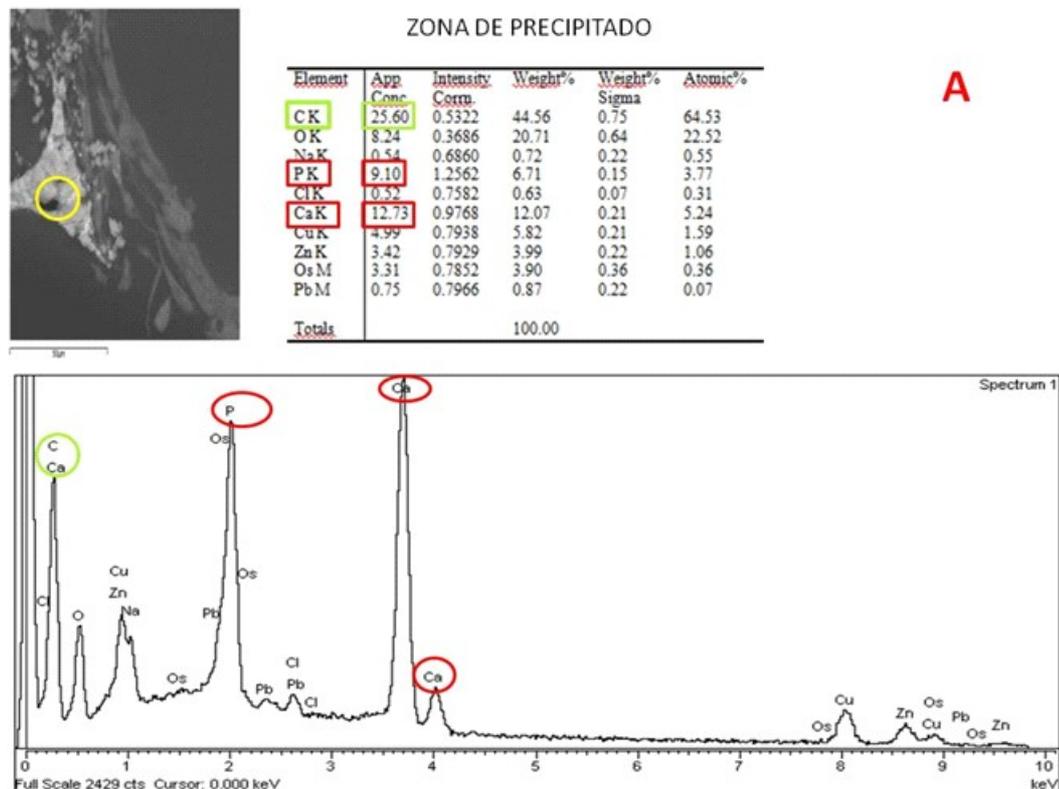
B



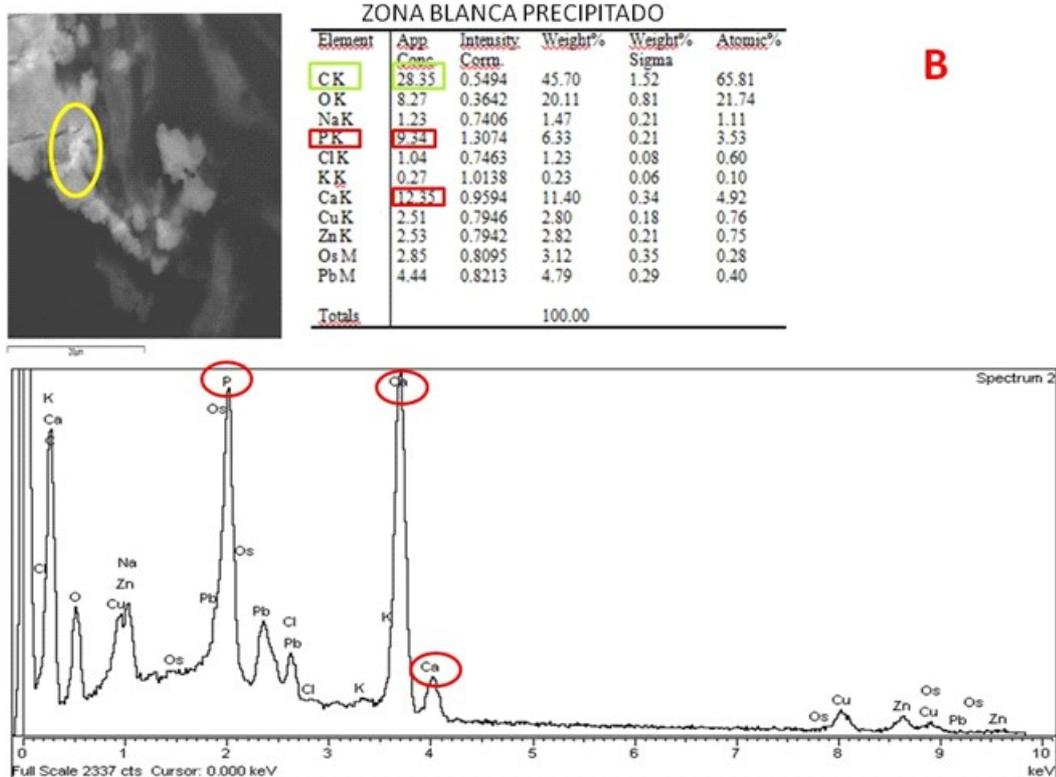
**Ilustración 17: Análisis de precipitados del biomaterial de Col1 mediante EDX. Imágenes de cortes a MEB, en donde se observan diferentes regiones de los precipitados. En estas imágenes, que son de tamaño más grande, se observa en una tonalidad más clara los precipitados y en una tonalidad más grisácea las células presentes en ese mismo corte. A: Se refiere a un corte en concreto, en donde apreciamos una zona de precipitado**  
**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

aumentada, y su análisis de Rx correspondiente. De este análisis obtenemos como resultado, imágenes más pequeñas y punteadas que se conocen como mapas de RX. Cada una de ellas se corresponde con la localización de un elemento presente en el corte de la muestra, dándonos información de cuál es el elemento presente y cuál es su localización, mediante la disposición del punteado. De manera que para la imagen A se observa una localización del elemento calcio y fósforo en la zona que corresponde al precipitado. Para la imagen B vemos el mismo análisis para otro precipitado distinto, en este caso no se encuentra aumentado, y en él se observa el mismo resultado de colocación del elemento calcio y fósforo para la misma zona de precipitado.

