

Combinación de Terapias Celulares para la Reparación de Lesiones de Cartílago.

Autor/a: Pablo Fernández Pernas

Tesis doctoral UDC / Año 2017

Director/a: Dra. M^a del Carmen Arufe Gonda

Director/a: Dr. Francisco Javier Blanco García

Programa Oficial de doctorado en Ciencias de la salud (RD 1393/2007).



RESUMEN

El cartílago articular humano se ve afectado por diversas enfermedades reumáticas tales como la osteoartritis (OA) y presenta una capacidad de regeneración muy limitada. Las terapias celulares con células madre mesenquimales (CMMs) y de condrocitos articulares (CAs) representan un campo prometedor en la medicina reparativa de cartílago. La siguiente tesis se trata de un compendio de investigaciones diseñadas para entender mejor los procesos que llevan a la degradación de este tejido y, en especial, para desarrollar diversas estrategias que permitan una reparación mejor y más efectiva del mismo en un futuro.

En el primer estudio, se examinó el efecto de la sobre-expresión de lamina A (LMNA), o su forma mutante progerina (PG), sobre el potencial de diferenciación de CMMs de cordón umbilical humano (CU). La acumulación de lamina A (LMNA) se ha asociado previamente con el fenotipo de condrocito artrósico (OA). Las mutaciones de esta proteína están ligadas a laminopatías y específicamente al Síndrome de Hutchinson-Gilford Progeria (HGPS), una enfermedad de envejecimiento acelerado. Algunos autores han propuesto que la desregulación de la LMNA afecta el potencial de diferenciación de las células madre. Nuestros resultados muestran que el potencial condrogénico es defectuoso en células que sobre-expresan PG (PG-CMMs), a pesar de que tanto éstas como las transducidas con lamina A (LMNA-CMMs), presentan un aumento de marcadores de hipertrofia durante la condrogénesis. Ambas líneas mostraron una disminución de la manganeso superóxido dismutasa (MnSODM), y alteraciones en su capacidad migratoria. Por último, los defectos en la condrogénesis se invierten parcialmente mediante incubación periódica con un agente secuestrador de ROS. Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de LMNA y PG produce defectos en el potencial de diferenciación condrogénica debido parcialmente a un desequilibrio en el estrés oxidativo.

En el segundo estudio se investigó una posible mejora de los medios condrogénicos actuales en CMMs - CU. El objetivo era determinar si las hormonas prolactina (PRL) y la *3,3'-5-triyodo-L-tironina* (T3), la hormona tiroidea activa, modula la condrogénesis en nuestro modelo *in vitro*, y si la ruta de señalización Wnt está implicada en dicha modulación. Las CMM-CU se sometieron a condrogénesis utilizando un sistema de esferoides. La adición de T3 al medio condrogénico aumentó la expresión de genes ligados a la condrogénesis como el COL2, las integrinas alfa-10 y beta-1 (ITG α 10, ITG β 1) y SOX9, según un análisis de qPCR. Los niveles de COL2, y ACAN analizados por inmunohistoquímica y tinción con Safranina O se incrementaron después de 14 días de condrogénesis en esferoide con T3, en comparación con los esferoides sin T3 o sólo con PRL. La expresión de β -catenina, Frizzled y GSK-3 β fueron significativamente mayores en los esferoides cultivados con T3. Dicha mejora condrogénica se inhibió cuando las células fueron tratadas con T3 más ML151, un inhibidor del receptor de esteroides T3. Este trabajo demuestra, por primera vez, que T3 promueve la diferenciación condrogénica en nuestro modelo *in vitro*, y que esta diferenciación está mediada por el receptor esteroideo co-activador (SRC2).

En el tercer estudio se generaron células genéticamente modificadas capaces de resistir el proceso de inflamación mediante la delección del receptor de interleuquina 1. Las citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β se encuentran en niveles elevados en tejidos enfermos o lesionados y promueven una rápida degradación tisular mientras que previenen la diferenciación de las células madre. Debido a esto unas células inmunes a sus señales podrían representar una útil estrategia en terapia celular. Se modificaron

condrocitos articulares humanos (CAs) y CMM inmortalizadas (3A6) mediante el sistema CRISPR-Cas en combinación con un vector diseñado para silenciar el receptor de IL-1 β (IL1R1). Las células fueron estimuladas con rIL-1 β y rTNF α en monocapa para evaluar la respuesta inflamatoria en las células IL1R1-KO. La condrogénesis se realizó en discos de alginato y con medio de diferenciación condrogénico con y sin rIL-1 β . Se realizaron análisis de qPCR y western-blot para investigar la expresión de los mRNAs y proteínas de las células IL1R1-resistentes, además de una caracterización biológica y por citometría de flujo en el caso de las CMM. La expresión génica de IL1R1 se redujo significativamente en las células modificadas. La adición de rIL-1 β no aumentó la expresión de IL-1B, IL-6 y IL-8 en las células IL1R1-KO mientras que si lo hizo de manera significativa en las células control no editadas. Los estudios de diferenciación condrogénica indicaron que las células IL1R1-KO en presencia de rIL-1 β alcanzan un nivel de rediferenciación/diferenciación equivalente o similar al de los controles en ausencia de rIL-1 β , y presentaban un significativo aumento en expresión de los genes SOX9, ACAN y COL2A1. En presencia de rIL-1 β se observó que en las células control aumentaba la expresión de los genes IL-1 β , IL6 y IL8, mientras que la transcripción y síntesis de los genes SOX9, ACAN y COL2A1 fue bloqueada. En contraste, IL-1B, IL-6 y IL8, no aumentaron en las células IL1R1-KO, y el efecto inhibitorio de rIL-1 β sobre los genes SOX9, ACAN y COL2A1 fue suprimido totalmente.

El cuarto estudio trata de un modelo animal en primates, en el que estudiamos el proceso de migración específica de CMM de membrana sinovial desde el torrente sanguíneo hasta las articulaciones lesionadas. Inyectamos por vía intravenosa y directamente en la articulación de los animales una población enriquecida en células madre mesenquimales CD105⁺ (CD105⁺-CMM) de membrana sinovial humana. Las CD105⁺-CMM se marcaron con oxocarbocianina (DiO) cuando se inyectaron por vía intravenosa (IV) u octadecil (C18) indocarbocianina (DiI) cuando se inyectaron intra-articularmente (IA) directamente en la rodilla, para seguir sus evoluciones y localización a través de los animales. Los animales utilizados fueron *Macaca Fascicularis* adultos a los que se les provocó una lesión en la rodilla izquierda para crear un modelo animal de osteoartritis (OA). La rodilla derecha se utilizó como control. Se inyectaron CD105⁺-CMM dos veces en los monos OA con un intervalo de una semana entre ellos. Los animales se sacrificaron un mes después del tratamiento. El análisis inmunohistoquímico de diferentes órganos: bazo, corazón, grasa, hígado, intestino, páncreas, pulmón, músculo esquelético y riñón de los animales reveló que las CD105⁺-CMM migraron hacia la articulación dañada. Algunas células marcadas fueron encontradas en el bazo, pulmón, hígado y ganglios. No se encontraron teratomas. Se encontró un aumento significativo de CMM nativas en la rodilla lesionada frente a la sana. Las células CD105⁺-CMM resultaron negativas para CD68 y el área donde se encontraron presentó un aumento de SDF-1 frente a la rodilla sana. Este estudio se validó mediante la inyección células marcadas con GFP mediante transducción lentiviral y los resultados fueron similares. Concluimos que la población CD105⁺-CMM fue reclutada por la rodilla dañada y podría ser una alternativa segura para la terapia celular en patologías claramente localizadas como la OA de rodilla.

RESUMO

A cartilaxe articular humana vese afectada por varias enfermidades reumáticas como a osteoartritis (OA) e ten unha capacidade de rexeneración moi limitada. As terapias celulares con células estaminais mesenquimais (CSMs) e condrocitos articulares (CAs) representan un campo esperanzador na medicina reparadora da cartilaxe. A seguinte tese é un compendio de investigacións deseñadas para entender mellor os procesos que levan á degradación deste tecido e, sobre todo, para desenvolver diversas estratexias para unha mellor e máis eficaz reparación do mesmo no futuro.

No primeiro estudo, foi examinado o efecto sobre-expresión de lamina A (LMNA) ou a súa variante mutante proxerina (PG) sobre o potencial de diferenciación das CSMs procedentes de cordón umbilical humano (CU). A acumulación de lamina A (LMNA) foi previamente asociada ó fenotipo de condrocitos artrósicos (OA). As mutacións nesta proteína están ligadas a laminopatías e, especialmente, ó síndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS), unha enfermidade de envellecemento acelerado. Algúns autores suxeriron que a desregulación da LMNA afecta o potencial de diferenciación das células estaminais. O noso conxunto de resultados mostra que o potencial condroxénico é defectuoso en células que sobre-expresan PG (PG-CSMs), e que as transduzidas con lamina A (LMNA-CSMs) presentan un aumento nos marcadores de hipertrofia durante condroxénese. Ambas liñas mostraron unha diminución de manganeso superóxido-dismutasa (MnSODM), e cambios na súa capacidade migratoria. Por último, os defectos na condroxénese foron parcialmente revertidos coa incubación periódica cun axente de eliminación de ROS. Os nosos resultados indican que a sobre-expresión de LMNA e PG produce defectos no potencial de diferenciación condrogénica, en parte, debido a un desequilibrio no estrés oxidativo.

No segundo estudo, investigouse unha posible mellora nos medios condroxénicos actuais para CSMs-CU. O obxectivo era determinar se as hormonas prolactina (PRL) e *3,3'-5-triiodo-L-tironina* (T3), a hormona activa da tiroide, modula a condroxénese no noso modelo *in vitro*, e se a vía de sinalización Wnt toma parte na referida modulación. As CSMs-CU sometéronse a condroxénese usando un sistema de esferóides. A adición de T3 no medio condroxénico aumentou a expresión de xenes ligados á condroxénese como Col2, integrinas alfa-10 e beta-1 (ITG α 10, ITG β 1) e SOX9, segundo a análise por qPCR. Os niveis de COL2, e ACAN analizados por inmuno-histoquímica e tinctura con safranina O aumentaron tras 14 días de condroxénese en esferóides con T3, en comparación cos esferóides sen T3 ou con PRL. A expresión de β -catenina, a GSK-3 β Frizzled e foron significativamente maiores nos esferóides cultivados con T3. Tales melloras inhibíase cando as células foron tratadas con T3 máis ML151, un inhibidor do receptor esteroideo de T3. Este traballo demostra, por primeira vez que T3 promove a diferenciación condrogénica no noso modelo *in vitro*, e esta diferenciación é mediada polo receptor de esteroides coactivador (SRC2).

No terceiro estudo, xeramos células modificadas xeneticamente, capaces de resistir o proceso de inflamación por supresión do receptor da interleucina 1. As citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 β son elevados en tecidos enfermos ou feridos e promoven a rápida degradación do tecido, evitando ademais a diferenciación de células estaminais. Debido a isto as células inmunes aos seus sinais poden representar unha estratexia útil en terapia celular. Condrocitos articulares humanos (CAs) e células estaminais mesenquimais foron xeneticamente editadas mediante o sistema CRISPR-Cas en combinación con un vector deseñado para silenciar o receptor de IL-1 β (IL-1R1). As células foron estimuladas con IL-1 β e TNF α en monocapa para avaliar a resposta inflamatoria nas células IL-1R1-KO. A condroxénese realizouse en discos de alxinato con medio condroxénico sen e con IL-1 β . Leváronse a cabo análises de qPCRs e western-

blot para investigar a expresión dos ARNm e proteínas nas células resistentes a IL1R1. A expresión do xen IL1R1 foi significativamente reducida nas células modificadas. A adición de IL-1 β non aumentou a expresión de IL-1B, IL-6 e IL-8 nas células IL-1R1-KO mentres que so o fixo nas células control non editadas. Os estudos de diferenciación condroénica indican que as células de IL1R1-KO en presenza de IL-1 β atinxen un nivel de diferenciación/rediferenciación equivalente ou similar ós dos controis en ausencia de IL-1 β , e mostraron un aumento significativo na expresión de xenes SOX9, ACAN e COL2A1. En presenza de IL-1 β , as células control aumentaron a expresión dos xenes IL-6 e IL-8, mentres a transcrición e síntese de SOX9, ACAN e COL2A1 foi bloqueada. En contraste, a IL-1B, IL-6 e IL-8, non aumentou nas células IL-1R1-KO, e o efecto inhibitor de IL-1 β en SOX9, ACAN e COL2A1 foi suprimido por completo.

O cuarto estudo é un modelo animal en primates. Estudouse o proceso de migración específica de CSMs de membrana sinovial dende o torrente sanguíneo ás articulacións danadas. Inxectamos intravenosamente e directamente na articulación unha poboación de CSMs positivas para o marcador de superficie CD105 (CD105⁺-CSM). As células marcáronse con oxocarbocyanine (DIO) cando eran inxectadas por vía intravenosa (IV) ou octadecilo (C18) indocarbocianina (DII), cando a inxección era intra-articular (IA) directamente ao xeonllo, para seguir os seus movementos e situación través dos animais. Os animais utilizados foron *Macaca fascicularis* adultos ós que provocóuselles unha lesión no xeonllo esquerdo para crear un modelo animal osteoartrósico (OA). O xeonllo dereito foi usado como control. As células CD105⁺ marcadas inxectáronse dúas veces cun intervalo dunha semana. Os animais foron sacrificados un mes despois do tratamento. O análise inmunohistoquímico de diferentes órganos: bazo, corazón, graxa, fígado, intestino, páncreas, pulmón, músculo esquelético e ril revelaron que as CD105⁺-CMM migrado cara á articulación danada. Algunhas células marcadas foron atopados nos nódulos do bazo, pulmón, fígado e nódulos linfáticos. Non se atoparon teratomas. Apareceu un aumento significativo de CSM nativas no xeonllo lesionado fronte ó sano. As células CD105⁺-CMM foron negativas para CD68 e a zona onde se atoparon mostrou un aumento de SDF-1 en comparación co xeonllo saudable. Este estudo foi validado por inxección de células macadas con GFP e os resultados foron semellantes. Concluimos que a poboación CD105⁺-CSM foi reclutada polo xeonllo danado e que pode ser unha alternativa segura para a terapia celular en patoloxías claramente situadas coma a OA de xeonllo.

ABSTRACT

Human articular cartilage is affected by several rheumatic diseases such as osteoarthritis (OA) and has a very limited regeneration capacity. Cell therapies with mesenchymal stem cells (MSCs) and articular chondrocytes (ACs) represent a promising field in cartilage repair medicine. The following thesis is a compendium of researches designed to better understand the processes that lead to the degradation of this tissue and, especially, to develop strategies to get a better repair in the future.

In the first study, we examined the effect of the over-expression of LMNA, or its mutant form progerin (PG), on the mesoderm differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord (UC) stroma using a recently described differentiation model employing spheroid formation. Accumulation of lamin A (LMNA) was previously associated with the osteoarthritis (OA) chondrocyte phenotype. Mutations of this protein are linked to laminopathies and specifically to Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome (HGPS), an accelerated aging disease. Some authors have proposed that a deregulation of LMNA affects the differentiation potential of stem cells. The chondrogenic potential is defective in PG-MSCs, although both PG and LMNA transduced MSCs, have an increase in hypertrophy markers during chondrogenic differentiation. Furthermore, both PG and LMNA-MSCs showed a decrease in manganese superoxide dismutase (MnSODM), an increase of mitochondrial MnSODM-dependent reactive oxygen species (ROS) and alterations in their migration capacity. Finally, defects in chondrogenesis are partially reversed by periodic incubation with ROS-scavenger agent that mimics MnSODM effect. Our results indicate that over-expression of LMNA or PG by lentiviral gene delivery leads to defects in chondrogenic differentiation potential partially due to an imbalance in oxidative stress.

The second study, aimed to determine whether lactogenic hormone prolactin (PRL) or *3, 30, 5-triiodo-L-thyronine* (T3), the active thyroid hormone, modulates chondrogenesis in our in vitro model of directed chondrogenic differentiation, and whether Wnt signalling is involved in this modulation. MSCs from human umbilical cord stroma underwent directed differentiation toward chondrocyte-like cells by spheroid formation. The addition of T3 to the chondrogenic medium increased the expression of genes linked to chondrogenesis like collagen type 2, integrin alpha 10 beta 1, and Sox9 measured by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) analysis. Levels of collagen type 2 and aggrecan analyzed by immunohistochemistry, and staining by Safranin O were increased after 14 days in spheroid culture with T3 compared to those without T3 or only with PRL. B-catenin, Frizzled, and GSK-3b gene expressions were significantly higher in spheroids cultured with chondrogenic medium (CM) plus T3 compared to CM alone after 14 days in culture. The increase of chondrogenic differentiation was inhibited when the cells were treated with T3 plus ML151, an inhibitor of the T3 steroid receptor. This work demonstrates, for first time, that T3 promotes differentiation towards chondrocytes-like cells in our in vitro model, that this differentiation is mediated by steroid receptor co-activator 2 (SRC2) and does not induce hypertrophy.

In the third study, genetically modified cells capable of resisting the inflammation process were generated by deletion of the interleukin 1 receptor. Pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β are found in elevated levels in diseased or injured tissues and promote rapid Tissue degradation while preventing the differentiation of stem cells. Because of this cells immune to their signals could represent a useful strategy in cell therapy. Human articular chondrocytes (CAs) and immortalized CMM (3A6 line) were modified by the CRISPR-Cas system in combination with a vector designed to silence the IL-1 β (IL1R1) receptor. Cells

were stimulated with rIL-1 β and rTNF α in monolayer to evaluate the inflammatory response in IL1R1-KO cells. Chondrogenesis was performed on alginate disks and with chondrogenic differentiation medium with or without rIL-1 β . qPCR and western blot analyzes were performed to investigate the expression of the mRNAs and proteins of IL1R1-resistant cells, in addition to a biological characterization and by flow cytometry in the case of CMM. Gene expression of IL1R1 was significantly reduced in the modified cells. The addition of rIL-1 β did not increase the expression of IL-1B, IL-6 and IL-8 in IL1R1-KO cells whereas it did significantly in the unedited control cells. Chondrogenic differentiation studies indicated that IL1R1-KO cells in the presence of rIL-1 β reach a level of redifferentiation / differentiation equivalent similar to controls in the absence of rIL-1 β , and exhibited a significant increase in expression of SOX9, ACAN and COL2A1 genes. In the presence of rIL-1 β it was observed that in the control cells the expression of the IL-1 β , IL6 and IL8 genes increased, whereas the transcription and synthesis of the SOX9, ACAN and COL2A1 genes was blocked. In contrast, IL-1B, IL-6 and IL8 did not increase in IL1R1-KO cells, and the inhibitory effect of rIL-1 β on the SOX9, ACAN and COL2A1 genes was completely suppressed.