En el análisis de Rx localizado en dos puntos del precipitado (Ilustración 18), se estima una cantidad de calcio aproximada de 12% para ambos casos, seguida de la estimación de una cantidad de fósforo aproximadamente del 9%, tanto para la imagen A como B (Ilustración 18).

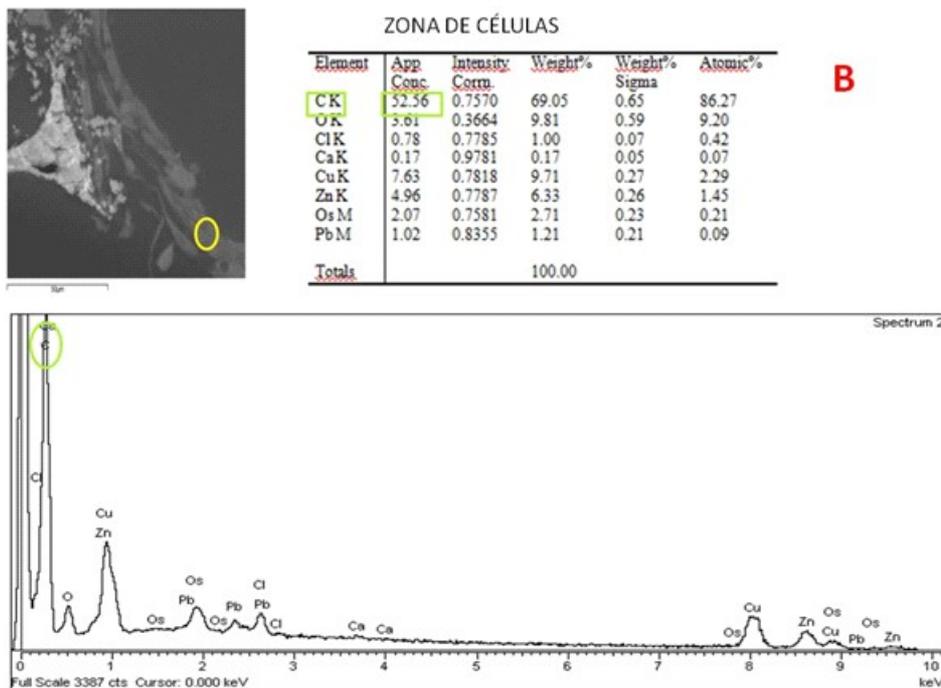
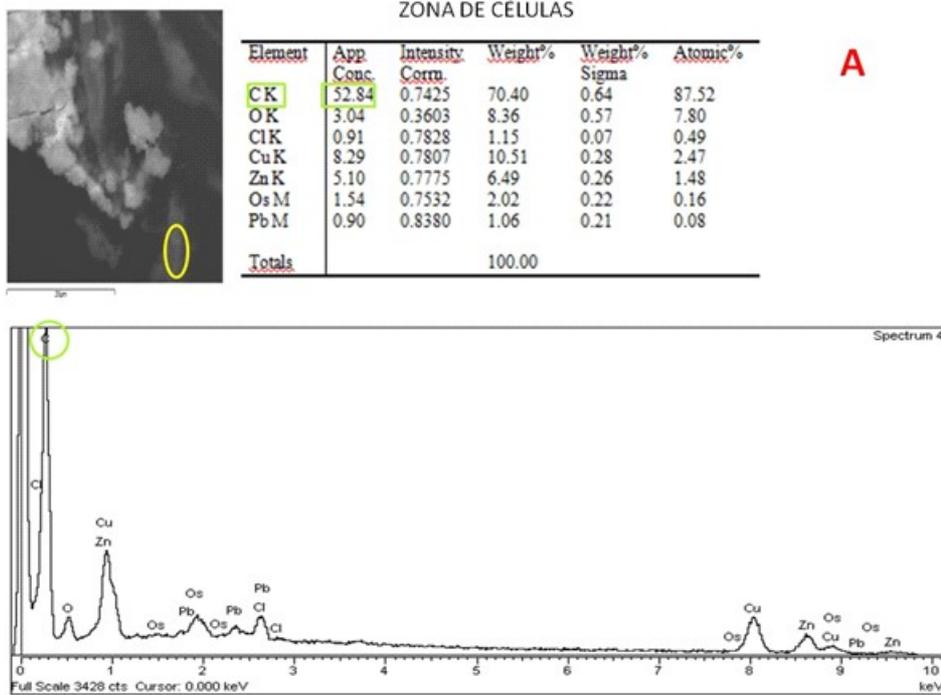


Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.



**Ilustración 18: Análisis EDX localizado en precipitados extracelulares de los biomateriales de Col1. A: Región oscura del precipitado B mostrado en la ilustración 16 B, acotada para el estudio, con su tabla de análisis correspondiente, en la cual destacan, tras un alto valor de 25,60 correspondiente al carbono residual con el que cubrimos la muestra para su visualización, los valores de fosfato, 9,10, y calcio, 12,73, como los valores más abundantes frente a los demás elementos presentes en el análisis. Junto a estos valores se presenta además un espectro de picos específicos para cada elemento, avalando por tanto la presencia de calcio y fosfato en la región de análisis. B: En este caso hemos decidido acotar una región blanca del precipitado A mostrado en la ilustración 16 A, su junto su tabla de resultados y el espectro de picos específico para su análisis. Obtenemos en este análisis lo mismos resultados de abundancia de calcio y fosfato junto con su región de picos específica correspondiente y con una abundancia en carbono ligeramente superior.**

Además para contrastar éstos resultados, hemos decidido realizar un nuevo análisis de EDX para las células que aparecen en ese mismo corte de estudio. En él observamos diferencias en la cantidad de elementos presente (Ilustración 19), obteniendo incluso ausencia de elementos que anteriormente si estaban presentes. Es decir, el compuesto de carbono presenta mayor cantidad, junto a una inexistente cantidad de calcio y fósforo.