In the last study , we have injected via intravenous and directly into the monkey joint a CD105⁺ enriched population of mesenchymal stem cells (CD105⁺-MSCs) from human synovial membrane, previously characterized by flow cytometry. CD105⁺-MSCs were labelled with oxacarbocyanine (DiO) when they were injected via intravenous (IV) and with octadecyl (C18) indocarbocyanine (Dil) when they were intra-articular (IA) injected directly into the knee, to follow their evolutions and location through the animals. The animal models used were adult *Macaca Fascicularis* which had been injured into the left knee to create an Osteoarthritis (OA) animal model and the right knee was used as control. CD105⁺-MSCs were injected twice into the OA monkeys with an interval of one week between them. The animals were sacrificed one month after treatment. Immunohistochemistry analysis of different organs: spleen, heart, fat, liver, gut, pancreas, lung, skeletal muscle and kidney from the animals revealed that CD105⁺-MSCs migrated towards the injured knee joint. Some labelled cells were found in the spleen, lung, liver and ganglion and teratomes were not found in any organs from any animals. MSCs naive were found statistically significant increased in the injured knee in front of healthy one. CD105⁺-MSCs were negatives for CD68 and the area where CD105⁺-MSCs were found presented SDF-1 increased levels in front of healthy knee. This study was validated injecting gene modified MSCs expressing GFP in OA monkeys and the results were similar. We concluded that a characterized MSCs subset could be a safer alternative for cell therapy in clearly localized pathologies as osteoarthritis in the knee.

CONTENIDO

1	Introducción	1
1.1	Biología del cartílago	1
1.1.1	El cartílago articular	2
1.1.2	La matriz extracelular	5
1.1.3	Condrogénesis y formación de hueso endocondral	8
1.2	Células madre	12
1.2.1	Células madre mesenquimales	16
1.3	Lesiones en el cartílago y tratamiento	22
1.3.1	Lesiones	22
1.3.2	Tratamiento	25
2	Justificación y objetivos	29
3	Material y métodos	31
3.1	Obtención y aislamiento de CMMs y condrocitos	31
3.1.1	CMMs de cordón umbilical	31
3.1.2	CMMs de membrana sinovial	32
3.1.3	Condrocitos Articulares	32
3.2	Cultivo de CMMs y CAs	33
3.3	Caracterización por citometría de flujo	34
3.4	Separación de subpoblaciones de CMMs CD105 ⁺	35
3.5	Marcaje de CMMs CD105 ⁺	35
3.6	Modificación genética	36
3.6.1	Transduccion lentiviral de PG,LMNA y GFP	36

3.6.2	Sistema CRISPR-cas9	38
3.6.3	Selección de las células transducidas.....	40
3.7	Ensayo de proliferación.....	40
3.8	Condrogénesis in vitro	40
3.8.1	Esferoides	40
3.8.2	En discos de alginato.	42
3.8.3	Condrogénesis con T3 y PRL	43
3.8.4	Estudios con NAC.....	44
3.9	Diferenciación hacia adipocitos.....	44
3.10	Diferenciación hacia osteoblastos	44
3.11	Estimulación inflamatoria.....	45
3.12	Análisis Histológico e inmunohistoquímico	45
3.12.1	En esferoides	45
3.12.2	En el modelo animal de primate no humano.....	46
3.12.3	Densitometría	46
3.13	Inmunofluorescencia.....	47
3.13.1	Esferoides	47
3.13.2	Morfología nuclear en CMMs	47
3.13.3	En el modelo animal de primate no humano.....	47
3.14	Análisis de la expresión génica	48
3.14.1	Extracción de ARNm	48
3.14.2	PCR a tiempo real	50
3.15	Análisis de la expresión proteica	52
3.15.1	Extracción de proteínas totales	52

3.15.2 Western-blot	53
3.16 Medición de ROS	54
3.17 Análisis de la migración celular.....	54
3.18 Microscopía electrónica	55
3.19 Modelo Animal OA	55
3.19.1 Análisis bioquímico y serológico	56
3.20 Tratamiento estadístico de los datos.....	57
5 Resultados	59
5.1 Efecto de la sobreexpresión de lamina y progerina en el potencial de diferenciación mesodérmica en CMMs procedentes de cordón umbilical.....	59
5.1.1 Acumulación de LMNA y PG en las células transfectadas.	59
5.1.2 Potencial de diferenciación de las PG-CMMs y LMNA-CMMs vs GFP-CMM	61
5.1.3 Papel de las especies reactivas de oxígeno	65
5.2 Papel de PRL y T3 en la condrogénesis in vitro de CMMs procedentes de cordón umbilical.....	68
5.2.1 Caracterización de CMMs	68
5.2.2 Estudio de la condrogénesis	70
5.2.3 Estudio de la hipertrofia	75
5.2.4 Expresión de Wnt durante la condrogénesis	77
5.3 Generación de CAs y CMMs resistentes a la IL-1B mediante la técnica CRISPR-Cas	79
5.3.1 Caracterización de las células 3A6	79
5.3.2 Eficiencia de la delección del receptor IL1R1.....	81

5.3.3	Respuesta inflamatoria	83
5.3.4	Condrogénesis	86
5.4	Estudio de la migración de CMMs en un modelo animal primate no humano	89
5.4.1	Aislamiento, caracterización y marcaje de CD105 ⁺ -CMMs ...	89
5.4.2	Análisis inmunohistoquímico e inmunofluorescencia.....	91
6	Discusión	100
6.1	La desregularización de Lamina A en CMMs	100
6.2	La T3 en la condrogénesis in vitro	105
6.3	Generación de células resistentes a IL-1B mediante el sistema CRISPR / Cas9	110
6.4	Migración de CMMs en un modelo animal de primate no humano.....	114
7	Conclusiones.....	117
	Conclusions.....	118
8	Referencias	119
9	Difusión de resultados	143

1 INTRODUCCIÓN

1.1 BIOLOGÍA DEL CARTÍLAGO

Existen diferentes formas de cartílago en el cuerpo humano: Hialino, elástico, y fibroso. En esta serie de estudios nos centraremos en el cartílago hialino y en como repararlo. Al cartílago hialino se le conoce comunmente como cartílago articular y se encuentra recubriendo la superficie de los huesos que se encuentran en las articulaciones artrósicas. Su función es absorber los golpes y de esta forma permitir un movimiento suave, impidiendo fricciones y proporcionando un correcto acoplamiento. En resumen, lo que distingue a los tres tipos principales de cartílago son los componentes de su matriz extracelular (MEC). La MEC en el cartílago articular está formada principalmente por fibras de colágeno, y proteoglicanos, pero no presenta fibras elasticas. El cartílago elástico, que se encuentra principalmente en la epiglotis y en el pabellon y conducto auditivo, presenta una MEC con fibras de tipo elástico, además de los mismos componentes que en en el caso del cartílago articular. Por su parte, el cartílago fibroso se puede considerar un tejido de transición entre el cartílago hialino y el tejido conectivo denso. Se encuentra en sitios como la sínfisis del pubis, trompa de Eustaquio, anillos de los discos intervertebrales y en algunos ligamentos. La MEC de este tipo de cartílago difiere de la del articular sobretodo en los tipos de colágeno depositados ⁽¹⁾.

1.1.1 El cartílago articular

El cartílago articular es un tejido altamente especializado. Es avascular y carece de inervación, nutriéndose a partir de moléculas del líquido sinovial que atraviesan su superficie. Presenta un grosor medio de 2 – 2.5 mm (con variaciones anatómicas y topográficas) ^(2,3). Está formado principalmente por agua, colágenos, proteoglicanos, glucosaminoglicanos (GAGs) y, en menor medida, glicoproteínas y otras moléculas ⁽⁴⁾. Presenta un único tipo celular, los condrocitos, que secretan la matriz. La renovación de la matriz es muy lenta y los condrocitos suelen estar en reposo, apenas se dividen. La matriz extracelular consiste en una red densa de fibras, sobretodo de colágeno tipo II. Dentro de la red de colágeno de tipo II, se encuentran macroagregados de proteoglicanos hidrófilos. Éstos, cargados con moléculas de agua, confieren tensión a las fibras de colágeno. Las presiones cíclicas que actúan sobre el cartílago movilizan las moléculas de agua dentro de la matriz. La estabilización de la matriz extracelular depende de las glucoproteínas y de los proteoglicanos pequeños, una de cuyas funciones es unir las moléculas entre sí. En la periferia inmediata del condrocito hay una zona de pH ácido con abundantes moléculas puente que, por un lado, se fijan a los receptores de membrana y, por el otro, a las moléculas matriciales. Entre los receptores de membrana, las integrinas actúan como mecanorreceptores indispensables para las funciones de supervivencia de la célula. Cualquier modificación de las integrinas y/o de la zona pericelular provoca, de entrada, cambios metabólicos y fenotípicos del condrocito. Al envejecer, el cartílago sufre algunos cambios, entre los cuales destacan la disminución del número de condrocitos, así como modificaciones cualitativas y cuantitativas de los proteoglicanos. El cartílago senescente, sobre todo, muestra menos resistencia a las exigencias mecánicas, lo cual constituye una fuente

potencial de artrosis, siendo las relaciones entre el envejecimiento del cartílago y la enfermedad artrósica muy estrechas⁽⁵⁾.

Tradicionalmente, el cartílago articular está en cuatro zonas diferentes basandose en sus diferencias funcionales y estructurales: Capa superficial, capa media, capa profunda y zona calcificada o mineralizada **(Figura 1.1)**.

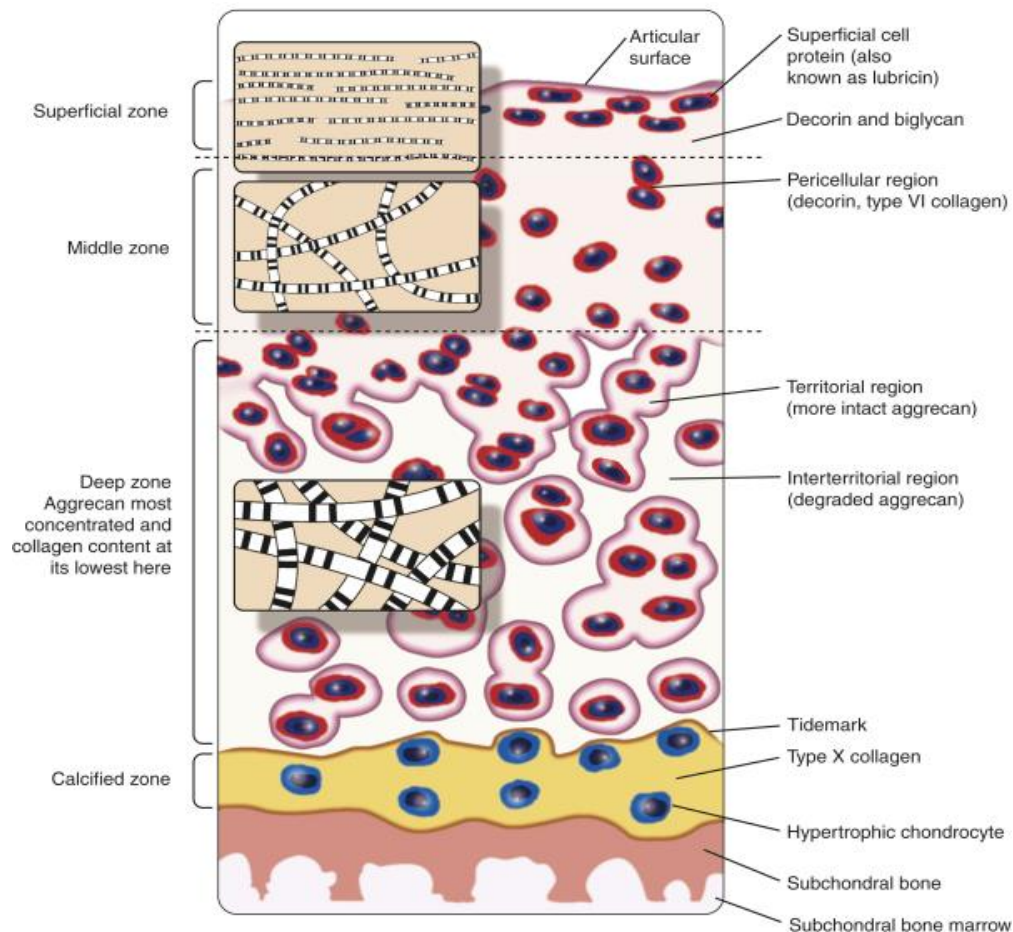


Figura 1.1: Estructura del cartílago articular humano, mostrando la diferenciación zonal y el grosor relativo de las fibras de colágeno. (Poole et. Al., 2001) ⁽⁵⁾

La zona superficial limita con la cavidad articular y esta bañada en el fluido sinovial. Los condrocitos en esta zona presentan una morfología aplanada o discoidal y secretan finas fibras de colágeno orientadas horizontalmente en relación a la superficie articular ⁽⁶⁾. Se ha sugerido que la capa superficial también presenta células progenitoras responsables del crecimiento durante el desarrollo ⁽⁷⁾. Tiene una concentración relativamente baja de proteoglicanos, pero los condrocitos de esta capa secretan lubricina (también llamada proteoglicano 4), que reduce la fricción y actúa como lubricante en la articulación ^(5,8). A continuación, se encuentra la zona media, con condrocitos más ovales, y mayor contenido en proteoglicanos contenidos en una matriz de fibras de colágeno II, más gruesas que las anteriores y con una disposición más azarosa. La siguiente zona es la llamada zona profunda o radial que tiene la densidad celular más baja y la mayor concentración de proteoglicanos. Aquí las fibras se disponen de manera más perpendicular a la superficie y los condrocitos se encuentran más o menos en línea, en paralelo a las fibras. Justo por debajo aparece la que se conoce como marca de agua, una fina área de transición que separa la zona de cartílago no calcificada de la zona calcificada. Los condrocitos en esta zona secretan colágeno tipo X, un marcador de hipertrofia, y son responsables de la calcificación de la MEC. A parte de esta organización zonal, existe también una organización regional de la MEC. El área que rodea a los condrocitos se conoce como región pericelular, donde la matriz es menos densa. La unidad formada por la región pericelular y su condrocito se denomina condrón, y está considerada como la unidad metabólica y funcional más pequeña en el cartílago articular ⁽⁹⁾. La zona pericelular se llama también región territorial, mientras que la zona más distante a las células se llama región inter-territorial ^(4,5,10).

1.1.2 La matriz extracelular

La MEC es lo que confiere al cartílago sus propiedades físicas. Sus componentes principales son los siguientes⁽¹⁰⁾:

1.1.2.1 *Proteoglicanos*

Son una clase de moléculas que consisten en una proteína como eje central, más o menos largo, en el que las ramas tienen una alta concentración de glicosaminoglicanos (GAGs o mucopolisacáridos), los cuales son una familia de heteropolisacáridos lineales formado por la repetición de unidades de disacáridos en las que uno de los constituyentes es N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina, mientras que el otro es por lo general un ácido monosacárido, ácido glucurónico, siendo los más representativos el condrotín sulfato, el keratán sulfato y el ácido hialurónico. En la matriz, los proteoglicanos están vinculados al esqueleto para formar agregados especiales en forma de pluma con un incremento enorme de la superficie, siendo extremadamente hidrófilos (debido a la presencia de carga negativa), de ahí la gran cantidad de agua presente en la matriz (65%). Al mismo tiempo, los proteoglicanos están unidos a fibrillas de colágeno, con el objetivo de limitar la absorción excesiva de agua, lo que modificaría radicalmente las propiedades físicas del cartílago. Esta estructura especial permite a los proteoglicanos la carga y descarga de agua, permitiendo que el cartílago actúe como una esponja para adaptarse a las diferentes necesidades de carga mecánica.

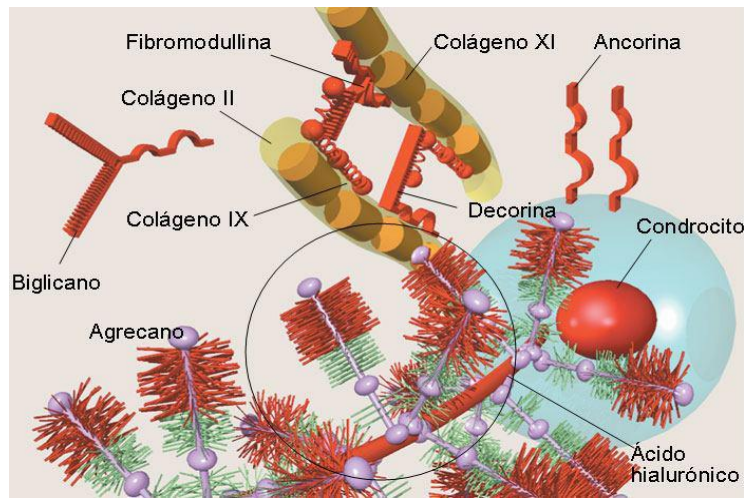
1.1.2.2 *Glicoproteínas*

Las glicoproteínas de la matriz extracelular son comparables a los proteoglicanos, salvo que el componente ramificado no siempre está presente y se subdividen en glicoproteínas asociadas, glicoproteínas estructurales y glicoproteínas ligadas a los procesos de calcificación. Las glicoproteínas estructurales como la fibronectina, la osteonectina y la condronectina recientemente han sido aisladas y parecen tener un gran interés biológico ya que tienen la función de crear un puente entre las moléculas en la matriz extracelular y el componente celular en esta matriz. La matriz extracelular del tejido conectivo también presenta una cantidad considerable de estructuras moleculares conocidos como fibras. Las fibras son ampliamente responsables de las propiedades físicas del tejido conectivo y se dividen en fibras de colágeno, fibras reticulares y fibras elásticas.

1.1.2.3 *Colágeno*

El colágeno es la proteína principal del tejido conectivo en animales y es la proteína más abundante en los mamíferos. En el caso del cartílago hialino, el tipo principal de colágeno es el colágeno tipo II. En los seres humanos representan aproximadamente el 6% del peso corporal (1 / 3 de la masa total de proteínas). Es una proteína de estructura compleja, el montaje de tres cadenas de microfibrillas que se entrecruzan, formando una fibra larga, los microfilamentos, que, a su vez, están formados por moléculas de tropocolágeno.

A)



B)

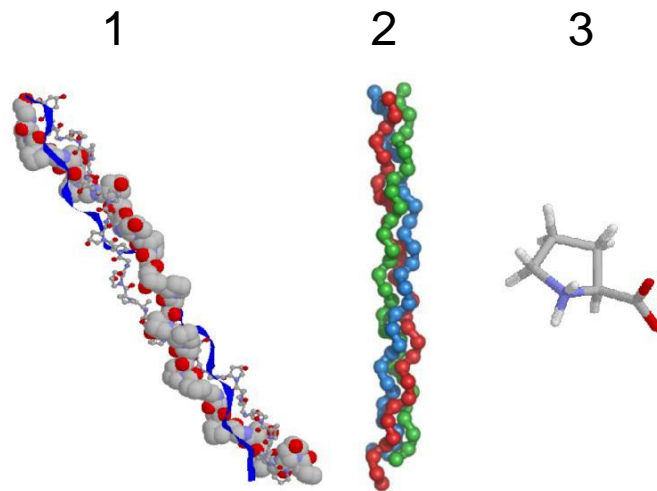


Figura 1.2: A) figura adaptada que representa la estructura y composición de la matriz extracelular obtenida de J. Martel-Pelletier et al. OA&C (2010) . B) estructura del coágeno tipo II desde las subunidades de prolina 3), la la estructura del tropocolágeno 2) y la estructura final del colágeno 1) obtenidas de Mathews Digital Library.