**Ilustración 19: Análisis EDX de CMMo en biomateriales de Col1. Presentado con amarillo la región de células señalada en donde se realiza el estudio de RX localizado con su tabla de resultados del análisis y su región de picos correspondiente. A: El análisis en este caso nos releva una cantidad de carbono mucho más elevada, 52,84, que el caso del análisis de precipitados. Además observamos la inexistencia de elementos de calcio y fosfato para dicha región celular analizada. B: En este caso, para esta zona analizada, se obtuvo la misma desaparición de elementos de calcio y fosfato, presentes en los análisis de precipitados, siguiendo con la misma abundancia de carbono de 52, 56.**

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

# Discusión

---

## 5. Discusión

En la regeneración ósea surge una gran alternativa, como es la conjunción de CMM y biomateriales que ofrezcan, por un lado, una buena diferenciación de las células a hueso y por otro, un soporte fácilmente biodegradable para el crecimiento y extensión de las CMM diferenciadas a hueso.

Para ello hemos decidido realizar un estudio, *in vitro*, utilizando concretamente especímenes de oveja (*Ovis Aries*). La utilización de la oveja se encuentra bastante extendida debido a su gran similitud con el ser humano tanto en su relación tamaño/peso como en la forma de regeneración y desarrollo del tejido óseo de interés (McCarty C.R. *et al.*, 2008; Feitosa Tarja L. M. *et al.*, 2010). Además, también presenta un potencial de cicatrización ósea junto con un aporte sanguíneo en dicha cicatrización, comparable a la del ser humano (Reichert C. J. *et al.*, 2010). Aparece así la posibilidad de seguimiento en la evolución durante largos períodos de tiempo (Atayade L.M. *et al.*, 2014). El modelo animal de oveja presenta otras ventajas como su bajo coste, su disponibilidad y su aceptación ética (Atayade L.M. *et al.*, 2014). Y es por todo esto, que hemos decidido su utilización como modelo animal para nuestro estudio.

A pesar de la popularidad de la oveja como modelo, tanto para estudios *in vitro* como *in vivo* y sus aplicaciones en ingeniería tisular, existe muy poca información con respecto a sus CMMo (Rentsch C. *et al.*, 2010; Lyahyai J. *et al.*, 2012). De manera que se hace necesaria la estandarización de marcadores y protocolos específicos para la caracterización de estas CMMo (Adamzyk C. *et al.*, 2013), dado que la mayoría de estudios en investigación de células madre han sido prioritariamente con células humanas y de ratón (Leeda S. *et al.*, 2010; Rentsch C. *et al.*, 2010). Por tanto la caracterización de las CMMo hoy en día es todavía limitada (Lyahyai J. *et al.*, 2012).

En nuestro caso, la obtención de las CMMo se ha realizado de dos formas distintas. En un primer momento, se realizaron aspirados de cresta ilíaca como método preferente en la obtención de la muestra, siendo el más

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

utilizado en la mayoría de estudios previos consultados (McCarty C. R. *et al.*, 2009; Payer M. *et al.*, 2009; Boos M. A. *et al.*, 2010; Reichert C.J. *et al.*, 2010; Rentsch C. *et al.*, 2010; Scaglione S. *et al.*, 2010; Viteau V. *et al.*, 2013) debido a cuestiones de mayor esterilidad en la obtención de la muestra. Pese a ello, finalmente la obtención de muestras se produjo por lavados de médula ósea de cabezas femorales, simplemente por ser el único método posible, debido a la disponibilidad de muestras por parte de los servicios de la Unidad de Cirugía Experimental del Centro Tecnológico de Formación del CHUAC. Este método es mucho menos generalizado, dado que no garantiza las condiciones de esterilidad y además es necesario el sacrificio previo del animal. A pesar de ello, es un método igualmente efectivo en la obtención y por eso es utilizado en algunos estudios consultados (Heidari B. *et al.*, 2012; Mrugala D. *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, las CMMo obtenidas han mostrando adherencia al plástico, morfología fibroblástica y mantenimiento de las características de indiferenciación a diferentes pases de cultivo, como en otros trabajos (McCarty C. R. *et al.*, 2009; Payer M. *et al.*, 2009; Lyahyai J. *et al.*, 2012; Banasfsheh H. *et al.*, 2013) y al igual que en estudios previos de CMM de ratón y humanos (Rentsch C. *et al.*, 2010).

En su caracterización, mediante análisis fenotípico, hemos obtenido expresión positiva para los marcadores CD29, CD44 y CD166, que reaccionan con CMMo, y expresión negativa para CD34 y CD45 como marcadores hematopoyéticos, al igual que en publicaciones anteriores (Boos M.A. *et al.*, 2010; Reichert C. J. *et al.*, 2010; Field R. J. *et al.*, 2011; Boxal A. y S. Jones E., 2012; Mrugala D. *et al.*, 2012; Adamzyk C. *et al.*, 2013; Kalaszczynska I. *et al.*, 2013). Apareciendo un estudio previo, en donde se nos indica que los Ac CD29, CD44 y STRO-4 presentan igual positividad fenotípica tanto para las CMMo como CMMh (Zannettino W.C.A. *et al.*, 2010).