El tropocolágeno representa la unidad estructural del colágeno y es una proteína con peso molecular de aproximadamente 285 kDa, compuesta por tres cadenas de polipéptidos con conformación helicoidal (35% de glicina, alanina el 11% y 21% de prolina e hidroxiprolina). Estas tres cadenas se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y enlaces cruzados entre los residuos de lisina y formar una

triple hélice dextrógira. Dependiendo de la estructura primaria de cada cadena, es decir, cómo los aminoácidos se suceden en el triplete Gly-XY (donde X e Y representa cualquier aminoácido posible, incluso si X es a menudo la prolina y la hidroxiprolina Y), puede haber dos tipos diferentes de tropocolágeno, llamadas cadena α_1 y cadena α_2 , entrelazándose tres de estas para formar la fibra de colágeno.

Desde un punto de vista mecánico, la compleja estructura de colágeno (única en la naturaleza) le garantiza al tejido que lo contiene, excelente resistencia a la tracción y la compresión. La textura gruesa y fina de las fibras de colágeno, garantiza las características especiales de la elasticidad y resistencia.

Cada fibra se pliega sobre sí misma para formar un espacio formando así un arco de disposición típica, los dos extremos se colocan paralelos a la superficie ósea y el lado curvo coincide con la superficie libre de la capa de cartílago.

Con esta disposición, el cartílago obtiene la mayoría de sus propiedades elásticas, ya que todos los arcos, debido a la presión, amortiguan el impacto entre los segmentos óseos.

1.1.3 Condrogénesis y formación de hueso endocondral

Durante el desarrollo, el cartílago articular se forma a través de un proceso complejo y estrictamente regulado llamado condrogénesis. La mayor parte de lo que se conoce sobre la condrogénesis proviene de estudios *in vivo* en pollos y ratones. Durante el desarrollo de los huesos largos, el cartílago se forma primero y sirve como plantilla para el hueso futuro. Posteriormente, a través del proceso de formación de hueso endocondral (o de osificación endocondral), el cartílago es reemplazado

por hueso, excepto en los extremos, donde se convierte en el cartílago articular. El proceso completo se puede dividir en cinco etapas (condensación, diferenciación, diferenciación terminal, calcificación / hipertrofia y osificación) ⁽¹¹⁾, mostradas esquemáticamente en la figura 1.3. En el desarrollo de miembros de vertebrados, las células mesenquimales producen primero una MEC rica en ácido Hialurónico y Colágeno tipo I y II. Después las células proliferan y migran al centro de la extremidad, produciendo la agregación de las células (condensación). Durante la condensación, las células dejan de producir colágeno tipo I, inducen actividad hialuronidasa para degradar la HA y expresan moléculas de adhesión celular tales como N-CAM y N-Cadherina. Esto permite el movimiento, una estrecha agregación y las interacciones célula-célula, lo que posiblemente desencadenar chondrogenesis ^{(12, 13]}.

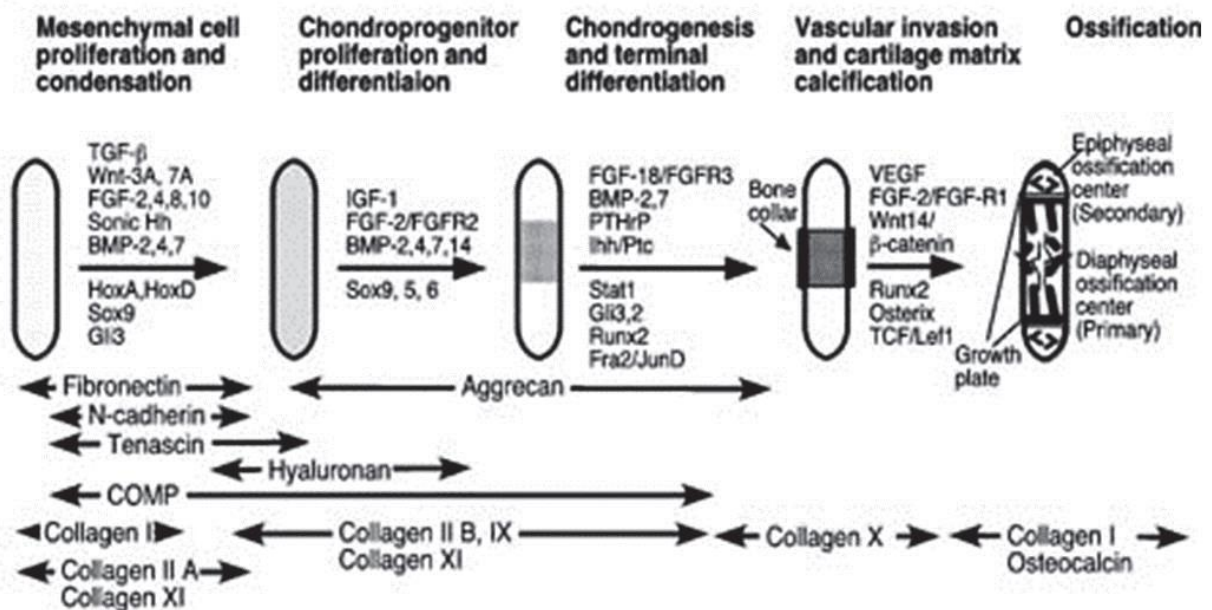


Figura 1.3: Representación esquemática de la condrogénesis y la formación de hueso endocondral, de Goldring et al., 2006 ⁽¹¹⁾.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una de las moléculas de señalización más tempranas expresadas durante la condrogénesis y se cree que regula la condensación induciendo la expresión de fibronectina, que a su vez regula la expresión de N-CAM y N-cadherina ^(14,15). El TGF- β también induce la expresión del factor de transcripción SRY (región determinante del sexo Y) - caja 9 (SOX9), que es esencial para la condensación, diferenciación y formación de cartílago ⁽¹⁶⁾.

Al final de la condensación, los sindecanos se unen a la fibronectina y regulan negativamente la expresión de la N-CAM, lo que marca la transición de la condensación a la diferenciación ⁽¹⁷⁾. Durante la diferenciación, SOX9, junto con L-SOX5 y SOX6, estimulan la expresión de importantes moléculas de MEC tales como agregano, proteína de enlace de cartílago y colágeno tipo II, IX y XI en una proteína dependiente de la proteína morfogenética ósea (BMP). La importancia de L-SOX5 y SOX6 para la diferenciación de condrocitos se demostró mediante la generación de ratones mutantes dobles que carecen tanto de L-SOX5 y SOX6. Estos ratones tenían un cartílago severamente subdesarrollado porque los condrocitos fueron detenidos en la etapa de condensación. Porque los condrocitos fueron detenidos en la etapa de condensación ^(18, 19). Durante la diferenciación terminal, los condrocitos maduran a medida que aumentan la producción de colágeno de los tipos II, IX y XI mientras disminuye la producción de fibronectina ⁽²⁰⁾. Como se muestra en la Figura 1.3, varios factores están involucrados en este paso. El equilibrio entre BMPs y FGFs (factores de crecimiento de fibroblastos) parece regular la proliferación y, por tanto, la tasa de diferenciación / maduración, mientras que el péptido de la hormona paratiroidea (PTHrP) y el hedgehog indio (IHH) regulan el compromiso hacia la diferenciación

hipertrófica. Al final de la diferenciación terminal, se cree que los condrocitos maduros se detienen en el ciclo celular antes de diferenciarse en condrocitos hipertróficos. Durante la hipertrofia, las células aumentan de tamaño y la expresión de colágeno tipo II aumenta en detrimento de la producción de colágeno tipo X (marcador hipertrófico). Otras moléculas que están asociadas con la hipertrofia son el VEGF, que atrae a los vasos sanguíneos, la metaloproteasa de la matriz (MMP) 13 y la MMP9, que remodelan la MEC, posiblemente degradando el colágeno tipo II y el agregano y la fosfatasa alcalina (ALPL), que está implicada en la calcificación de la MEC. El factor Runt 2 (RUNX2) tiene un papel importante en este proceso, ya que regula VEGF, MMP13 y ALPL (21-23).

En una etapa tardía de la hipertrofia, se reclutan osteoclastos y osteoblastos, y la MEC del cartílago mineralizado se elimina y reemplaza por hueso mientras que los AC hipertróficos sufren apoptosis (11). Sin embargo, el cartílago en el extremo de los huesos no sufre hipertrofia / osificación y no es reemplazado por hueso; Este es el cartílago articular y persiste durante toda la vida. Por lo tanto, el cartílago articular puede denominarse cartílago permanente, mientras que el cartílago sometido a osificación puede denominarse cartílago transitorio (24). No se conocen completamente los factores que regulan el destino de los cartílagos permanentes y transitorios. Sin embargo, el balance de SOX9 y RUNX2 puede determinar qué zonas permanecen siendo cartílago y cuales se transforman en tejido óseo. SOX9 no se expresa en condrocitos hipertróficos, mientras que RUNX2 es esencial para la hipertrofia (25,26).

1.2 CÉLULAS MADRE

Una célula madre o célula troncal es aquella que tiene capacidad de auto-renovarse mediante división simétrica y a la vez continuar con la vía de diferenciación para la que está programada mediante división asimétrica y, por lo tanto, producir células de uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de potencialidad ⁽²⁷⁾.

Casi todos los tejidos de un individuo poseen una población específica propia de células madre que permiten su renovación o su regeneración cuando se produce algún daño tisular ⁽²⁸⁾.

Existen varias formas de clasificar a las células madre:

Según su potencialidad, es decir, en base a la capacidad que poseen de regenerar diferentes tejidos, clasificándose por tanto en células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes ⁽²⁹⁾.

- Las **células madre totipotentes** tienen la capacidad de dar origen a un organismo completo (como las tres capas embrionarias y los tejidos que forman el saco vitelino), e incluso a uno extra-embrionario (como la placenta, por ejemplo).
- Las **células madre pluripotentes** pueden dar lugar a cualquier tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino. Pueden, por tanto, formar linajes celulares.

- Las **células madre multipotentes** son aquellas que sólo pueden generar tipos celulares derivados de una sola capa embrionaria (una célula madre mesenquimal de la médula ósea, dará origen a células de esa capa como osteocitos o miocitos, entre otras, por ejemplo). Entre este tipo de células se encuentran las neuronales, mesenquimales y hematopoyéticas.
- Las **células madre unipotentes** pueden formar solamente un tipo de célula particular. Un ejemplo de éstas son las células madre epidérmicas ubicadas en la capa basal de nuestra piel.

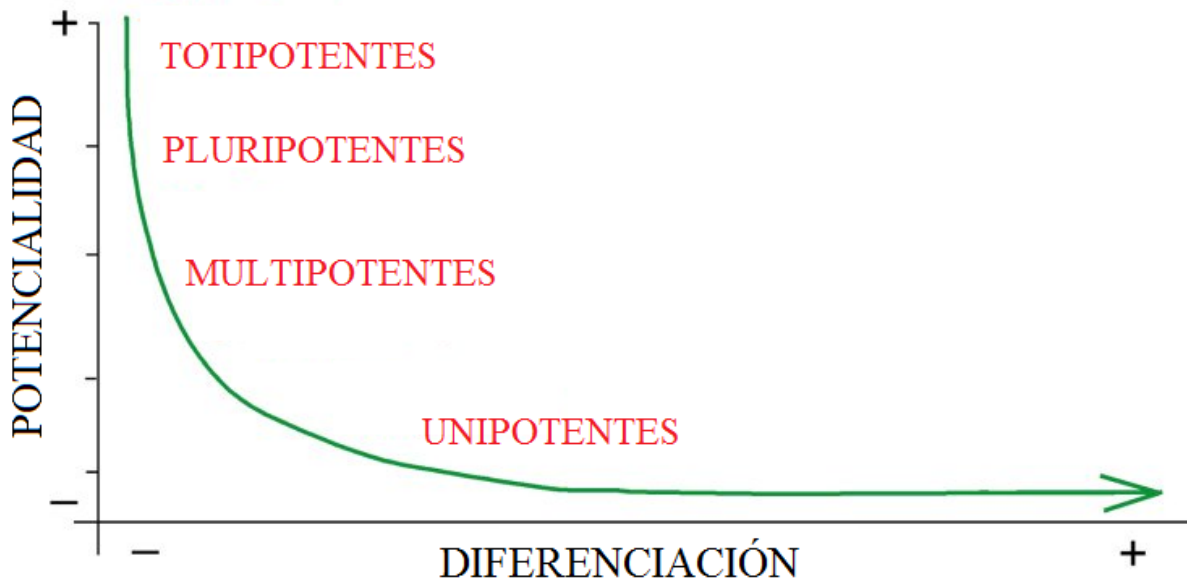


Figura 1.4: Esquema representativo de la potencialidad de células madre.

También pueden clasificarse según su localización en el organismo (figura 1.5):

- **Células madre embrionarias:** Se encuentran en la masa celular interna del blastocisto. El blastocisto está formado por una capa externa denominada trofoblasto, formada en humanos por unas 70 células, y una masa celular interna constituida por unas 30 células que son las células madres embrionarias que tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares que aparecen en el organismo adulto, dando lugar a los tejidos y órganos ^(30, 31).
- **Células madres fetales:** Estas células madres aparecen en tejidos y órganos fetales y poseen características similares a sus homólogas en tejidos adultos, aunque parecen mostrar mayor capacidad de expansión y diferenciación⁽³²⁾.
- **Células madre de placenta y cordón umbilical:** Se pueden encontrar en tejidos intermedios entre el neonato y la madre, como la placenta o el cordón umbilical. En este último se pueden extraer células madre tanto de la gelatina de Wharton, como de la sangre. A este tipo de células se le ha denominado a veces células madre de neonatos ⁽³³⁾.
- **Células madre adultas:** Son células no diferenciadas que se encuentran en tejidos y órganos adultos y que poseen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a células adultas de la capa germinal de la que procedan. Por lo tanto, se consideran células

multipotenciales. En un individuo adulto se conocen hasta ahora alrededor de 20 tipos distintos de células madre, que son las encargadas de regenerar tejidos en continuo desgaste. Su capacidad es más limitada para generar células especializadas ⁽³⁴⁾.

La reciente publicación de múltiples estudios ha hecho cambiar esta visión de las células madre órgano-específicas, haciendo evidente que células madre de adultos procedentes de cualquier tejido pueden diferenciarse a células y tejidos de otras localizaciones y estirpes distintas ⁽³⁵⁾. Cabe mencionar también un tipo especial de células madre: las células madre pluripotentes inducidas, o IPS por sus siglas en inglés. Son células con características pluripotenciales derivadas artificialmente de una célula que inicialmente no era pluripotencial. Las IPS humanas tienen aplicaciones en modelos para el estudio de enfermedades, posibles usos terapéuticos disminuyendo el rechazo en los trasplantes y en investigaciones básicas ^(36, 37). Tanto las células madre adultas como las IPS nos permiten descartar las connotaciones éticas que conlleva investigar en células madre embrionarias.

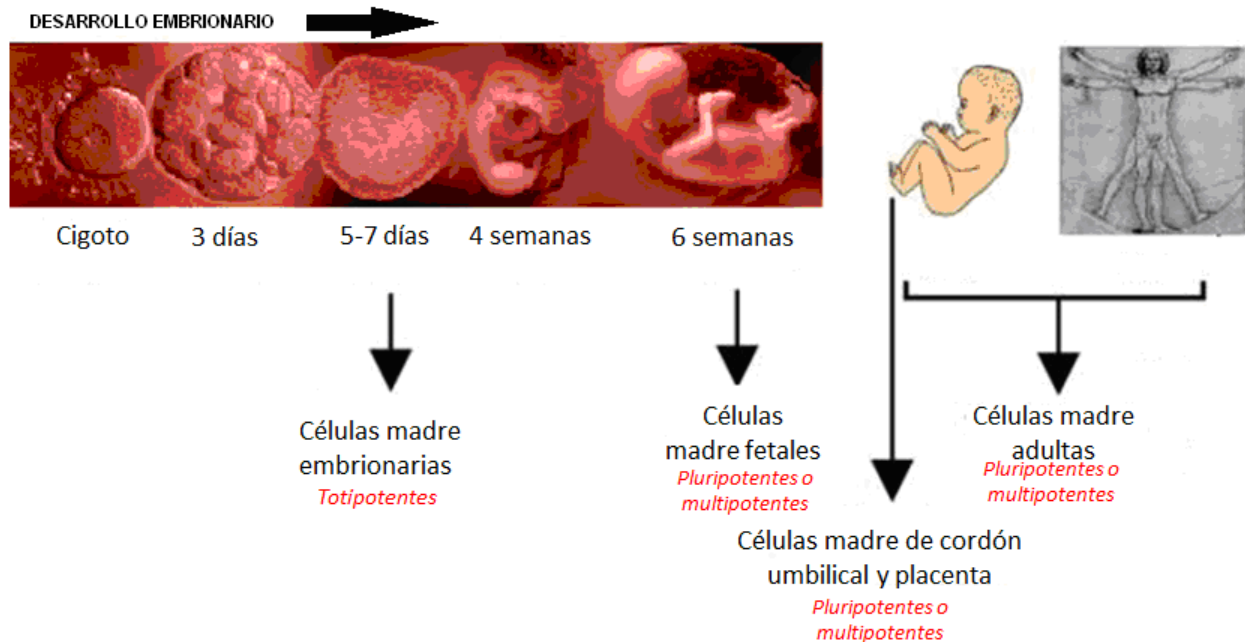


Figura 1.5: Esquema representativo de la procedencia de las células madre

1.2.1 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMM) son células clonogénicas indiferenciadas capaces de auto-regenerarse y diferenciarse en cualquiera de las líneas del tejido mesenquimal (figura 1.6). Es uno de los tipos de células madre adultas que recientemente han centrado la atención para su uso en ingeniería de tejidos y terapia regenerativa ya que se pueden diferenciar hacia tejidos endodérmicos ⁽³⁸⁾ y tejidos ectodérmicos ⁽³⁹⁾, presentando una gran plasticidad además de ser fáciles de aislar, cultivar y manipular en cultivos *ex vivo* ⁽⁴⁰⁾.

En la última década numerosos estudios han demostrado que las CMM pueden ser aisladas de multitud de tejidos como médula ósea, sangre periférica de cordón umbilical ⁽⁴¹⁾, músculo esquelético ⁽⁴²⁾,

membrana amniótica ⁽⁴³⁾, membrana sinovial ⁽⁴⁴⁾, estroma de cordón umbilical ⁽⁴⁵⁾, placenta ⁽⁴⁶⁾, páncreas o tejido adiposo.

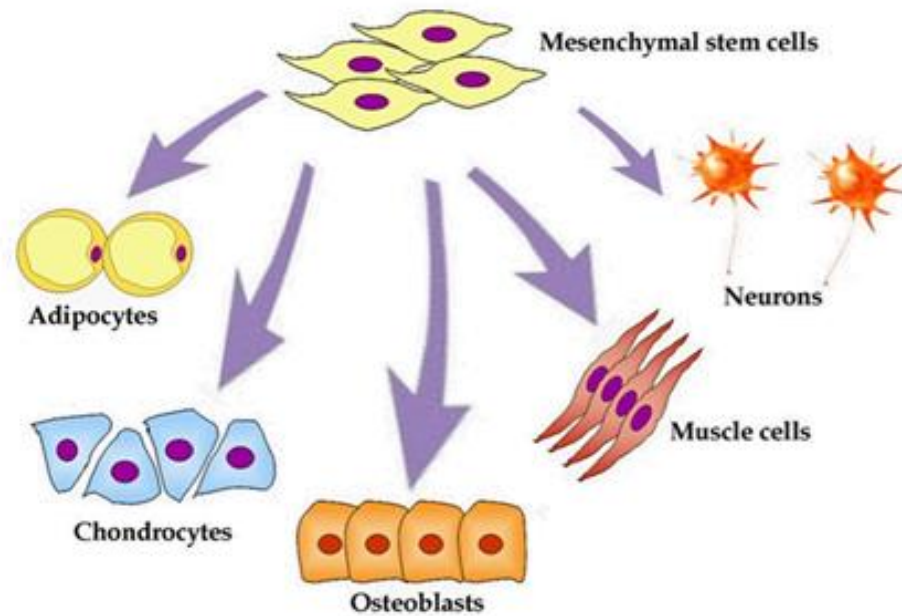


Figura 1.6: Esquema representativo de la potencialidad de las CMMS.

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) sugirió los siguientes criterios para la identificación de CMM:

- Adherencia al plástico.
- Diferenciación en condrocitos, osteoblastos y adipocitos bajo condiciones estándar de diferenciación *in vitro*.
- La expresión de marcadores de superficie CD105, CD73, CD29 y CD90, en ausencia de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 \ alpha.

1.2.1.1 Efectos paracrinos e inmunoreguladores

Varios estudios basados en el examen del secretoma *in vivo* y en estrategias para modular la secreción de CMMs han identificado altos niveles de proteínas implicadas en la respuesta inmune tales como interleuquina 6 (IL-6), IL-8, la proteína quimioattractante de monocitos (MCP), y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β); Remodeladores de la matriz extracelular como fibronectina, periostina, colágeno, decorina, inhibidores de metaloproteasas; Factores de crecimiento y sus reguladores tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), el factor de crecimiento de fibroblastos base (bFGF) y factores de crecimiento semejantes a insulina como IGFBP3, IGFBP4, IGFBP7⁽⁴⁷⁾.

Se consideran células inmunitariamente privilegiadas basándose en que las CMM alogénicas evitan el reconocimiento inmune. Además, las CMM pueden modular la respuesta inmune y han demostrado ser eficaces para el tratamiento de diversos trastornos tanto en modelos humanos y animales⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. Sin embargo, el mecanismo subyacente de esa modulación no se entiende completamente. La teoría más acreditada señala que ejercen su función inmunosupresora segregando factores solubles, tales como la indolamina 2,3-dioxigenasa, el óxido nítrico y la prostaglandina E2, y a través del contacto directo célula-célula. Se sabe que interactúan con una amplia gama de células inmunes y los estudios *in vitro* muestran que tienen la capacidad de suprimir la función de las células T, las células B, las células “natural killer”, inhiben la maduración de las células dendríticas y regulan la activación de los macrófagos^(51,52).

Ren *et al.* Demostró que una mayor expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular

vascular 1 (VCAM-1) se correlaciona con la capacidad inmunosupresora de CMM, mientras que el bloqueo o supresión de estas moléculas de adhesión inhibe la inmunosupresión⁽⁴⁷⁾.

En los últimos años, se propuso que las CMM interactúan con su entorno, tanto para la regulación negativa de la respuesta inmune en el caso de una inflamación mayor, como para su estimulación mediante la liberación de moléculas pro-inflamatorias, si el nivel de citoquinas inflamatorias es bajo⁽⁵²⁾.

1.2.1.2 *Condrogénesis in vitro*

Durante varios años, los investigadores han utilizado diferentes factores de crecimiento y cultivos tridimensionales para inducir la condrogénesis de CMMs *in vitro*.

Hoy en día, varias combinaciones de factores de crecimiento y hormonas son utilizadas. Los más comúnmente utilizados son TGF- β , BMP y dexametasona⁽⁵³⁻⁵⁵⁾, pero en algunos protocolos, el FGF2, IGF-I y / o PTHrP también se utilizan^(56, 57). TGF- β y BMPs pertenecen a la superfamilia TGF- β y tienen una amplia gama de actividades biológicas, incluida la proliferación, la diferenciación y la apoptosis⁽⁵⁸⁾. En los mamíferos, existen tres proteínas TGF- β diferentes (TGF- β 1, 2, y 3), y provocan sus funciones biológicas uniéndose a los receptores TGF- β , dando como resultado la fosforilación de las proteínas Smad. Las proteínas Smad fosforiladas luego se trasladan al núcleo donde regulan la expresión génica. Las BMPs son un gran grupo de proteínas (al menos 20) que actúan a través de los mismos receptores que el TGF- β , pero involucran otro conjunto de proteínas Smad^(58, 59).

La condrogenesis es favorecida por la utilización de un sistema tridimensional. Existen diferentes aproximaciones: Cultivo de pelests, micromasas, esferoides y cultivos en matrices tidimensionales.

El cultivo de pellets es un procedimiento sencillo en el que las células se centrifugan y se cultivan como un gránulo en el fondo de un tubo. Esto es análogo a la fase de condensación *in vivo*, donde se establece el contacto célula-célula. El cultivo de pellets se ha utilizado para estudiar muchos aspectos de la condrogénesis, incluyendo la condensación, la hipertrofia y la influencia de la concentración de oxígeno y la presión hidrostática mecánica ⁽⁶⁰⁻⁶⁴⁾.

El cultivo de micromasas es otro método que es muy similar al de cultivo de pellets. En lugar de preparar gránulos por centrifugación, las células se suspenden a una densidad celular muy alta en medio y se permiten autoensamblarse en pequeños agregados ^(65, 66).

En el cultivo de esferoides, las células son forzadas, mediante la adición de factores de transcripción, a crear estructuras tridimensionales por ellas mismas similares a las que se producen cuando se trabaja con células madre embrionarias ⁽⁶⁷⁾.

Los cultivos de pellets a menudo contienen células necróticas en el centro del gránulo, posiblemente como resultado de una difusión inadecuada de nutrientes ⁽⁶⁸⁾. Además, todas las aproximaciones anteriormente nombradas tienen un tamaño muy pequeño (~ 200.000 células / unidad), lo que hace difícil obtener un gran número de células diferenciadas. Por lo tanto, el uso clínico de cultivos de pellets tiene sus limitaciones ⁽⁶⁹⁾. Debido a esto, surgió la necesidad de cultivar las células en estructuras tridimensionales denominadas andamios.

Hay varios tipos de andamios. Los andamios pueden ser ampliamente divididos en tres grupos ^(70, 71). El primer grupo consiste en

polímeros basados en proteínas tales como colágeno, fibrina y gelatina. El segundo grupo corresponde a polímeros a base de carbohidratos, tales como alginato, ácido hialurónico, agarosa y quitosano. Los polímeros artificiales o sintéticos constituyen el tercer grupo e incluyen andamios hechos de materiales tales como fibras de carbono, dacron, poliéster-uretano e hidroxiapatita. También es posible fabricar andamios que consisten en varios tipos de materiales o incorporar moléculas para fines de unión y / o señalización celular. En general, los andamios deben apoyar la viabilidad celular y la proliferación, ser biocompatibles, biodegradables, proporcionar suficiente soporte estructural y mecánico, proporcionar una distribución uniforme de las células y contener poros suficientemente grandes para permitir la difusión de nutrientes y la eliminación de los productos de desecho. Para fines de ingeniería de tejidos, el material de andamio también debe permitir la integración del tejido recién sintetizado con el tejido adyacente ⁽⁷⁰⁾. Se ha utilizado un gran número de andamios para apoyar la condrogénesis. Sin embargo, hoy en día no existen andamios (u otros métodos) que promuevan la formación de cartílago articular perfecto *in vitro* o *in vivo*, lo que refleja la naturaleza compleja de este tejido ⁽⁷²⁾. El objetivo de combinar células y andamios es proporcionar un entorno que imite el efecto del entorno nativo que rodea las células *in vivo*.

1.3 LESIONES EN EL CARTÍLAGO Y TRATAMIENTO

1.3.1 Lesiones

Debido a la naturaleza altamente especializada del cartílago articular, la integridad de la MEC es crucial para la salud y la función del tejido. Una vez lesionado, el cartílago articular tiene una capacidad de cicatrización deficiente debido a la falta de vascularización y el hecho de que es casi imposible para las células migrar a las zonas lesionadas debido a la alta densidad de la MEC. Esta característica hace que los daños y las enfermedades del cartílago articular sean una de las principales causas de discapacidad crónica en los países desarrollados ⁽⁷³⁾. La mayoría de las lesiones del cartílago articular son el resultado de un traumatismo mecánico directo en el cartílago o una degeneración progresiva como se observa en la osteoartritis (OA) ⁽⁴⁴⁾.

Se ha documentado que el 60-65% de los pacientes sometidos a artroscopia de rodilla tienen lesiones de cartílago ⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾ y que la actividad deportiva es el evento más comúnmente asociado ⁽⁷⁷⁾. Las lesiones del cartílago focal no sólo dan lugar dolor, sino que estas lesiones se agrandan con el tiempo y en muchos casos contribuyen al desarrollo de la OA (74). La OA es una enfermedad multifactorial de toda la articulación que conduce a la degradación del cartílago articular (figura 1.7). Las causas exactas de la OA no se conocen, pero existen muchos factores, como la edad, el traumatismo cerrado, la obesidad, la inflamación, la diabetes, la genética y las patologías de las articulaciones, asociados con el desarrollo de OA (74). Cuando el cartílago articular en la articulación se degrada, el hueso subcondral estará expuesto y las superficies óseas rozarán entre sí. Esto se traduce en inflamación, dolor, hinchazón y rigidez de la articulación. Además de perjudicar la calidad de vida de

millones de personas, la OA es también una carga económica para el Sistema Nacional de Salud ⁽⁷⁹⁾.

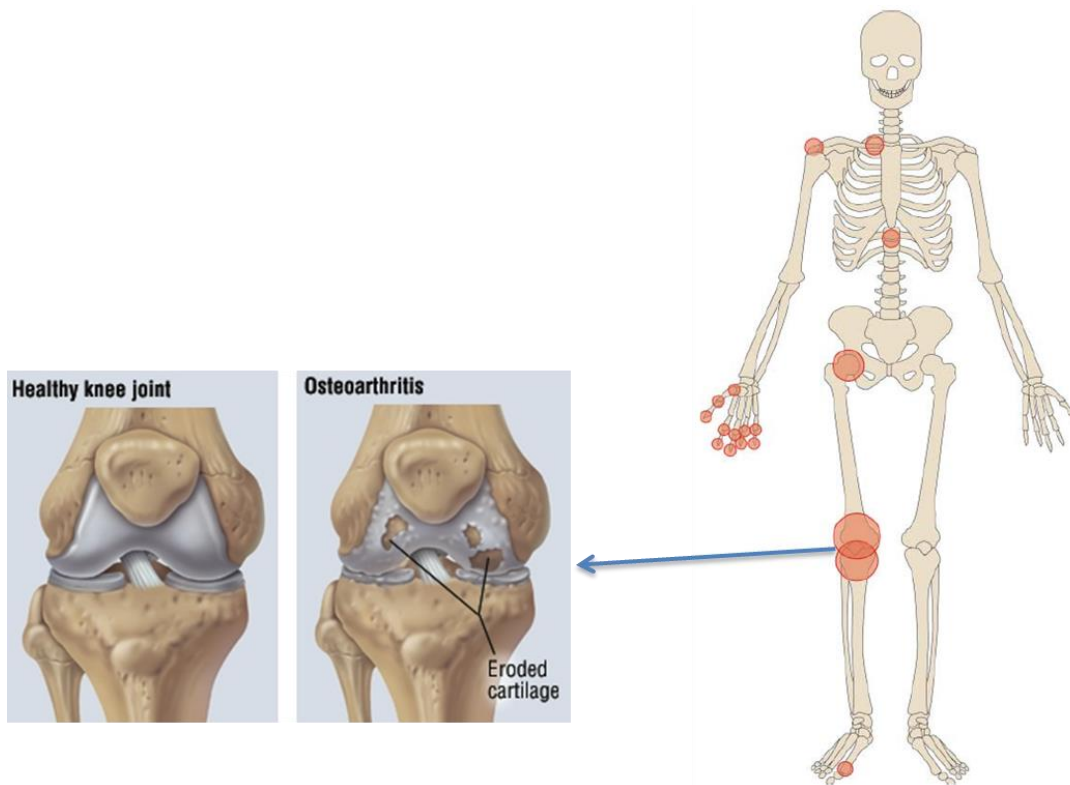


Figura 1.7: Representación esquemática de la OA

La Inflamación es directamente responsable de varios síntomas clínicos de la OA y refleja la progresión de la enfermedad. En la OA, los condrocitos producen una gran variedad de mediadores de la inflamación: proteasas (colagenasas, estromelisin, agrecanasas), citocinas pro-inflamatorias (IL-1a, IL-1b, TNFa, IL-8, IL-17, IL-18, proteína quimiotáctica para monocitos [MCP-1], RANTES), citocinas anti-inflamatorias y antagonistas (IL-4, IL-10 e IL-13), adipocinas (leptina, resistina, adiponectina, etc.), factores de crecimiento (factor de crecimiento semejante a insulina [IGF], factor de crecimiento

transformador beta [TGF β]), radicales libres (NO) y mediadores lipídicos (PGE $_2$, leucotrieno B $_4$ [LTB $_4$]) (1,2,3).

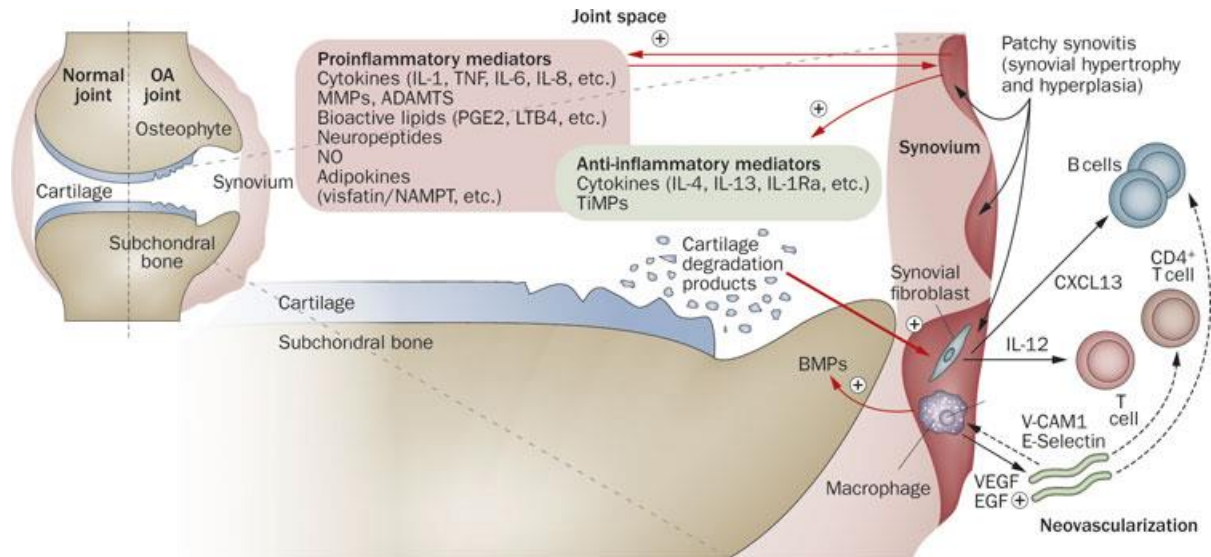


Figura 1.8: esquema del proceso inflamatorio en la OA; Sellam & Berenbaum, 2010 (4)

Los productos de descomposición del cartílago que se liberan en el líquido sinovial son fagocitados por las células sinoviales, amplificando la inflamación. A su vez, las células sinoviales activadas producen los mediadores catabólicos y pro-inflamatorios que conducen a un exceso de producción de enzimas proteolíticas (MMPs, ADAMs, etc) responsables de la descomposición del cartílago, creando un circuito de retroalimentación positiva. La respuesta inflamatoria es amplificada por células T, células B y macrófagos. Para contrarrestar esta respuesta inflamatoria, se pueden producir citoquinas antiinflamatorias. Además de estos efectos sobre la inflamación del cartílago y su ruptura, la membrana sinovial contribuye a la formación de osteofitos a través de BMPs (figura 1.8) (4).

1.3.2 Tratamiento

El objetivo final en la reparación del cartílago es producir un tejido que tenga propiedades idénticas al cartílago nativo y que se integre con el tejido circundante de la lesión. Se han desarrollado muchas técnicas quirúrgicas, pero hasta el momento ninguna de las técnicas cumple con estos requisitos ^(71,74). El tejido de reparación consta a menudo de fibrocartílago, hueso, tejido hialino o una mezcla de estos tejidos ^(80,81). Aunque tales tratamientos no dan como resultado un tejido de reparación perfecto, muchos pacientes experimentan mejor funcionalidad y alivio del dolor. Esta es la razón principal para realizar estos tratamientos hoy en día. El implante autólogo de condrocitos, es el procedimiento celular más utilizado para la reparación del cartílago. Esta tesis se centra en la terapia celular, por lo que se procederá a describir técnicas de implante de condrocitos y de células madre. Para una descripción de otras estrategias terapéuticas, se recomiendan los siguientes documentos de la bibliografía ^(74,75).

1.3.2.1 *Implante autólogo de condrocitos*

En 1994 surgió un nuevo concepto de reparación del cartílago ⁽⁷⁶⁾ (figura 1.9). Se sabía durante décadas que las biopsias de cartílago tratadas enzimáticamente hacían posible cultivar y expandir numéricamente condrocitos *in vitro* ⁽⁷⁷⁾. Se publicaron estudios en animales de trasplante periosteal, seguidos de estudios en humanos ^(78,79,80). Un grupo sueco combinó estas dos técnicas en un procedimiento denominado implante de condrocitos autólogos (ICA). En este procedimiento, una pequeña biopsia de cartílago se toma artroscópicamente de la rodilla, se trata enzimáticamente y se cultiva

durante aproximadamente tres semanas, después de lo cual se implantan al menos un millón de células por centímetro cuadrado en una suspensión de pequeño volumen. Posteriormente, la aleta periosteal es reemplazada por una membrana hecha de colágeno bovino, haciendo el procedimiento más sencillo y aliviando los problemas inicialmente observados con hipertrofia del tejido de reparación, lo que a menudo conduce a una tasa de reartroscopia del 20-25% ^(81,82). Los procedimientos de tercera generación usan una membrana como portador celular cuando se implantan las células (como MACI[®] (Verigen, Alemania) ⁽⁸³⁾).