Existen otros estudios que además de presentar positividad para los mismos marcadores que nuestro trabajo también expresan positividad para otros marcadores distintos, como son CD73, CD90 y CD105 en la caracterización de las CMMo (Rentsch C. *et al.* 2010; Lyahyai J. *et al.*, 2012) y para los cuales, en nuestro trabajo, hemos obtenido un resultado

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

negativo. Los anticuerpos empleados CD73 y CD90 (BD Bioscience) son coincidentes con los de nuestro trabajo, sin embargo para el anticuerpo CD105 (Ancell) no coinciden con el utilizado por nosotros (ABD Serotec). Esta diferencia, con respecto a nuestros resultados debido a la inexistente expresión de CD73, CD90 y CD105 en nuestras CMMo, ha sido estudiada en otro trabajo previo. En él se ha analizado la influencia que pudiesen tener los medios de cultivo, entre ellos el *DMEM* 1g/L glucosa (PAA, Coelba, Alemania), en la expresión de los diferentes marcadores, añadiéndoles a cada uno distintas cantidades de suero de ternero fetal (STF) (*Pan Biotech*, Alemania) (Adamzyk C. *et al.*, 2013). Resultó que, los medios *DMEM* suplementados con cantidades de un 10% de STF, favorecen el incremento de señal para los marcadores CD73, CD90 y CD105 en CMMo, lo cual va en contra de nuestros resultados de expresión fenotípica. Esto puede verse influenciado por diferencias en los compuestos utilizados, que en nuestro caso fue *DMEM* 4,5g/L glucosa (Lonza, España) suplementado con 10% de SBF. Por otro lado, se detectó para todos los tipos de medio en estudios previos consultados, sin importar la cantidad de SCF utilizada, una alta presencia del marcador mesenquimal CD44 tanto para las CMMo como CMMh. Algunos autores concluyeron que CD73, CD90 y CD105 son marcadores específicos para CMMh (Seebach C. *et al.*, 2010; Teti G. *et al.*, 2012). Sin embargo, otro trabajo habla de que la expresión para CD73, CD90 y CD105 puede verse influenciada por la composición del medio de cultivo utilizado para el crecimiento celular, e incluso por posibles variaciones en la zona de extracción de muestra a la hora de la obtención de las células. En este sentido, tanto el crecimiento celular como la expresión de marcadores de superficie, se vean influenciados posiblemente por la zona dadora de las células (Adamzyk C. *et al.*, 2013). Otro factor a considerar por su posible influencia en las diferencias de expresión fenotípica de las CMMo, es el uso de anticuerpos humanos, ya que es probable una pérdida de reactividad de las células, frente a estos anticuerpos (Boxal A. S. y Jones E., 2012). Éstos no necesariamente presentan reacción cruzada con otras especies (McCarty C. R. *et al.*, 2009; Adamzyk C. *et al.*, 2013). A pesar de que se ha observado que en el análisis fenotípico de marcadores de superficie, los anticuerpos que reaccionan anti CMMh no presentan

reacción frente a CMMo (McCarty C. R. *et al.*, 2009), son con frecuencia utilizados en estudios previos como una metodología desafortunada (Adamzyk C. *et al.*, 2013). Sería importante entonces, la estabilización de protocolos en la caracterización de las CMMo, tan empleadas en los últimos años, mediante Ac específicos para la especie ovina que nos garantice la fiabilidad de los resultados obtenidos.

En vista de nuestros resultados, y la bibliografía correspondiente analizada, consideramos que la positividad para los marcadores específicos CD29, CD44 y CD166, sería suficiente a día de hoy, para indicarnos la obtención de CMMo, al igual que para la gran mayoría de los estudios consultados. Además, los marcadores CD29, CD44 y CD166 son característicos de células con fuerte expresión de indiferenciación (Adamzyk C. *et al.*, 2013). Hemos obtenido expresión negativa para el resto de la batería utilizada (CD90, CD73, CD105, CD146, CD90 y STRO-1), al igual que en los artículos de caracterización de CMMo consultados (Boos M.A. *et al.*, 2010; Reichert C. J. *et al.*, 2010; Field R. J. *et al.*, 2011; Boxal A. S. y Jones E., 2012; Mrugala D. *et al.*, 2012; Adamzyk C. *et al.*, 2013; Kalaszczynska I. *et al.*, 2013) y coincidentes con nuestros mismos resultados.

Hemos observado coincidencias para los anticuerpos CD73 y CD90 (BD Bioscience) de forma que, posiblemente sería recomendable aumentar el tamaño muestral para comparar mejor estos resultados. Por otro lado, el anticuerpo CD105 (Ancell) no coincide con el utilizado en el trabajo (AbD Serotec) siendo de interés adquirirlo para testarlo con nuestras células.

Nuestro estudio de multipotencialidad de CMMo se ha completado al inducir su diferenciación a tejidos de origen mesodérmico como osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Lyahyai J. *et al.*, 2012). Esta diferenciación se ha inducido mediante medios comerciales para diferenciaciones de CMMh, al igual que en otros muchos trabajos previos consultados (Reichert J. C. *et al.*, 2010; Rentsch C. *et al.*, 2010; Lyahyai J. *et al.*, 2012; Adamzyk C. *et al.*, 2013; Berner A. *et al.*, 2013; Viateau V. *et al.*, 2013). Esto refleja, por otro lado, la carencia existente de medios específicos disponibles para CMMo y quizás, es por ello que no se han obtenido grandes resultados hasta la fecha. Sin embargo, esta relación de

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

influencia del medio todavía no está tan clara, tal y como se indica en un estudio comparativo de la utilización de medios para CMMo frente a CMMh (Adamzyk C. *et al.*, 2013). En este trabajo previo ya citado anteriormente se ha visto que, medios suplementados con SBF (como es nuestro caso) presentan una fuerte influencia en la proliferación de las CMMo, mayor incluso que para las CMMh (Adamzyk C. *et al.*, 2013).

En la segunda parte del trabajo correspondiente a la siembra de CMMo sobre biomateriales, se visualizó crecimiento tanto en Col1 como  $\beta$ -FTC. En un estudio previo se vieron diferencias en la capacidad de crecimiento sobre ellos, por parte de las CMMo frente a las CMMh. Siendo mucho mayor la capacidad de crecimiento de CMMo, sobre la mayoría de los biomateriales utilizados, entre los que se encontraban el AH,  $\beta$ -FTC, partículas de sulfato cálcico o biomateriales formados por la combinación de Col1 con AH y  $\beta$ -FTC (Zannettino W.C.A. *et al.*, 2010). En primer lugar, para el biomaterial de Col1, se ha observado en trabajos previos, que éste permite una mejor adhesión y proliferación de las CMMo (Zannettino W.C.A. *et al.*, 2010), debido a su estructura tridimensional característica (Ding L. *et al.*, 2014) que imita a la MEC (Bernhardt A. *et al.*, 2010). Además, en resultados previos en nuestro laboratorio, para este biomaterial de Col1 se ha observado un buen crecimiento de CMMh diferenciadas con medio condrogénico (Sanjurjo-Rodríguez C. *et al.*, 2014). Debido a ello que hemos escogido este biomaterial para nuestro estudio.