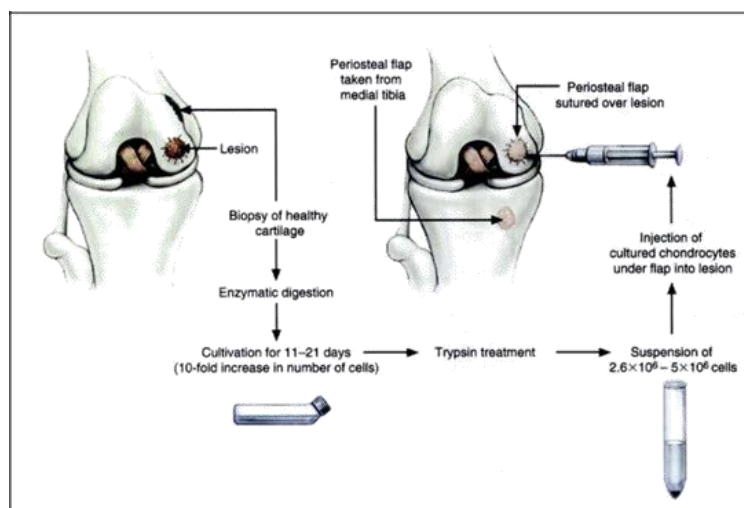


Figura 1.9: Implante autólogo de condrocitos. Brittberg et al. 1994 ⁽⁷⁶⁾

El ICA requiere la expansión *ex vivo* de los CAs propios del paciente. La expansión en monocapa de las células conduce a la desdiferenciación. Esto significa que las células pierden su fenotipo, y la síntesis de las proteínas específicas del cartilago hialino, como el colágeno tipo II y el agrecano, se sustituye por síntesis de colágeno tipo I y versican, respectivamente ^(84,85). El colágeno tipo I y versican son componentes del fibrocartilago. Por lo tanto, el trasplante de AC desdiferenciados da como

resultado un tejido de reparación que consiste en fibrocartílago o una mezcla de fibrocartilago y cartílago hialino ⁽⁷¹⁾. Aunque este tejido de reparación mejora la funcionalidad y alivia los síntomas, no tiene las propiedades mecánicas y osmóticas del cartílago hialino y eventualmente se degradará ⁽⁷⁴⁾. Esta es una limitación importante para el uso de CAs en ACI. La razón de la desdiferenciación no se conoce completamente, pero se piensa que involucra el citoesqueleto de actina y el esparcimiento o aplanamiento de las células cuando se unen a la superficie del cultivo durante la expansión monocapa ^(86, 87). La comprensión del mecanismo detrás de la desdiferenciación puede conducir a nuevas estrategias para la expansión *ex vivo* en la que los CAs no se desdiferencian, mejorando así la calidad del tejido de reparación y el resultado clínico del ICA. Otros factores, como la edad, la estabilidad del ligamento, el daño del menisco y el tamaño del defecto también afectan la calidad del tejido de reparación ⁽⁷⁴⁾. Otra limitación de ICA es la necesidad de dos intervenciones quirúrgicas, una para cosechar la biopsia y otra para trasplantar las células cultivadas. Cosechar la biopsia también conduce a la morbilidad del sitio del donante, pero no parece crear problemas durante ICA en la rodilla. Sin embargo, la mayoría de los estudios con RMN no mencionan la morbilidad del donante y no existen datos publicados sobre la anatomía o la histología del sitio donante ⁽⁸⁸⁾.

1.3.2.2 *Implante de células madre*

El uso de CM es una forma prometedora de eliminar la necesidad de una biopsia de cartílago. Esto ya ha sido probado en varios ensayos en animales con o sin andamios ⁽⁸⁹⁻⁹³⁾. Los resultados son prometedores, pero la superioridad a otros tratamientos en estudios con animales no es consistente. En ensayos en seres humanos, los CMM sólo se han utilizado

en pocas y limitadas series de casos, incrustados en un gel de colágeno de tipo I ⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾. En el mayor de estos estudios (n = 12 en cada grupo), las CMM derivadas de la médula ósea se usaron para tratar las rodillas osteoartríticas después de una osteotomía tibial alta. Las células se implantaron bajo colgajos periosteales y se compararon con los implantes libres de células. No se observó ninguna diferencia clínica, pero el tejido de reparación en el grupo de células obtuvo mayor puntuación artroscópica e histológicamente (tipo cartílago parcialmente hialino). Aunque estos estudios proporcionan evidencia de principio, sólo pueden servir como fundamentos para un estudio más rigurosamente diseñado que esté propulsado adecuadamente para mostrar diferencias clínicamente significativas o no inferioridad. Como se discutirá más adelante, la seguridad del uso de células madre es un problema. Estos estudios en combinación con estudios en animales proporcionan pruebas sustanciales de la seguridad de estos procedimientos, ya que no se ha observado crecimiento tumoral.

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cartílago articular humano se ve afectado por diversas enfermedades reumáticas tales como la osteoartritis (OA) y presenta una capacidad de regeneración muy limitada. Hoy en día en los países occidentales esta clase de enfermedades son un grave problema social y económico, debido al envejecimiento de la población. El trasplante de condrocitos autólogos extraídos de zonas adyacentes a la lesión es la estrategia en terapia celular más utilizada actualmente para intentar regenerar cartílago, sin embargo, el proceso de extracción es altamente invasivo y la expansión en cultivo de este tipo de células conlleva su desdiferenciación, por lo que no se consiguen buenos resultados. Las CMM) han demostrado buena plasticidad, similar a las células madre embrionarias, pero sin las complicaciones éticas que estas traen consigo. Son fáciles de aislar y también de expandir en cultivo para conseguir el número de células adecuado para la terapia, además de que presentan un demostrado efecto antiinflamatorio. Esto las convierte en una atractiva fuente de células para la regeneración de cartílago.

Los objetivos de esta tesis pueden resumirse de la siguiente forma:

- Examinar el efecto de la sobre-expresión de LMNA, o su forma mutante progerina (PG), sobre el potencial de diferenciación de células madre mesenquimales (CMM) de cordón umbilical humano (UC).
- Determinar si las hormonas prolactina (PRL) y la *3,3'-5-triyodo-L-tironina (T3)*, la hormona tiroidea activa, modula la condrogénesis en nuestro modelo *in vitro* de diferenciación condrogénica dirigida y si la ruta de señalización Wnt está implicado en dicha modulación
- Generar condrocitos articulares humanos (CAs) y células madre mesenquimales (CMM) resistentes al efecto de la IL-1 β silenciando su principal receptor (IL1R1), con el fin de determinar su efecto sobre la respuesta inflamatoria y su potencial condrogénico después de su estimulación con IL-1 β recombinante (rIL-1 β).
- Estudiar el efecto de una terapia celular con CMMS en un modelo animal OA.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE CMMs Y CONDROCITOS

En estos estudios se han utilizado 4 tipos diferentes de células: CMMs de cordón umbilical, CMMs de membrana sinovial, condrocitos articulares, y una línea celular inmortalizada de CMMs procedentes de médula ósea humana ⁽⁹⁷⁾. A continuación, se describe la obtención y el aislamiento de las dos primeras, ya que de las últimas no es necesario.

3.1.1 CMMs de cordón umbilical

Los cordones umbilicales fueron obtenidos de cesáreas de mujeres sanas con un rango de edad entre 26 y 35 años procedentes del servicio de ginecología del hospital Materno-Infantil del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC). Todos los tejidos fueron obtenidos con consentimiento informado del paciente, siendo este estudio aprobado por el CEIC. Las CMMs fueron aisladas del estroma de los cordones umbilicales usando un protocolo modificado de Messina ⁽⁹⁸⁾. Primero, el tejido fue lavado con un tampón isotónico (PBS) para eliminar todos los restos de las células sanguíneas del tejido y posteriormente fue seccionado transversal y longitudinalmente, obteniéndose explantes de medio centímetro.

Los explantes fueron sometidos a una ligera digestión enzimática usando un cóctel de proteasas, colagenasa I y dispasa (1.2 Units/ml dispasa y 112 Units/ml de colagenasa tipo I) durante cinco minutos, tres veces consecutivas. Posteriormente cada uno de los explantes fue

colocado en placas de cultivo adherentes de forma que la cara estromal de cada explante quedara en contacto con la superficie de la placa y de esta forma las células pudieron ir difundiendo de cada uno de los explantes y adhiriéndose a la placa de cultivo ⁽⁹⁹⁾.

3.1.2 CMMs de membrana sinovial

En este estudio se usaron membranas sinoviales normales de pacientes sometidos a una amputación de rodilla, sin historia de desorden articular de rodilla y obtenidos bajo consentimiento informado por parte del paciente y con el informe favorable del comité ético de investigaciones clínicas (CEIC) de Galicia.

La membrana sinovial fue aislada y sometida a una digestión secuencial con 1.2U/ml de dispasa y 112U/ml de colagenasa tipo I para el aislamiento de las CMMs de membrana sinovial tal y como previamente ha descrito Kawaguchi *et al.* ⁽¹⁰⁰⁾.

3.1.3 Condrocitos Articulares

Para la obtención de condrocitos se utilizaron muestras de cartílago articular (rodilla y cadera) provenientes de pacientes OA después de la cirugía de reemplazo de la articulación por una sintética, donadas en el Hospital universitario de Oslo (Oslo University Hospital, Rikshospitalet) y cumpliendo con todos los permisos pertinentes.

Los explantes de cartílago se procesaron inmediatamente después de la cirugía. Se realizaron cortes en paralelo a la superficie de la articulación con bisturí separando el cartílago del hueso subcondral. Posteriormente fueron lavados con solución salina, cortadas en trozos pequeños. El troceado se incubó en una solución de Tripsina- EDTA

(0.5mg/ml) en agitación durante 15 min a 37° C y en agitación, para más tarde decantarlo i digerirlo enzimáticamente con colagenasa IV (2mg/ml,) en DMEM suplementado con 5% de FBS (suero bobino fetal, Gibco, Invitrogen) toda la noche (16-18 horas) a 37° C y de nuevo en agitación para librerar los condrocitos de la MEC. Se filtró a través de un filtro con tamaño de poro de 100 µm para separar los restos de cartílago que no han sido digeridos. El líquido se filtró a 1200 rpm 5 minutos a temperatura ambiente. Después de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en DMEM para ser contadas mediante un contador de células automátco, siguiendo las especificaciones del fabricante (Countess™ Automated Cell Counter), y sembradas en frascos o placas de cultivo adherentes.

3.2 CULTIVO DE CMMs Y CAs

Las CMMs de estroma de cordón umbilical, las de membrana sinovial y los CAs fueron cultivados en monocapa en Dulbeccos modified eagles medium (DMEM), 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina y 1% estreptomycin y fueron subcultivados hasta alcanzar el 90% de confluencia. En el caso de las células 3A6 se utilizó Dulbeccos modified eagles medium (DMEM) bajo en glucosa negativo para L-glutamina, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 10% de glutamax, 1% de penicilina y 1% estreptomycin.

3.3 CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4). Tras la fijación, las células fueron lavadas dos veces con PBS, permeabilizadas con PBS con 0,1% Triton X-100 durante 10 minutos, bloqueadas con 3% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS, y posteriormente incubados con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C.

Para la detección de anticuerpos primarios no marcados, las células fueron lavadas con PBS, a continuación, se incuban con un anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón IgD / FITC Conejo F (ABO) 2 (1:1.000 de DakoCytomation) durante 30 min. a temperatura ambiente, marcados con los fluoróforos FICT, PE, PE-Cy⁵ (1:1.000 de DakoCytomation). Las células fueron lavadas dos veces con PBS y 1x 10⁶ células fueron analizados mediante un citómetro separador FACS Aria de BD (BD Bioscience, Madrid, SP). Los datos de citometría de flujo se generaron en el software DIVA (BD Bioscience).

Los anticuerpos primarios utilizados para caracterizar las CMMs fueron: ratón anti-CD34 humano (1:20 DakoCytomation, Barcelona, SP), ratón anti-CD45 FITC humano (1:20), FITC ratón anti-CD105 humano (1:100 de Serotec, Baviera, Alemania), ratón anti-CD44 FITC humanos (1:100 de Serotec), PE-Cy5-ratón anti-CD90 humano conjugado (1:20 de la BD Pharmagen, Madrid, SP), ratón anti-CD73 PE (1:20), ratón anti-CD106 FICT (1:10), ratón anti-CD166 PE (1:20), ratón anti-CD117 (1:20), ratón anti-CD271 (1:1000) ratón anti-CD29, ratón anti-CD69 (1:20), ratón anti-Stro-1 (hibridoma 1:2.5), ratón anti Oct3/4 (1:100), ratón anti SSEA4 (1:100), ratón anti-CD271 (1:1000).

3.4 SEPARACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE CMMs CD105⁺

Cuando las CMM alcanzaron el 90% de confluencia las células se levantaron de la placa con tripsina. Se incubaron durante 1 hora a 4°C con anti CD105 humano (Serotec, BioNova), usando 10ul de anticuerpo por millón de células y posteriormente se procedió a su separación a través de un FACS Aria de BD (BD, Pharmingen). La subpoblación celular separada fue cultivada en DMEM, 15% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina y 1% estreptomina hasta alcanzar un 90% de confluencia.

Posteriormente estas células fueron subcultivadas hasta que se obtuvieron el número de células suficientes para realizar los experimentos.

3.5 MARCAJE DE CMMs CD105⁺

Se han utilizado sondas de carbocianina para marcar la subpoblación CD-105⁺. Los colorantes de carbocianina se utilizan ampliamente como marcadores no tóxicos para las membranas en células vivas. Las indocarbocianinas de octadecilo (DiI) presentan una emisión de fluorescencia de 670 nm y se utilizó este marcaje para la subpoblación CD105⁺ inyectada por vía intravenosa. La oxacarbocianina, cuyo acrónimo es DiO y su emisión de fluorescencia es de 510 nm, se utilizó para marcar la subpoblación CD-105⁺ inyectada directamente en la rodilla. En resumen, se diluyó 1 mg / ml en solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Las células se incubaron a 1 μM de esta solución durante 5 minutos a 37 °C y durante 15 minutos a 4°C. Al final se lavó las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se diluyeron en suero salino para su inyección.

3.6 MODIFICACIÓN GENÉTICA

3.6.1 Transducción lentiviral de PG, LMNA y GFP

3.6.1.1 *Clonaje e inserción en el plásmido vector.*

La longitud completa de cada proteína se amplificó en una PCR de alta fidelidad con el kit Kapa HIFI Hotstrat (KAPA Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante desde los plásmidos pBABE-puro-GFP-progerin y pBABE-puro-GFP-laminA (ADDGENE, donados por Tom Misteli). Los oligonucleótidos utilizados fueron:

EcoRI-LMNA-forward: CCGGAATTCATGGAGACCCCGTCCCAGCGG

BamHI-LMNA-reverse: CGCGGATCCTTACATGATGCTGCAGTTCTG

EcoRI-GFP-forward: CCGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAG

BamHI-GFP-reverse: CGCGGATCCTTACTTGTACACCTCGTC.

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Las bandas correspondientes a las secuencias de GFP, PG y LMNA se rescataron de la agarosa con el kit de extracción Nucleospin[®] Extract II (Clontech laboratories Inc.) según las indicaciones del fabricante. El resultado se cuantificó con un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, USA). Luego, dicho fragmento se introdujo en el plásmido vector pLVX-puro del kit lentiviral Lenti-X (Clontech laboratories Inc.), el cual contiene un gen de resistencia a puomicina que usaremos para la selección. Mediante doble digestión con los enzimas EcoRI y BamHI se “abrió” el vector, posteriormente se extrajo el fragmento sobrante por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%

rescatando la banda de interés de nuevo mediante Nucleospin® Extract II, y finalmente se llevó a cabo la ligación manteniendo una proporción vector:inserto de 1:1. Los plásmidos vectores resultantes fueron, por lo tanto: LVX-GFP-puro, LVX-LMNA-puro, y LVX-PG-puro.

3.6.1.2 Producción lentiviral y transducción de las CMMs.

Como método para la producción viral optó por una transfección mediada por fosfato cálcico ⁽⁴³⁾. Los plásmidos utilizados fueron los correspondientes al kit Lenti-X Lentiviral Expression System (Clontech), un sistema de tres plásmidos: de empaquetamiento, de envoltura y plásmido vector (figura 3.1).

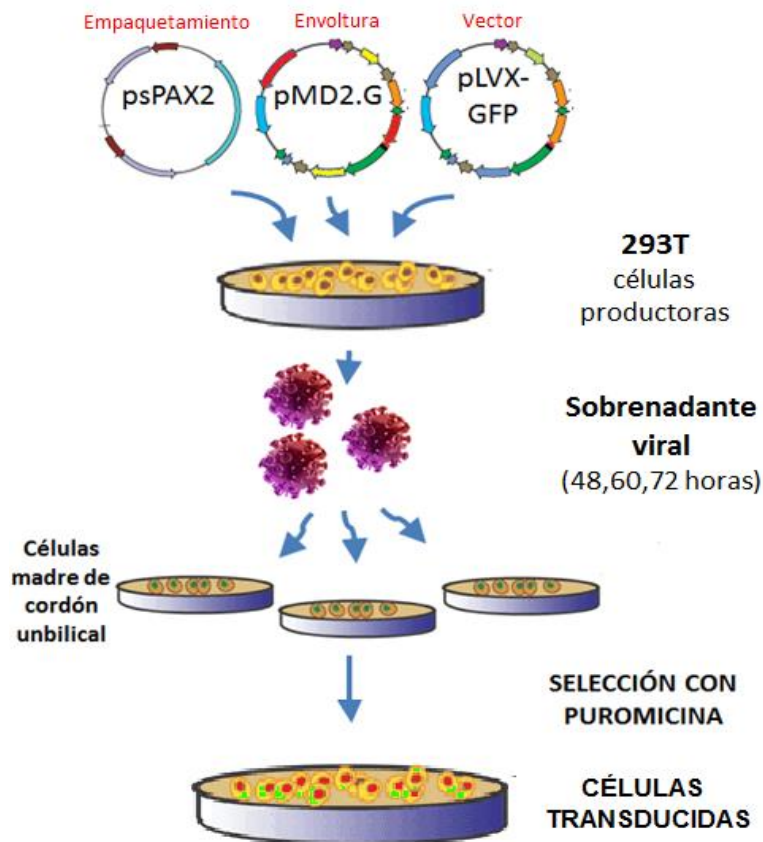


Figura 3.1: Esquema de la transducción mediada por fosfato cálcico.

Se sembraron células productoras 293T en placas de 150mm con medio DMEM con un 5% de FBS sin antibióticos (medio de transfección). Cuando las células productoras estuvieron a un 80-90% de confluencia fueron sometidas a la transfección. Se incubaron toda la noche y al día siguiente se les cambió el medio por medio de transfección limpio. Paralelamente se sembraron las células diana de cordón umbilical en tres placas de 100 milímetros. Las células diana deben permanecer al menos 8 horas en medio de transfección y estar alrededor del 70% al inicio del proceso de transducción.