En nuestro trabajo, además de un buen crecimiento celular, tanto en la zona superficial como la zona interna del biomaterial de Col1, se ha podido observar la aparición de precipitados de fosfato cálcico. Para confirmar dicha presencia de fosfato cálcico en estos precipitados, hemos realizado un análisis EDX (Reichert J. C. *et al.*, 2011). Este análisis se ha llevado a cabo en cada una de las regiones de interés y se han obtenido espectros de picos característicos, para los elementos presentes. El resultado del análisis de EDX para las regiones de precipitado mostró presencia de compuestos de calcio y fosfato en nuestros estudios, lo cual hemos visto que coincide con los mismos valores de un estudio previo (Reichert J. C. *et al.*, 2011). En él se ha analizado una región de tejido

óseo mediante EDX, a diferencia de nuestro estudio donde hemos analizado precipitados en nuestros constructos osteogénicos (Reichert J. C. *et al.*, 2011). A mayores se analizaron otras regiones de células de interés, para las cuáles en este caso, los resultados tanto para nuestro trabajo como para el anterior estudio mencionado coinciden (Reichert J. C. *et al.*, 2011). En ambos, el espectro de picos que se obtuvo fue un único elemento, el carbono, mientras que los picos para los elementos de calcio y fosfato han sido inexistentes.

La aparición de dichos precipitados de PCa podría ser debida a la imitación de la MEC por parte del biomaterial de Col1 (Rentsch C. *et al.*, 2010). Por tanto, éste se ve involucrado además en el crecimiento y proliferación celular, en la diferenciación de las CMMo a células precursoras de hueso. Llegando incluso a segregar los precipitados de PCa característicos en la neoformación de tejido óseo (Bernhardt A. *et al.*, 2010).

De manera que, en función de nuestros resultados, dicho material forma un constructo de tejido óseo. Apoyando ésto, se ha visto en trabajos previos que el biomaterial de Col1, junto con CMMo, permite la formación de un constructo más eficiente que otros biomateriales (Reichert J. C. *et al.*, 2011). Con la particularidad de que esta eficiencia se da en poblaciones de CMM que expresan positividad para CD29 (como es nuestro caso), ya que esta expresión significa que las células presentan moléculas de adhesión de superficie ( $\beta$ -integrina) receptoras para el colágeno (Zannettino W.C.A. *et al.*, 2010). Con lo cual, la unión del biomaterial y las células induce la formación de colonias de CMM, y éstas a su vez ven facilitada su actividad de diferenciación (Zannettino W.C.A. *et al.*, 2010).

Por otra parte, en el caso del biomaterial de  $\beta$ -FTC, la siembra de CMM sobre él tiene como resultado una exitosa reparación de los defectos óseos (Paschos N.K. *et al.*, 2014). Se ha visto en estudios previos como CMMh junto con el biomaterial de  $\beta$ -FTC consiguen una buena formación de neotejido (Bernhardt A. *et al.*, 2011). Ésto nos hace pensar en la posibilidad de un próximo estudio en un modelo animal, con el biomaterial de  $\beta$ -FTC para la regeneración ósea, como ya se ha visto en otros

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

trabajos (Bernhardt A. *et al.*, 2011). En el caso que nos ocupa, no se ha observado ningún tipo de formación de neotejido, únicamente se ha visto crecimiento superficial y por tanto ausencia de osteoinductividad por parte del biomaterial. Además se observó una inexistente diferenciación celular, como fue el caso del estudio previo (Viteau V. *et al.*, 2013). Este hecho, puede ser debido a la influencia de factores microambientales derivados de las características estructurales del biomaterial, como pueden ser la geometría del  $\beta$ -FTC, su porosidad o sus características químicas. Afectando éstas posiblemente a la interconectividad celular y, por tanto, a la producción de una saturación local de iones fosfato y calcio que limite la actividad celular (Viteau V. *et al.*, 2013). Por tanto, las características morfológicas y estructurales del biomaterial pueden impedir a las células su actividad normal y que no se observe ningún tipo de neoformación celular o reabsorción del biomaterial (Viteau V. *et al.*, 2013).

Se ha visto mediante imágenes de cortes al MET del biomaterial de  $\beta$ -FTC, ciertos precipitados extracelulares. Por causas de incompatibilidad de la técnica de análisis EDX utilizada, es imposible mostrar su composición real. Esto es debido a la composición característica del biomaterial, que se solaparía con los elementos de calcio y fosfato que componen los precipitados de interés de las células diferenciadas a hueso. En este sentido seríamos incapaces de distinguirlos. Sería interesante un análisis de los cortes de interés del biomaterial de  $\beta$ -FTC mediante alguna otra técnica alternativa que nos permita diferenciar entre la composición del biomaterial y el precipitado celular y, por tanto, poder concretar el origen de la composición de éstos.

# Conclusiones

---

#### 4. Conclusiones

1. La expresión de marcadores de células madre mesenquimales y la capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica permiten considerar a las células aisladas de cresta ilíaca y médula ósea ovina como CMMo.
2. Las CMMo crecen tanto en la superficie como en el interior de la estructura tridimensional del biomaterial de Col1, mientras que crecen solo superficialmente sobre el biomaterial de  $\beta$ -FTC.
3. El análisis EDX muestra diferenciación osteogénica temprana de las CMMo cultivadas en el biomaterial de Col1, debido a la aparición de precipitados de PCa, y la formación de constructos osteogénicos.
4. El análisis EDX del biomaterial de  $\beta$ -FTC no permite determinar la existencia de diferenciación osteogénica de las CMMo y tampoco permite determinar la formación de constructos osteogénicos.

# Bibliografía

---

## Bibliografía

- 1) Adamzyk C, Emonds T, Falkenstein J, Tolba R, Jahnen-Dechent W, Lethaus B, Neuss S. Different Culture Media Affect Proliferation, Surface Epitope Expression, and Differentiation of Ovine MSC. *Stem Cells Int.* 2013; 2013: 387-324.
- 2) Arvidson K, Abdallah MB, Applegate AL, Baldini N, Cenni E, Gómez-Barrena E, et al. Bone regeneration and stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2011; 15: 718-146.
- 3) Atayade LM, Cortez PP, Pereira T, Armada-da-Silva PAS, Afonso A, Lopes MA. A new sheep model with automatized analysis of biomaterial-induced bone tissue regeneration. *J Mater Sci.* 2014.
- 4) Banafsheh H, Shirazi A, Mohammad MA, Hassanpour H, Behzadi B, Mohammad MN, et al. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna J Med Biotech.* 2013; 5(2): 104-117.
- 5) Berner A, Reichert JC, Woodruff MA, Saifzadeh S, Morris AJ, Epari DR, et al. Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta Biomater.* 2013 Aug; 9(8): 7874-84.
- 6) Bernhardt A, Thieme S, Domaschke H, Springer A, Rösen-Wolff A, Gelinsky M. Crosstalk of osteoblast and osteoclast precursors on mineralized collagen-towards an in vitro model for bone remodeling. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 95(3): 848-56.
- 7) Boos AM, Loew JS, Deschler G, Arkudas A, Bleiziffer O, Gulle H, et al. Directly auto-transplanted mesenchymal stem cells induce bone formation in a ceramic bone substitute in an ectopic sheep model. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 1364-1378.
- 8) Bornstein M.M, Bosshardt D D, Buser D, Chen T S, Jensen Storgard S, Rocchietta I, et al. 20 Años de Regeneración ósea guiada en implantología Oral. Barcelona, España: Ed Quintessence S.L.; 2009.
- 9) Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int.* 2012; 2012: 975-871.
- 10) Corrales PL, Esteves LM, Ramirez-Vick EJ. Scaffold desing for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014; 14: 15-56.  
**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

- 11) Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*. 2011; 9: 66.
- 12) Ding L, Li X, Sun H, Su J, Lin N, Péault B, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. *Biomaterials*. 2014; 35(18): 4888-900.
- 13) Feitosa ML, Fadel L, Beltrão-Braga PC, Wenceslau CV, Kerkis I, Kerkis A, et al. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results. *Cir Bras*. 2010; 25(5): 416-22.
- 14) Field JR, McGee M, Stanley R, Ruthenbeck G, Papadimitrakis T, Zannettino A, et al. The efficacy of allogeneic mesenchymal precursor cells for the repair of an ovine tibial segmental defect. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2011; 24(2):113-21.
- 15) Gómez- Barrena E, Rosset P, Müller I, Giordano R, Bunu C, Layrolle P, et al. Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. *J. Cell. Mol. Med*. 2011; 15: 1266-1286.
- 16) Heidari B, Shirazi A, Akhondi MM, Hassanpour H, Behzadi B, Naderi MM, et al. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2013; 5(2): 104-17.
- 17) Jones E, Sanjurjo-Rodríguez C. Stem cell therapy for bone and cartilage defects- can culture-expansion be avoided. *J Stem Cell Res*. 2014; 4:1.
- 18) Kalaszczynska I, Ruminski S, Platek AE, Bissenik I, Zakrzewski P, Noszczyk M, et al. Substantial differences between human and ovine mesenchymal stem cells in response to osteogenic media: how to explain and how to manage?. *Biores Open Access*. 2013; 2(5): 356-63.
- 19) Kokemüller H, Jehn P, Spalthoff S, Essig H, Tavassol F, Schumann P, et al. En bloc prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in sheep and complete workflow for custom-made transplants. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43(2): 163-72.
- 20) Lanyon LE, Toshihiro S, Price SJ. Regulation of bone mass: local control or systemic influence or both?. *IBMS BoneKEY*. 2009; 6(6): 218-226.

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

- 21) Ledda S, Bogliolo L, Bebbere D, Ariu F, Pirino S. Characterization, isolation and culture of primordial germ cells in domestic animals: recent progress and insights from the ovine species. *Theriogenology*. 2010; 74(4): 534-43.
- 22) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C (T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.
- 23) Lyahyai J, Mediano RD, Ranera B, Sanz A, Remancha RA, Bolea R, et al. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Veterinary Research*. 2012; 8: 169.
- 24) McCarty CR, Gronthos S, Zannettino CA, Foster KB, Xian CJ. Characterisation and Developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell. Physiol*. 2008; 219: 324-333.
- 25) Mrugala D, Bony C, Neves N, Caillot L, Fabre S, Moukoko D, et al. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67: 288-295.
- 26) Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2014; 9: 18.
- 27) Paschos NK, Brown WE, Eswaramoorthy R, Hu JC, Athanasiou KA. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014.
- 28) Payer M, Lohberger B, Stadelmeyer E, Bartmann C, Windhager R, Jakse N. Behaviour of multipotent maxillary bone-derived cells on beta -tricalcium phosphate and highly porous bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res*. 2010; 21(7): 699-708.
- 29) Reichert JC, Quent VM, Nöth U, Hutmacher DW. Ovine cortical osteoblasts outperform bone marrow cells in an ectopic bone assay. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011; 5(10): 831-44.
- 30) Reichert JC, Woodruff MA, Friis T, Quent VM, Gronthos S, Duda GN, et al. Ovine bone- and marrow-derived progenitor cells and their potential for scaffold-based bone tissue engineering applications in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010; 4: 565-576.