La transducción de las células diana se hizo en 3 tandas en intervalos de 12 horas, a las 48, 60 y 72 horas después de la transfección. De cada vez se les retiró el medio viral a las células productoras y se filtró mediante filtros Millex-HP Filter, 0.45 μm PES (MILLIPORE) para eliminar los restos celulares. A las células diana se les retiró el medio anterior y fue sustituido por el sobrenadante viral recién recogido. 12 horas después de la última infección, a las células diana se les cambió el medio por medio DMEM 10% FBS, 1% penicilina, 1% estreptomina, lavando antes cuidadosamente con este mismo medio para eliminar cualquier resto de sobrenadante viral. Las líneas celulares resultantes fueron denominadas GFP-CMMs, PG-CMMs y LMNA-CMMs.

3.6.2 Sistema CRISPR-cas9

3.6.2.1 *Diseño y construcción de los plásmidos CRISPR-Cas*

Se utilizó el sistema CRISPR-Cas se utilizó en combinación con un vector diseñado para silenciar a los receptores de IL1R1 e insertar el gen de resistencia a puromicina en el sitio de corte por recombinación homóloga. También se dispusieron plásmidos vacíos para utilizarlos en

la trasfección de las células control. Los datos específicos no se mostrarán por deseo de algunos de los autores hasta que los resultados estén publicados.

3.6.2.2 *Nucleofección*

La transducción de las células se realizó mediante nucleofección, un método físico que combina los parámetros eléctricos de la electroporación con una solución determinada por el tipo celular, siguiendo un protocolo específico para Jurkat (Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V; Lonza). De esta forma, los plásmidos se transfieren directamente al núcleo celular. La eficiencia de esta técnica es alta y la toxicidad relativamente baja. Se emplearon 1×10^6 células, las cuales fueron resuspendidas en 100 μ l de la solución de nucleofección correspondiente. Dicha solución contiene 0.5 μ g de cada uno de los plásmidos necesarios, es decir, del vector donante (MCS-CSK-ATG-STOP) y de los dos vectores CRISPR. Una vez realizada la nucleofección, las células se cultivaron en placas de seis pocillos durante tres horas en medio sin antibiótico (DMEM + 10 % FBS + Glutamax 1X + Piruvato 1X). Transcurrido ese tiempo, se les añadió medio completo (con antibiótico) para evitar contaminaciones (DMEM + 10 % FBS + Glutamax 1X + Piruvato 1X + Estreptomicina/Penicilina 1X). Se utilizó el mismo procedimiento para CAs y CMMs 3A6.

3.6.3 Selección de las células transducidas.

Todas las células fueron seleccionadas con puromicina entre dos y 4 días después de la transducción, tiempo necesario para que las células desarrollen la resistencia. Las concentraciones de antibiótico fueron de 1 $\mu\text{m}/\text{ml}$ para las CMMs de cordón umbilical y los condrocitos articulares, y de 2 $\mu\text{m}/\text{ml}$ en el caso de la línea celular 3A6.

3.7 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Se sembraron placas con diferente número de células (0, 1000, 2000, 4000, 8000 y 16000) por triplicado en placas de 96 pocillos (Corning Inc., Nueva York, Estados Unidos) y se dejaron adherir durante 8 h para calcular la proliferación curva. El número de células se calculó usando CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radiactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 4000 células para cada línea celular por triplicado en placas de 96 pocillos (Corning Inc., Nueva York, Estados Unidos) y se calculó el número total de células en diferentes puntos (0, 1, 2, 5 y 6 días).

3.8 CONDRÓGENESIS *IN VITRO*

3.8.1 Esferoides

Para la condrogénesis de CMMs de cordón umbilical (CMM-CUs) se utilizó un modelo tridimensional similar al usado por Arufe *et al.* ⁽⁹⁹⁾ donde las células son forzadas a formar estructuras tridimensionales similares a las que se producen cuando se trabaja con células

embrionarias frente al modelo usado hasta ahora por los autores que estudian condrogénesis, el cuál está basado en la formación de micromasas o precipitados celulares obtenidos tras la centrifugación de las células como se observa en la figura 3.2.

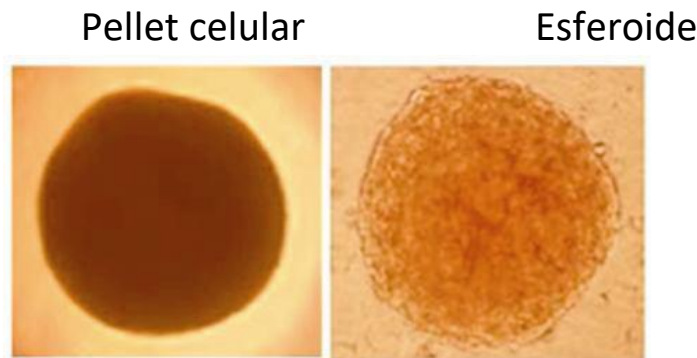


Figura 3.2: Comparación al microscopio óptico de campo claro de un pellet frente a un esferoide.

En este modelo de condrogénesis basado en la formación de esferoides, cuando las células han alcanzado el 90% de confluencia son levantadas con tripsina y sembradas en placas de 96 pocillos (Sarsted Inc., Barcelona, SP) a 2×10^4 células por pocillo, con un medio que contiene DMEM, 15% de suero fetal de ternero (FCS), 1% de penicilina y 1% estreptimicina, 1.5×10^{-4} M de monotioglicerol (MTG), 5mg/ml de ácido ascórbico (AA) y 6 μ g/ml de transferrina (TRANS) (todo de Sigma-Aldrich) durante dos días para inducir la formación espontánea de esferoides.

Transcurridos estos dos primeros días el medio fue reemplazado por un medio condrogénico que induce la diferenciación celular hacia células similares a condrocitos.

Este medio condrogénico contiene DMEM suplementado con un 15% de suero knockout de GIBCO (Invitrogen, Barcelona, SP), 0.5 mM de

ácido ascórbico (AA), 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina (TRANS) , 10 μM de Dexametasona (DEX), 1.5×10^{-4} M de MTG, 1×10^{-7} mM de ácido retinoico (RA) y 1ng/ml de TGF β 3 recombinante humano (rhTGF β 3) de proSpec-Tany Technogene (Deltaclon, Madrid,SP), reemplazándolo cada 3 días.

3.8.2 En discos de alginato.

Tanto los CAs como las CMM inmortalizadas 3A6 se diferenciaron en discos de alginato. Las células se inmovilizaron en hidrogeles de alginato con forma de discos (altura 2 mm, diámetro 5 mm) utilizando una tecnología de alginato autogelificante (NovaMatrix, Sandvika, Noruega). Se dispersaron partículas insolubles (25-45 μm) de alginato de Ca (alginato oligomérico (bloques G) cruzados con calcio) en manitol al 4,6% (p / v) hasta una concentración de 1,6% (p / v). Se disolvió alginato de Na de alta pureza y baja viscosidad (PRONOVA UP LVG, NovaMatrix) en manitol al 4,6% (p/v) hasta una concentración de 1,6% (p/v) y se filtró en esterilidad a través de una jeringa de 0,2 mm. Las CMMs y los CAs se levantaron con tripsina / EDTA, se centrifugaron y se lavaron con manitol al 4,6% para eliminar todos los rastros de calcio e iones no gelificantes. A continuación, el sedimento celular final se dispersó suavemente en la solución de Na-alginato y se mezcló en volúmenes iguales con la suspensión de Ca-alginato usando una pipeta. Esta mezcla se distribuyó en moldes hechos a la medida para fabricar hidrogeles de 45 μl con una densidad celular final entre $10-50 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Los hidrogeles se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, antes de ser lavados suavemente con CaCl_2 50 mM en NaCl al 0,56% durante 5 minutos.

Los hidrogeles se transfirieron a placas de 24 pocillos (Costar, Corning, NY), donde cada pocillo contenía 1 ml de medio de diferenciación condrogénica constituido por piruvato de sodio a 1mM,

ácido ascórbico 2-fosfato a 0.1nM, ITS al 1% y albúmina de suero humano 1.25mg/mL en medio de alta glucosa DMEM-F12 (4,5 g / L). Además, se suplementó con BMP2 a 500ng/mL y TGFβ1 a10ng/mL. Se mantuvieron el cultivo durante 10 días cambiando el medio cada dos días.

3.8.3 Condrogénesis con T3 y PRL

Las CMMs se sembraron en placas de 96 pocillos (Sarsted Inc., Barcelona, SP) a 2×10^4 células por pocillo en medio de crecimiento [DMEM, FBS al 10%, penicilina al 1%, estreptomicina al 1%, monotioglicerol (MTG), 5 mg / ml de ácido ascórbico (AA), 6 μg / ml de transferrina (TRANS) (todos procedentes de Sigma-Aldrich)] para conseguir una formación espontánea de esferoides, y luego se cambió a un medio condrogénico para diferenciar directamente a los condrocitos. El medio condrogénico (MC) consistió en DMEM, 15% de suero knockout y 5 mg / ml de AA, 6 μg / ml de TRANS, 10 μM de dexametasona (DEX), 1×10^{-7} M de ácido retinoico y 10 ng / ml de factor de crecimiento transformante humano beta-3 (TGF-β3) recombinante o TGF-β3 10 ng / ml más 1, 10 ó 100 ng / ml de T3 (ambos de Sigma-Aldrich) O 10 ng / ml de TGF-β3 más 10, 100 o 1.000 ng / ml de PRL (de Sigma-Aldrich). Además, varias cantidades (2.5, 10 ó 20 μM) de ML151, un inhibidor del receptor de T3 fueron testadas (solo o con 100 ng / ml de T3). Por último, se añadió Se añadieron 200 ng / ml de DKK-1 (proteína de Dickkopf 1 recombinante humana) al medio solo o en combinación con T3. El medio fue cambiado cada 3 días. Los esferoides formados se recogieron, se congelaron y se almacenaron a 4°C después de 14 días en cultivo para análisis posterior. Se utilizó DMEM con suero knockout al 10%, penicilina al 1% y estreptomicina al 1% como medio de control para todos los experimentos.

3.8.4 Estudios con NAC

Los esferoides se incubaron con DMEM, suero KO al 10% (Gibco, Invitrogen), 1% de penicilina y 1% de estreptomina (Sigma-Aldrich) con 20 µg de N-acetilcisteína (NAC) durante 1 h diariamente durante tres días antes del cambio regular de los medios de diferenciación. Los esferoides control se incubaron en las mismas condiciones en DMEM con suero eliminado al 10%, penicilina al 1% y estreptomina al 1% sin NAC.

3.9 DIFERENCIACIÓN HACIA ADIPOCITOS

Se utilizó un medio adipogénico comercial de Cambrex. Para comprobar la diferenciación hacia esta línea se fijaron las células después de 14 días con el medio específico en 10mM de peryodato sódico, 2% de paraformaldehído, 75mM L-Lisina dihidroclorhídrico y 37.5 mM de fosfato sódico (dibásico) a pH 7.4 (todo de Sigma-Aldrich) durante 15' a temperatura ambiente y posteriormente secada y tenida con una solución filtrada de oil red O para revelar la presencia de vacuolas lipídicas en el cultivo.

3.10 DIFERENCIACIÓN HACIA OSTEÓBLASTOS

Las CMMs han sido sembradas en portaobjetos divididos en 8 cámaras) con una densidad de 25×10^3 células por pocillo y cultivadas en un medio osteogénico comercial de Cambrex. Para comprobar la diferenciación hacia esta línea se fijaron las células después de 14 días con el medio específico en 10mM de peryodato sódico, 2% de paraformaldehído, 75mM L-Lisina dihidroclorhídrico y 37.5 mM de

fosfato sódico (bibásico) a pH 7.4 durante 15' a temperatura ambiente y posteriormente secada y teñida con una solución filtrada de rojo alizarina para revelar la presencia de depósitos de fosfato de calcio secretado por las células que se han diferenciado hacia osteoblastos.

3.11 ESTIMULACIÓN INFLAMATORIA

Para desencadenar una respuesta inflamatoria en nuestras células en placa se utilizó interleuquina 1 β recombinante humana (rIL-1 β) y factor de necrosis tumoral recombinante humano α (rTNF α) a unas concentraciones de 0.1 ng/mL y 100ng/mL respectivamente, en medio de cultivo o medio condrogénico dependiendo del experimento.

3.12 ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO

3.12.1 En esferoides

En estos estudios, algunos esferoides de CMMs de cordón umbilical se congelaron en matriz de inclusión de OCT (BDH Chemicals, Poole, UK). Se cortaron secciones (4 μ m) usando un criostato y otros se fijaron en paraformaldehído al 4% (p / v) en PBS a pH 7,6.

Algunas de estas secciones se tiñeron con Safranin O para evaluar la distribución de proteoglicano en la matriz.

Se realizaron análisis inmunohistoquímicos con anticuerpos monoclonales contra COL1 (1: 5000) (Abcam, Bristol, UK), COL2 (1: 200) (Chemicon, Millipore Ibérica SA, Madrid, SP), COLX (1: 1000) (Sigma-Aldrich), MMP-13 (Thermo Scientific) y ALP (1: 200) (R & D Systems). Para

ser detectadas las proteínas, se usaron anticuerpos secundarios biotinilados marcados con un complejo peroxidasa-biotina-estreptavidina añadiendo un sustrato diaminobencidina (Vector Laboratories) (1:1.000). Se utilizó suero normal de ratón como control negativo y las secciones no se contratiñeron.

3.12.2 En el modelo animal de primate no humano

Los tejidos representativos de cada mono se congelaron en matriz de inclusión de OCT y en parafina hasta su análisis posterior. Se cortaron secciones (espesor 4 μm) con criostato o micrótomo. Algunas secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina para evaluar su morfología y algunas secciones se tiñeron con Safranin O (todas de SIGMA-ALDRICH, Missouri, EE.UU.) para evaluar la distribución de proteoglicanos.

3.12.3 Densitometría

Se utilizó el procesador de imágenes AnalySIS (Soft Imaging System GmbH V.5.0, Olympus,) para realizar una cuantificación densitométrica de la tinción obtenida mediante análisis histoquímico. Tres campos de 200 mm^2 de tamaño de cada tinción: safranina O; Aceite rojo; Modificado Masson y rojo alizarina se cuantificaron utilizando unidades arbitrarias proporcionadas por el programa. Los valores se expresaron como porcentaje de tinción positiva para cada tinción.

3.13 INMUNOFLUORESCENCIA

3.13.1 Esferoides

El análisis de inmunofluorescencia en esferoides se realizó permeabilizando algunas secciones de esferoides con PBS que contenía 0,1% de Triton X-100 durante 10 min, y posterior pre-bloqueo con BSA al 3% o suero 2-5% en PBS. Los anticuerpos utilizados fueron anti- β -catenina humana (Santa Cruz Biotechnology) y 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para contra-tinción del núcleo. El anticuerpo secundario fue anti-ratón conjugado con PE (1: 1000 de DakoCytomation).

3.13.2 Morfología nuclear en CMMs

Una vez las células alcanzaron una confluencia del 80%, fueron fijadas con paraformaldehído al 5% en PBS, y posteriormente procesadas como se describe la siguiente publicación⁽¹⁰⁰⁾. Los anticuerpos utilizados fueron Lamina A+C producido en ratón (1:100, Acris Antibodies) como primario, y PE-antiRabbit (BD Science) como secundario.

3.13.3 En el modelo animal de primate no humano

Se realizaron análisis de inmunofluorescencia con anticuerpos: FITC mouse anti-human CD105 (1:100 Serotec), PE-Cy5-conjugated mouse anti-human CD90 (1:20 BD Pharmagen,), FITC mouse anti-human CD44 (1:100 Serotec), PE-conjugated mouse anti-human CD68 (1:50; DakoCytomation) and PE-conjugated ratón anti-human SDF-1 (1:100; Sta. CruzBiotechnology). Para la detección de anticuerpos primarios no

marcados directamente, las células se lavaron con PBS, después se incubaron con anticuerpo policlonal rabbit anti-ratón IgD/PE Rabbit F(ab')₂ (1:1000 DakoCytomation) durante 30 min a temperatura ambiente. El control negativo se realizó usando un isotipo IgG1k de ratón conjugado con FITC, un isotipo IgG1k de ratón conjugado con PE y un isotipo IgG1k de ratón conjugado con PE - Cy5 (todos BD Pharmigen). Las imágenes mostradas fueron realizadas mediante un microscopio Olympus. Las imágenes de mayor amplificación (60x) fueron realizadas con microscopía confocal (A1R Nikon).

3.14 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.14.1 Extracción de ARNm

La extracción de ARNm sigue un protocolo común para células y estructuras en 3D (esferoides y discos de alginato), con la excepción de que las últimas fueron disgregadas primero usando un Mixer Mill MM 200 (Retsch), en N₂ líquido con bolas de zirconio. La extracción y aislamiento del ARN fueron realizadas con TRIZOL (Invitrogen) para conseguir una separación de las fases orgánica e inorgánica para posteriormente proceder a la precipitación del ARN e insolubilizarlo mediante la adición de cloroformo realizando lavados con etanol al 75% en frío.

Para cuantificar el ARN y valorar su pureza se utilizó el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Nanodrop, Wilmington, USA) a 260 nm hallando la ratio entre la absorbancias a 260:280 nm, y a 260:230 nm.

Los restos de ADN fueron eliminados mediante un tratamiento previo con una ADNasa (desoxirribonucleasa I 1U/uL y 1 uL de tampón de reacción 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) parando la reacción por adición de un quelante secuestrador de Mg necesario para el funcionamiento de la enzima. Posteriormente se realizó la retrotranscripción del ARNm a ADNc (ADN complementario) mediante el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche). Transcurrido este tiempo, la amplificación del ADN complementario (ADNc) se realizó con un *kit* comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche). Por cada ug de ARN, se añadió 1 uL de cebadores oligo (dT)₁₈ 50 pmol/uL y 1 uL de random primer completando con agua de PCR hasta 13 uL e incubando la mezcla 10 min a 65°C.

Este último paso, permite la desnaturalización de estructuras secundarias del ARN. A continuación, se añadieron 4 uL de tampón para la reacción 5X (40 mM MgCl₂), 0.5 uL de inhibidor de ARNasa 40U/uL, 2 uL de mezcla de deoxinucleótidos 10 mM y 0.5 uL de enzima reverso transcriptasa 40U/uL.

Los 20 uL de la mezcla total fueron incubados 30 min a 55°C, tras los cuales se ha inactivado la enzima calentándola 5 min a 85°C. La reacción fue parada bajando la temperatura a 4°C. Los tubos fueron congelados a -20°C hasta el momento en que se realizaron los ensayos de PCR a tiempo real.

3.14.2 PCR a tiempo real

El ensayo de amplificación mediante PCR a tiempo real fue realizado usando como fluoróforo SYBR green (*Light Cycler 4800 SYBR Green I Máster kit*) en el caso de todos los análisis, exceptuando los hechos en condrocitos articulares, para los que se utilizaron sondas TaqMan (*Applied Biosystems*) encargadas a la compañía y siguiendo las especificaciones del fabricante.