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

- 31) Rentsch C, Hess R, Rentsch B, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D, et al. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46: 624-634.
- 32) Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. 2014; 100: S107-S112.
- 33) Sanjurjo Rodríguez C, Martínez Sanchez HA, Hermida Gómez T, Fuentes IM, Buján J, De Toro FJ, et al. Cartilage tissue engineering: adult human mesenchymal stromal cells and collagen biomaterials. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014; 22: S154.
- 34) Scaglione S, Lazzarini E, Ilengo C, Quarto R. A composite material model for improved bone formation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010; 4(7): 505-13.
- 35) Seebach C, Schultheiss J, Wilhelm K, Frank J, Henrich D. Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behavior of human mesenchymal stem cells. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2010; 41: 731-738.
- 36) Shrivats RA, McDermott CM, Hollinger OJ. Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discovery Today*. 2014; 00.
- 37) Sittichokechaiwut A, Scutt AM, Ryan AJ, Bonewald LF, Reilly GC. Use of rapidly mineralising osteoblasts and short periods of mechanical loading to accelerate matrix maturation in 3D scaffolds. *Bone*. 2009; 44(5): 822-9.
- 38) Suárez-González D, Lee JS, Diggs A, Lu Y, Nemke B, Markel M, et al. Controlled Multiple Growth Factor Delivery from Bone Tissue Engineering Scaffolds Via Designed Affinity Tissue Eng Part A. 2013; 19(S1).
- 39) Teti G, Cavallo C, Grigolo B, Giannini S, Facchini A, Mazzotti A, et al. Ultrastructural analysis of human bone marrow mesenchymal stem cells during in vitro osteogenesis and chondrogenesis. *Microsc Res Tech*. 2012; 75(5): 596-604.
- 40) Viateau V, Manassero M, Sensébé L, Langonné A, Marchat D, Logeart-Avramoglou D, et al. Comparative study of the osteogenic ability of four different ceramic constructs in an ectopic large animal model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013.

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

- 41) Viña JA, El-Alami M, Gambini J, Borrás C, Viña J, Peñarrocha MA. Application of mesenchymal stem cells in bone regenerative procedures in oral implantology. A literature review. J Clin Exp Dent. 2014; 6(1): e60-e65.
- 42) Zannettino AC, Paton S, Itescu S, Gronthos S. Comparative assessment of the osteoconductive properties of different biomaterials in vivo seeded with human or ovine mesenchymal stem/stromal cells. Tissue Eng Part A 2010; 16: 3579-3587.

# Agradecimientos

---

## Agradecimientos

Este estudio pudo llevarse a cabo gracias al apoyo de:

- Servizo Galego de Saúde
- Centro de Investigación Biomédica en Red- Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)
- Red Gallega de Terapia Celular y Medicina Regenerativa (REDICENT)
- Instituto Coruñés de Implantología y Rehabilitación Oral (ICIRO, España) gracias al Dr. José Manuel Cruz Valiño por el suministro de los Biomateriales de B-FTC.
- Bruna Parma (OPOCRIN S.P.A., Italia) por el suministro de los biomateriales de Col1
- Comunidad autónoma de Madrid CAM (S2009/MAT-1472)
- Unidad de Cirugía Experimental del CHUAC, UCEX
- Instituto de investigación biomedical de A Coruña, INIBIC
- Universidade da Coruña, UDC

Me gustaría agradecer la oportunidad de realizar este Máster, en Asistencia e Investigación Sanitaria (MAIS) de la UDC a todos los integrantes de su docencia, especialmente a su coordinadora y tutora de mi trabajo, la doctora Silvia M<sup>a</sup> Díaz Prado por apoyarme y guiarme con tanta paciencia y cercanía durante todo el curso académico. Agradecer

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

también al Dr Francisco J. Blanco por la oportunidad de realizar esta estancia en el instituto de investigación y poner a mi alcance todos los recursos necesarios en la realización de este trabajo.

Quiero agradecer a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña (UDC) por su ayuda técnica en la microscopía electrónica, especialmente a la Dra. Ada Castro por su gran trabajo y paciencia.

Agradecer también, a todos los integrantes del grupo de Terapia Celular e Ingeniería Tisular, y en general a todos los técnicos e investigadores que forman parte los distintos grupos del INIBIC, siempre amables y dispuestos a resolver cualquier duda.

En especial mi agradecimiento a mi segunda tutora del trabajo fin de máster, la Doctora Tamara Hermida Gómez, por hacer tan fácil todas y cada unas de las actividades realizadas durante toda mi estancia. Gracias también a Clara Sanjurjo Rodríguez, María José Sánchez Dopico y Juan Antonio Fabián Labora, integrantes del grupo de Terapia celular, por su sinceridad, inagotable paciencia y ayuda.

Gracias al personal de Servicios centrales de Histomorfología del INIBIC, a Purificación Filgueira Fernández y Noa Goyanes Rey por su disponibilidad.

Y por último, gracias a mis padres y a Marcos, por estar siempre, sin ellos esta oportunidad no sería posible.

# Anexos

---

# ANEXOS

## Anexo 1:

### Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo

Anticuerpo	Clon	Descripción	Casa comercial
<b>ISOTIPOS</b>			
FITC-ratón IgG1 Kappa Isotipo Control		Purificado	BD Pharmingen™
PE-ratón IgG1 Kappa Isotipo Control			Abcam
Ratón IgG1 Isotipo Control-PECy5	CLON: 1F8	IgG1	BD Pharmingen™
Conejo Anti-ratón Immunoglobulinas- FITC		FITC	Dako (PALEX MEDICAL, S.A.)
<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>			
Ratón Anti-Humano CD34-PE anticuerpo monoclonal		Purificado	BD Pharmingen™
Rata anti-Ratón CD44-FITC anticuerpo monoclonal	CLON: 25.32	FITC	AbD Serotec
Rata anti-Ratón CD29-FITC anticuerpo monoclonal	TS2/16	PE	Biologend
Ratón Anti-Humano CD45-FITC anticuerpo monoclonal	CLON: HI30	Purificado	BD Pharmingen™
Ratón anti-Humano CD69 anticuerpo monoclonal	CLON: FN50	Purificado	BD Pharmingen™
Ratón Anti-Humano CD73-PE anticuerpo monoclonal	CLON: AD2	Purificado	BD Pharmingen™

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

<b>ANTICUERPOS</b>	<b>SECUNDARIOS</b>		
Ratón Anti-Humano CD90-PE-Cy5 anticuerpo monoclonal	CLON: 5E10	Purificado	BD PharmingenTM
Ratón Anti-Humano CD105-FITC monoclonal	CLON: SN6	Purificado	AbD Serotec
Ratón Anti-Humano CD106-PE-Cy5 anticuerpo monoclonal	Purificado	BD PharmingenTM	Ratón Anti-Humano CD106-PE-Cy5 anticuerpo monoclonal
Ratón Anti-Humano CD166-PE anticuerpo monoclonal	CLON: 3A6	Purificado	BD PharmingenTM
Ratón Anti-Humano CD271 Anti- Factor de crecimiento nervioso (NGFR-p75) Monoclonal	CLON: ME20.4	Fluido ascítico de ratón	Sigma
Antígeno específico de la etapa embrionaria Anti-humano/ratón (SSEA-4) Monoclonal	CLON: MC-813-70	IgG3a	R&D Systems
Ratón Anti-Humano STRO-1 (CD34+ células de médula ósea)	Sobrenadante de cultivo celular	GRUPO 3	Ratón Anti-Humano STRO-1 (CD34+ células de médula ósea)
Ratón Anti-Humano Fibroblasto	CLON: 5B5	Purificado	Abcam

**Tabla II: Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo.**

**Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.**

## Anexo 2:

### Estrategia de búsqueda bibliográfica:

#### Objeto de Estudio:

¿Son capaces las células madre mesenquimales de oveja, CMMo, de diferenciarse a osteoblastos sobre materiales de colágeno y  $\beta$ -fosfato tricálcico?