En el diseño de primers para el método de SYBR Green se utilizó el programa online de Roche: Universal ProbeLibrary Assay Design Center (https://lifescience.roche.com/en_es/brands/universal-probe-library.html) El equipo de análisis fue un *Real Time Light Cycler* (Roche). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por duplicado, usando en el proceso 2 uL de ADNc obtenido tras la retrotranscripción de 1ug de ARN, 10 uL de *SYBR Green 2X*, 0.3 uL de cada cebador (20 uM) y agua de PCR hasta completar un volumen final de 20 uL. Las condiciones empleadas para la reacción fueron: una incubación inicial a 95°C durante 10 min para la activación de la *Fast Start Taq* ADN Polimerasa y desnaturalización del ADN, y a continuación un programa de amplificación de 45 ciclos de: 10segundos (s) a 95°C para la desnaturalización, 6 segundos a 61°C para el anillamiento, y finalmente 7 segundos a 72°C para la extensión.

Los resultados obtenidos han sido calculados aplicando el cálculo del DDct⁽¹⁰¹⁾. Algunos de los resultados fueron directamente analizados con el programa pyQPCR (<http://pyqpcr.sourceforge.net/>), diseñado para el tratamiento de datos de PCR en tiempo real.

Tabla 3.1: Resumen de los primer para SYBR Green utilizados en estos experimentos

Gene Name	Fw primer	Rv primer
<i>COL1A1 2f2r</i>	gtgatgctggctctgttgg	caccatcgtgagccttctct
<i>COL2A1 3F3R</i>	gtgtcagggccaggatgt	tcccagtgtcacagacacagat
<i>COL10A1</i>	caccttctgactgctcatc	ggcagcatattctcagatgga
<i>RPLP</i>	tctacaacctgaagtgcttgat	caatctgcagacagacactgg
<i>MMP-13</i>	tttctctctgggccaat	gcaqacagaaacaagttgtagcc
<i>Aggrecane</i>	gcctacgaagcaggctatga	gcacgcataggtcctga
<i>GSK3-β</i>	tcctgcctgctgaagtgaac	tttagctgaggcttggggcc
<i>Frizzled-7</i>	gaggcctgctgctagaatc	ataaggccaaggagacgtgg
<i>β-Catenin</i>	cattgtttgtgcagctgcttt	caggacaaggaagctgcaga
<i>SRC2</i>	ccagcatccctgtacga	catccaccagcagga
<i>AP2α</i>	gatcctgcagggactaca	gttggactggacagggac
<i>AP2ε</i>	gaaatagggacttagctcttg	ccaagccagatcccaactctg
<i>ITGa10</i>	gtgtggatgcttcattccag	gcatccaagacaatgaaa
<i>Sox9</i>	ctccgggacatgatcagc	ggtagtgctgggacatgtgaa
<i>GAPDH</i>	agccacatcgctcagacac	gccaatacagacaaatcc
<i>Sox2</i>	gtaccgcactgcacaac	tcgtctctgtcagaagtctc
<i>Nanog</i>	atgcctcacacggagactgt	aagtgggtgtttgccttg
<i>Oct3/4</i>	ctcctggagggccaggaatc	atatacacaggccgatgtgg
<i>LPL</i>	agaacatcccattcactctgc	ccatttgagcttcaacatgagt
<i>FAB</i>	ggatgataaactgggtgga	cacagaatgttagagttcaatc
<i>ADIPOQ</i>	ggtgagaaaggagatccaggt	tgctgagcgtatacataggc
<i>ALP</i>	gacggaccctcactctc	gtgccgtggtcaattct
<i>OC</i>	ggcgtacctgtatcaatgg	tcagccaactcgtcacgtc
<i>Runx2</i>	gtgcctaggcgcatttca	tgactggcggcgtgcaag

3.15 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

3.15.1 Extracción de proteínas totales

3.15.1.1 *Células en monocapa*

Las células se cultivaron hasta una confluencia al 70% en placas de cultivo de 6 pocillos (Corning, Nueva York, Estados Unidos). Se lavaron tres veces con PBS (MP Biomedicals, Illkrich, Francia) y se recogieron utilizando un raspador con tampón de lisis de dodecilsulfato sódico (SDS) (glicerol al 20% (v / v), Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, (P / v) SDS y cóctel inhibidor de proteasa al 10% (todos de Sigma-Aldrich, St.Louis, Estados Unidos). Estas muestras se incubaron a 100°C durante 10 min seguido de dos ciclos consecutivos de vórtex y sonicación, Se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 11000 xg. Las proteínas se cuantificaron (proteína total A280) utilizando un instrumento Nanodrop™ 1000. Los extractos de proteínas se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta un análisis posterior.

3.15.1.2 *Esferoides y discos de alginato*

Las muestras fueron disgregadas primero usando un Mixer Mill MM 200 (Retsch), en N₂ líquido con bolas de zirconio y resuspendidas en tampón lisis. A continuación, el procedimiento es igual al anteriormente descrito.

3.15.2 Western-blot

Se cargaron 20- 40ug de proteínas totales para cada condición a estudio. Las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes se realizan un gel de poliacrilamida monodimensional para seguir con la inmovilización de proteínas sobre filtros de PVDF (Bio-Rad) realizada mediante transferencia semiseca (Bio-Rad) durante 25 min. a 20 V, utilizando el siguiente tampón de transferencia: Tris base 25mM, Glicocola 151.8 mM y metanol al 20% (v/v). A continuación, los filtros de PVDF se tiñen sumergiéndolos en una solución de Rojo Ponceau S (Sigma) al 0.2% en ácido tricloroacético 30% (p/v) y ácido sulfosalicílico al 30% (p/v) durante 1 min., tras lo cual se lavan con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y comprobar que no ha habido ningún problema durante la transferencia. Una vez inmovilizadas las proteínas en los filtros de PVDF, estos se bloquean en una solución de leche en polvo desnatada 7.5% (p/v) en PBS (Na₂HPO₄ 80mM, NaH₂PO₄ 20mM, NaCl 100mM, pH 7.5) durante 1 hora a T^a ambiente y en agitación. Los filtros se lavan 3 veces durante 10 min. en un tampón de lavado compuesto por PBS y Tween20 0.1% (v/v). A continuación los filtros se incuban durante 1 hora con el anticuerpo específico para la proteína que queremos detectar, diluido en el tampón de lavado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada, a una concentración adecuada (determinada empíricamente) para cada ensayo. Tras realizar otros 3 lavados de 10 min. en el tampón de lavado, las membranas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la enzima peroxidasa, diluido nuevamente en el tampón de lavado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada, a la concentración adecuada. Finalmente, se repiten los 3 lavados de 10 min. y se procede al revelado utilizando el sustrato adecuado (ECL). Las imágenes obtenidas se digitalizan en el digitalizador de imágenes LASS 3000.

3.16 MEDICIÓN DE ROS

Se sembraron 500.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer hasta una confluencia del 80%. Luego se incubaron secuencialmente con y sin NAC durante 1 h, se lavaron e incubaron con DCFH-DA 10 μ M durante 30 min. Las células se recuperaron luego en un y se analizaron por citometría de flujo en un FACS Aria (Benton Dickinson). El porcentaje de células positivas se midió para cada condición por emisión fluorescente a 488 nm; Los niveles basales se calcularon a partir del control sin fluoróforo y se restaron para cada medición.

3.17 ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR

Las células se separaron de las placas Petri después de alcanzar una confluencia del 80% y se sembraron por triplicado 50.000 células de cada línea celular a estudio en el compartimiento superior de una cámara de Boyden modificada (Corning, Cultek SLU, Madrid, SP) en 200 μ l de medio DMEM sin suero. Las cámaras se introdujeron entonces en placas de 24 pocillos con medio sin suero o medio sin suero suplementado con 10 ng / ml de factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) o con 50 pg / ml de interleuquina-8 (IL - 8) como agentes químicos tácticos. Después de 24 horas de incubación en condiciones de normoxia, se evaluó la migración celular a través del filtro mediante tinción de las células con azul trypan y el recuento de células.

3.18 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se fijaron los esferoides por inmersión en glutaraldehído al 1,5% / paraformaldehído al 1,5% que contenía ácido tánico al 0,1% (p / v), seguido de OsO₄ al 1%. Más tarde los esferoides fueron deshidratados, embebidos en epoxy Spur y cortados en un ultramicrotomo. El marcage por inmunogold (IGS) se realizó en lonchas de esferoides antes de la fijación. Se utilizó anticuerpo anti-COL2 humano (1: 200) (Chemicon) seguido de una incubación con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con oro (Sigma-Aldrich). El modelo de microscopio utilizado fue el de transmisión JEOL JEM 1010.

3.19 MODELO ANIMAL OA

Los monos macho adultos, de 10 kg de peso cada uno, fueron alojados en instalaciones veterinarias para animales acreditadas, en jaulas individuales y en cuartos de retención equipados con una barrera de aire filtrada inversamente (10 cambios de aire por hora, 100% de aire fresco), espectro luminoso (8:00 AM a 8:00 PM) y acondicionadas a 23°C con humedad relativa del 60%. Los animales fueron alimentados con comida de primate comercial suplementada con fruta fresca y se les proporcionó agua del grifo *ad libitum*. Se utilizaron nueve animales adultos machos (*Macaca Fascicularis*) para los experimentos. Se les realizó una lesión en la rodilla izquierda utilizando el procedimiento descrito en Ramallal *et al.* ⁽¹⁰¹⁾. A un grupo de dos animales se le inyectó dos veces en la vena cubital con 10×10^6 CMMs CD105 + marcadas con DiO. A un segundo grupo de dos animales se le inyectó directamente en la rodilla dos veces con 1×10^6 células CD105 + marcadas con Dil. Al mismo tiempo estos animales fueron inyectados dos veces en vena con 10×10^6 CD105⁺-CMMs marcadas con DiO. A otros tres animales se les inyectó

dos veces en la vena 10×10^6 CD105⁺-CMMs marcadas con GFP. Un último grupo de dos animales fueron inyectados directamente en la rodilla con 1×10^6 CD105⁺-CMMs marcadas con Dil dos veces y al mismo tiempo se inyectaron otras dos veces en la vena cubital con 10×10^6 CMMs CD105 marcadas con GFP. Se esperó una semana entre cada inyección. Después de cuatro semanas los animales fueron sacrificados y sus tejidos fueron congelados e incluidos en parafina para ser analizados por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, respectivamente. Todos los experimentos fueron aprobados por el CEIC de Galicia (Comité Ético de Galicia).

3.19.1 Análisis bioquímico y serológico

El análisis bioquímico y hematológico realizado a los animales antes y justo después del sacrificio consistió en la extracción de sangre de la vena y parámetros hematológicos como RBC, hemoglobina, hematocrito, glóbulos blancos, plaquetas, linfocitos y neutrófilos utilizando Veterinarian MS9 (Kemia Scientific). El suero de sangre entera se midió para determinar la glucosa, urea, creatinina, proteína total, albúmina, amilasa, calcio, fosfato, sodio, potasio, cloruro, colesterol, bilirrubina, AST, ALT, fosfatasa alcalina y triglicéridos usando Vitalab Selectra-Flexor ÁTOMO.

3.20 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Durante el estudio del efecto de la sobreexpresión de LMINA y PG, todos los experimentos se realizaron por triplicado y un resultado representativo es el que fue mostrado en cada figura. El análisis estadístico de los datos, comparando resultados de las subpoblaciones y tiempos de nuestro estudio, fue realizado usando el análisis de Varianza (ANOVA) del programa informático SPSS v 19. Una P cuyo valor fue menor de 0.05 fue considerada estadísticamente significativa en todos los casos excepto en la diferenciación condrogénica con NAC, donde $P < 0.01$ fue el valor considerado estadísticamente significativo.

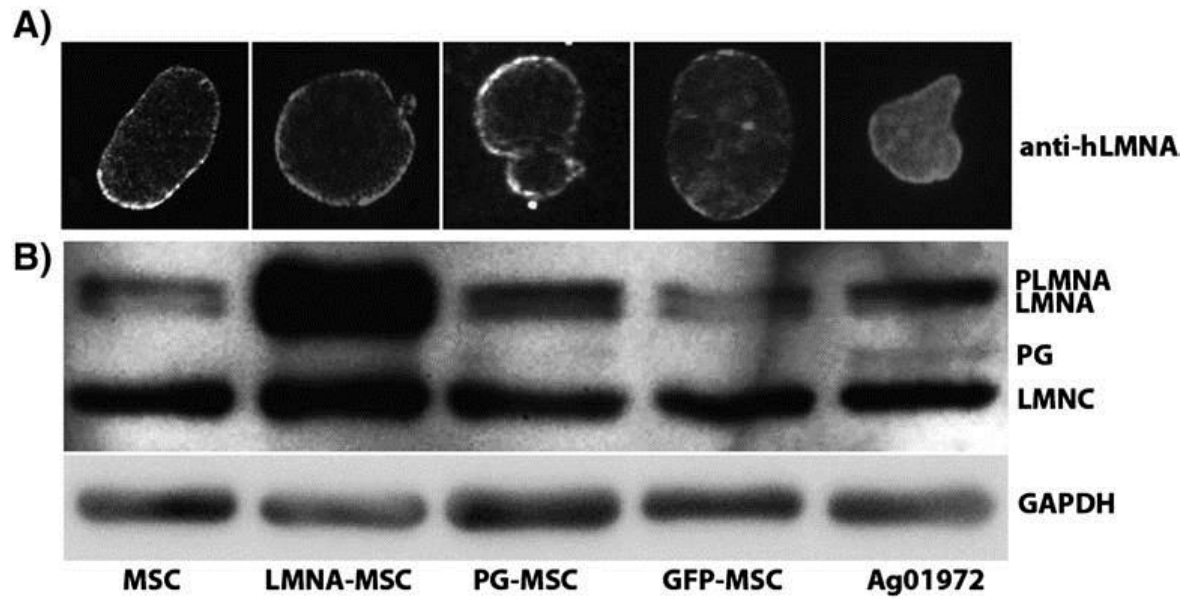
Todos los demás experimentos se realizaron por triplicado a excepción de los análisis en CAs (duplicado). Los análisis estadísticos no paramétricos se realizaron mediante pruebas de Mann-Whitney-U y Kruskal-Wallis utilizando SPSS v 19. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05. Todos los datos se presentan como error estándar de la media.

5 RESULTADOS

5.1 EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LAMINA Y PROGERINA EN EL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN MESODÉRMICA EN CMMs PROCEDENTES DE CORDÓN UMBILICAL

5.1.1 Acumulación de LMNA y PG en las células transfectadas.

La expresión de isoformas de lamina en las GFP-CMMs fue similar a la expresión en células no transducidas. La expresión de PG en las PG-CMMs produjo las alteraciones en la membrana nuclear (ampollas y acumulaciones de LMNA) típicas de las líneas celulares que expresan PG (figura 4.1 A). La eficiencia de la inserción génica y la expresión proteica fue determinada por westerblot con el anticuerpo anti+lamin A+C. Las células LMNA-CMMs mostraron una acumulación de lamina “wild tipe” (wt) y de su precursor, la pre-lamina A (PLMNA) (figura 4.1 B). Las PG-CMMs expresaron la isoforma de menor peso molecular progerina (PG). También se detectaron leves defectos nucleares en las LMNA-CMMs. Además, las células que sobre-expresa tanto LMNA como PG muestran una disminución en su ratio de proliferación (figura 4.2 C).



Proliferation curve

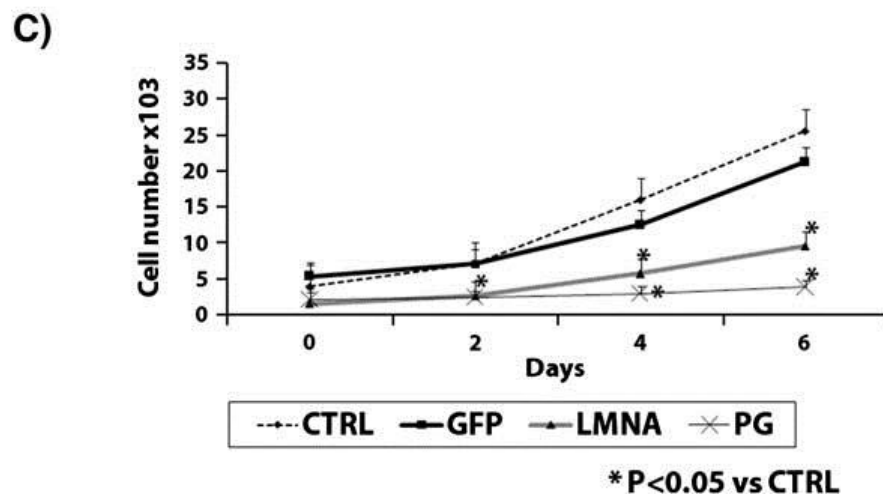


Figura 5.1: Caracterización de las CMMs transducidas con progerina (PG, lamina A, (LMNA) Y proteína verde fluorescente (GFP). Inmunofluorescencia que muestra la distribución nuclear de LMNA (A). Análisis de western-blot mediante anticuerpo contra LMNA A+C. GAPDH utilizado como control de carga (B). Ensayo de proliferación de las distintas líneas celulares. Proliferation rate of the different (C).

5.1.2 Potencial de diferenciación de las PG-CMMs y LMNA-CMMs vs GFP-CMM

Después de 21 días en medio osteogénico, prácticamente el 100% de las células transducidas con GFP y LMNA fue positivo en la tinción de rojo alizarina, en contraste con un 40% de las PG-CMMs (figura 4.2 A-B). Los estudios genéticos revelan que las LMNA-CMMs expresan altos niveles del gen OC, mientras que las PG-CMMs muestran una expresión de ALP significativamente más baja. (figura 4.2 B).

Casi el 45% de las GFP-CMMs y LMNA-CMMs sembradas fueron positivas para la tinción de Oil Red O, mostrando una mayor adipogénesis, en comparación con el 25% de las PG-CMMs (figuras 4.2 C-D). La expresión de LPL y FABP fue significativamente ($P < 0.05$) más alta en LMNA-CMM que en el control GFP-CMMs, unas 100 veces. En contraste, la expresión de estos genes fue significativamente menor en PG-CMMs (figura 4.2 D). Las PG-CMMs presentan una ratio condrogénica COL2/COL1 significativamente mucho menor que en el caso de las LMNA-CMMs y GFP-CMMs, como reveló la inmunohistoquímica (figura 4.3 A) y la q-PCR (Figura 4.3 B). El estudio histomorfológico demostró que las PG-CMMs presentaban una disminución en la tinción de COL2 y safranina O (proteoglicanos) en comparación con LMNA-CMMs y GFP-CMMs (figura 4.3 C). Estos resultados fueron corroborados por PCR en tiempo real para COL2 y AGG (figura. 4.3D). Los estudios de hipertrofia durante la condrogénesis mediante inmunohistoquímica demuestran el papel de la LMNA y PG en el proceso de diferenciación de CMMs.

El análisis inmunohistoquímico del marcador de hipertrofia COLX muestra que esta proteína aumentó significativamente tanto en PG

como en LMNA-CMMs (figura. 4.3 E); Este hallazgo fue validado por RT-PCR en tiempo real (figura. 4.3F).

La expresión génica de MMP-13, otro marcador de hipertrofia clásica, fue significativamente mayor en LMNA y PG-CMMs (figura. 4.3 F). En este caso, el análisis inmunohistoquímico mostró como significativo ($P < 0.05$) el aumento de MMP-13 sólo en PG-CMMs en comparación con el control GFP-CMMs (figura 4.3 E).