Con el fin de llevar a cabo una búsqueda de CMMo y la utilización biomateriales de colágeno y  $\beta$ -fosfato tricálcico en la regeneración ósea, se realizó una estrategia de búsqueda en las siguientes bases de datos a principios de diciembre de 2013, complementándose con nuevas búsquedas a finales de Enero y entre finales de Abril y Mayo

#### Criterios de Inclusión y de Exclusión:

Se ha decidido escoger artículos sobre la diferenciación de CMM ovina, junto con otra búsqueda de artículos de revisión sobre bioingeniería ósea en oveja, debido a la escasez, se ha ampliado la búsqueda a la utilización de CMM humanas. Artículos siempre en inglés.

Se ha limitado los estudios de entre los años 2005 -2014. Posteriormente se ha acotado la búsqueda en el area de la bioingeniería a los materiales de colágeno y  $\beta$ -fosfato tricálcico

#### Estrategia de búsqueda:

Se ha llevado a cabo una búsqueda en MEDLINE, Pubmed, por ser la más significativa en ciencias de la salud:

- "Mesenchymal Stromal Cells"[Mesh] AND "Sheep, Domestic"[Mesh]
- "mesenchymal stromal cells"[MeSH Terms] OR ("mesenchymal"[All Fields] AND "stromal"[All Fields] AND "cells"[All Fields]) OR "mesenchymal stromal cells"[All Fields] OR ("mesenchymal"[All Fields] AND "stem"[All Fields] AND "cells"[All Fields]) OR "mesenchymal stem cells"[All Fields] AND (("cell differentiation"[MeSH Terms] OR ("cell"[All Fields] AND "differentiation"[All Fields]) OR "cell differentiation"[All Fields] OR "differentiation"[All Fields]) AND osteogenic[All Fields]) AND (domestic[All Fields] AND ("sheep, domestic"[MeSH Terms] OR ("sheep"[All Fields] AND "domestic"[All Fields]) OR "domestic sheep"[All Fields] OR "ovine"[All Fields])).

Diferenciación *in vitro* de CMMo sobre biomateriales de Col1 y  $\beta$ -FTC.

- osteogenic[All Fields] AND (scaffold[All Fields] AND colageno[All Fields]) OR ("beta-tricalcium phosphate"[Supplementary Concept] OR "beta-tricalcium phosphate"[All Fields] OR "beta tricalcium phosphate"[All Fields]) AND ("sheep, domestic"[MeSH Terms] OR ("sheep"[All Fields] AND "domestic"[All Fields]) OR "domestic sheep"[All Fields] OR "sheep"[All Fields] OR "sheep"[MeSH Terms])

## Anexo 3:

### Consentimiento informado



#### CERTIFICADO

D. Alberto Centeno Cortés y D.ª Nieves Domenech García en calidad de presidente y vicepresidente del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) y en virtud de lo dispuesto en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos:

#### CERTIFICAN:

- Que D. Francisco J. Blanco García ha presentado para su evaluación por el CEEA el proyecto de investigación titulado: *INGENIERÍA TISULAR EN UN MODELO ANIMAL DE IMPLANTOLOGÍA ORAL*.
- Que una vez evaluado dicho proyecto por todos los miembros del CEEA ha obtenido por unanimidad la valoración de APTO conforme a la legislación vigente.
- Que la totalidad del proyecto va a realizarse en las instalaciones de la Unidad de Investigación y la Unidad de Cirugía Experimental del CHUAC inscrita en el Libro de Registro de la Consellería de Agricultura de la Xunta de Galicia como Centro Usuario de Animales de Experimentación con el nº ES150300014801 // 150002AE.
- Que todos los procedimientos de cuidado, manipulación, quirúrgicos y eutanásicos a los que se someta a los animales, serán realizados por el personal de la Unidad de Cirugía Experimental. Dicho personal está cualificado en todos los grupos profesionales: A, B, C, D1 y D2.

Lo cual firmamos y sellamos en A Coruña a 20 de julio de 2012.



D. Alberto Centeno Cortés  
Presidente del CEEA

D.ª Nieves Domenech García  
Vicepresidente del CEEA

## Anexo 4:

### Difusión de los resultados obtenidos en el presente TFM.

- Biointegrasaúde 2014. 3 Junio 2014. Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), A Coruña. Comunicación tipo póster. Título del póster: Ingeniería tisular del hueso empleando células madre mesenquimales ovinas cultivadas en biomateriales de colágeno y beta fosfato tricálcico. Autores: Sanjurjo-Rodríguez C, **Fernández-Vázquez T**, Seijo-Calviño I, Hermida-Gómez T, Fuentes IM, Cruz JM, Díaz-Prado S, Blanco FJ.
- II Jornadas Científicas Universitarias en Implantología Oral “Balcón del Atlántico”. 30-31 Mayo de 2014. Universidade da Coruña, A Coruña. Comunicación tipo póster. Título del póster: Regeneración ósea mediante el uso de células madre mesenquimales y biomateriales: modelo ovino. Autores: Sanjurjo-Rodríguez C, **Fernández-Vázquez T**, Seijo-Calviño I, Hermida-Gómez T, Seoane-Mato V, Cruz-Valiño JM, Fuentes-Boquete IM, Díaz-Prado SM, Blanco FJ.