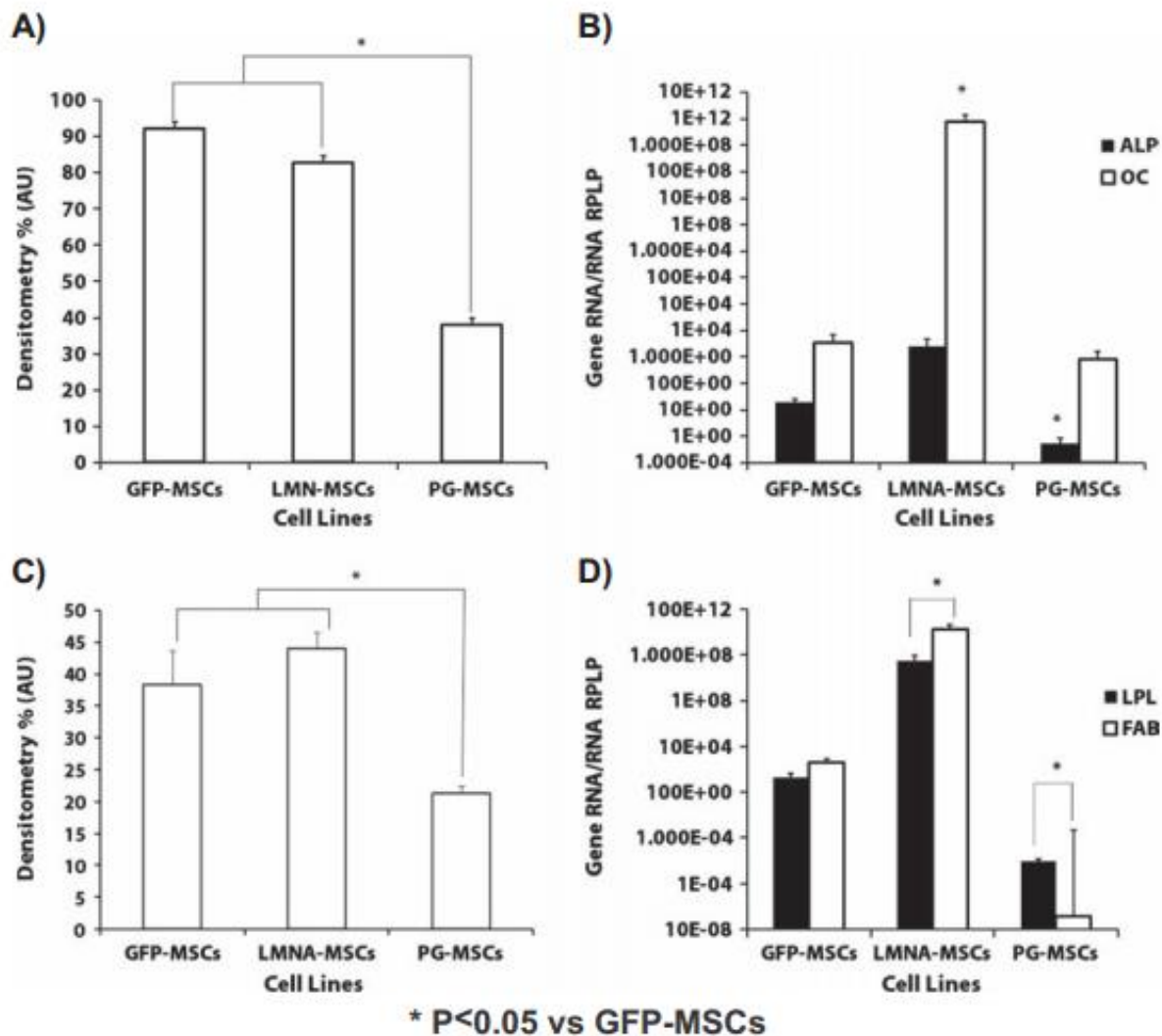


Figura 5.2: Potencial osteogénico y adipogénico de las CMMs transducidas con progerina (PG, lamina A, (LMNA) Y proteína verde fluorescente (GFP). Análisis de densitometría para depósitos de calcio (tinción de rojo alizarina) (A). Análisis de qPCR para los genes marcadores de osificación ALP y OC para las tres líneas celulares (B). Densitometría de tinción con Oil Red O para vesículas lipídicas (C). Análisis de qPCR para los genes marcadores de adipogénesis LPL y FABP (D). *P < 0.05 vs GFP-CMMs.

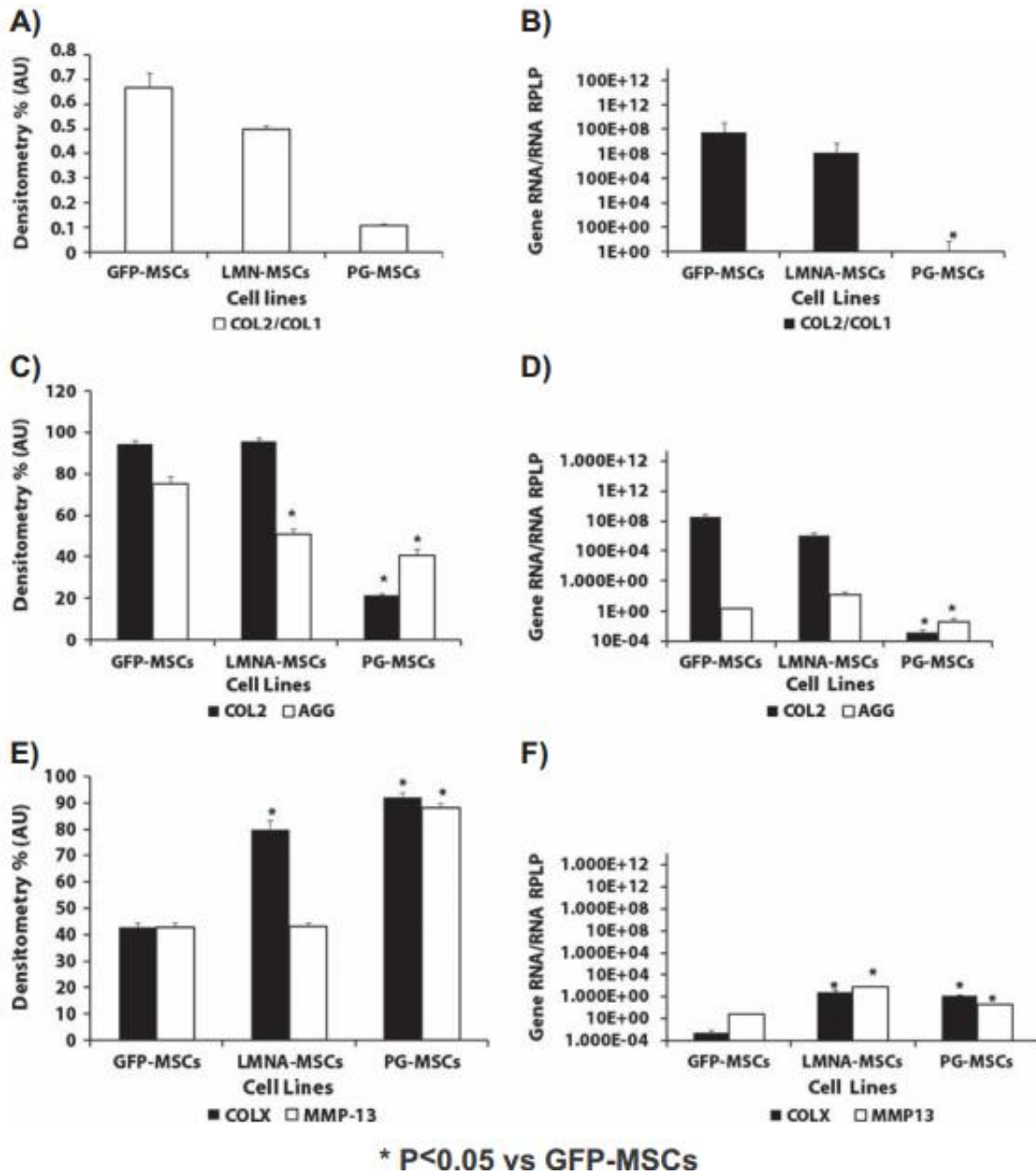


Figura 5.3: Potencial condrogénico y marcadores de hipertrofia durante la condrogénesis. Densitometría de las inmunohistoquímicas para COL2 y 1 COL1. Se muestra el ratio COL2/COL1 (A). Análisis por qPCR del ratio COL2/COL1 (B). Densitometría de COL2 y tinción con safranina para proteoglicanos. (C). Análisis por qPCR de los genes marcadores de condrogénesis COL2 y AGG (D). Densitometría de las inmunohistoquímicas para MMP13 y COLX (E). Análisis de qPCR para los genes marcadores de hipertrófia COLX y MMP13 (F). *P<0.05 vs GFP-CMMs.

5.1.3 Papel de las especies reactivas de oxígeno

Un análisis de Western-blot mostró que la expresión de MnSODM está disminuida en PG-CMMs y LMNA-CMMs en comparación con el control GFP-CMMs (figura 4.4 A). La producción espontánea de ROS fue significativamente mayor en PG-CMM y LMNA-CMMs que en el control GFP-CMM ($P < 0,05$) (figura 4.4 B). El tratamiento de las células durante 1 h con NAC redujo la acumulación de ROS a niveles basales (figura 4.4B).

La capacidad de migración orientada de PG-CMMs y LMNA-CMMs en el ensayo de cámara de Boyden bajo el efecto de dos agentes quimiotácticos relacionados con la inflamación, SDF-1 e IL-8, aumenta significativamente en comparación con el control GFP-CMM (figura 4.4 C).

Para examinar el papel de ROS en la diferenciación condrogénica de las tres líneas, analizamos el efecto de NAC en el proceso. La q-PCR en tiempo real reveló un aumento estadísticamente significativo ($P < 0,1$) en la relación COL2 / COL1 en las líneas celulares GFP-CMM y LMNA-CMM tratadas con NAC (figura 4.5 A). La línea PG-CMM no se vio afectada por el tratamiento con NAC, aunque los niveles de expresión de los genes COL2 fueron significativamente más altos en los tratados comparados con los no tratados ($P < 0,1$) (datos no mostrados). En los cultivos tratados con NAC la expresión del gen AGG aumentó (figura 4.5B). La expresión del gen MMP-13 disminuyó en las líneas celulares LMNA-CMM y PG-CMM (figura. 4.5C). las GFP-CMM no mostraron cambios significativos en la expresión génica de AGG y MMP-13. Se observaron los mismos resultados en el análisis inmunohistoquímico (figura 4.5D).

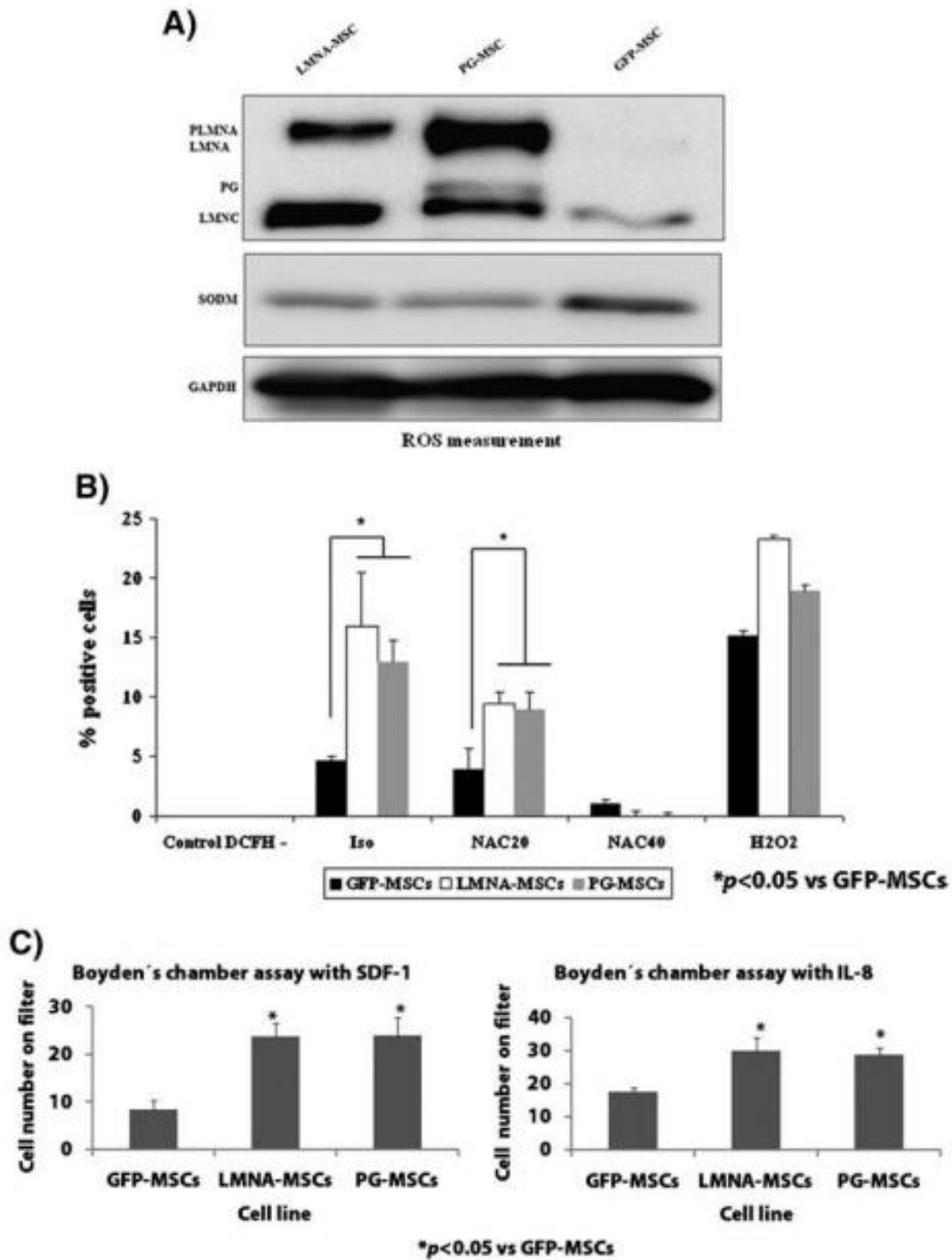


Figura 5.4: Niveles de MnSODM, producción de ROS y efecto en la capacidad migratoria de las tres líneas de CMMs. Western-blot para las isoformas de lamina y MnSODM. GAPDH utilizado como control de carga (A). citometría de flujo de las tres líneas celulares después de una hora de incubación con N-acetyl-cysteina (NAC) o del tratamiento con peroxidase de hidrógeno (H2O2) (B). Ensayo en Cámara de Boyden modificada de las tres líneas para comprobar su capacidad de migración orientada por SDF-1 y IL-8 (C). * $P < 0.05$ vs GFP-CMMs

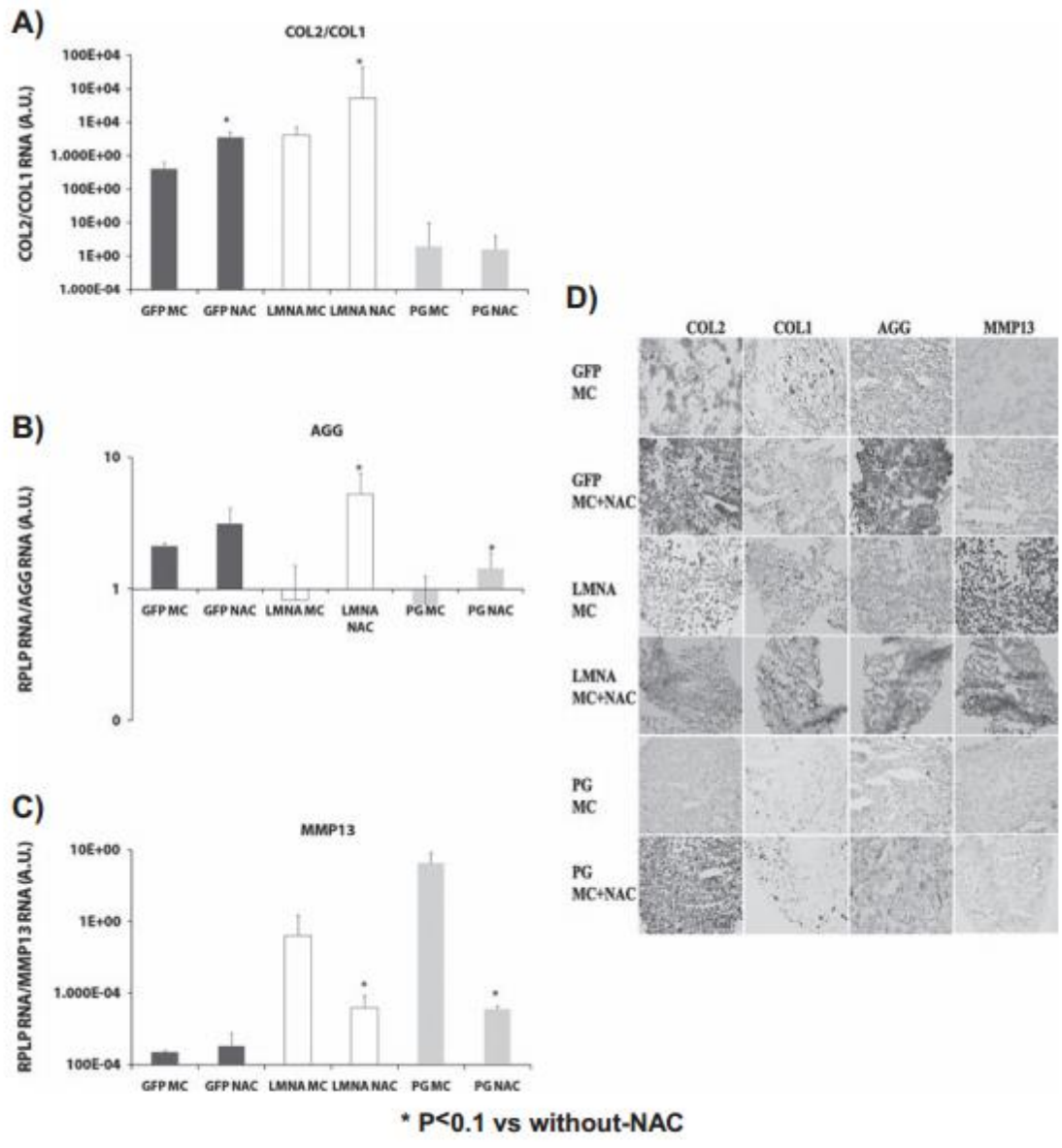


Figura 5.5: Efecto de ROS en la diferenciación condrogénica de las tres líneas de CMMs. Análisis de qPCR para los genes marcadores de condrogénesis e hipertrófia COL2/COL1 (ratio) (A), AGG (B) y MMP13 (C). $P < 0.1$ vs control no tratado con NAC. (D) Análisis inmunohistoquímico contra COL2, COL1, AGG y MMP-13. (20x).

5.2 PAPEL DE PRL Y T3 EN LA CONDRÓGENESIS *IN VITRO* DE CMMs PROCEDENTES DE CORDÓN UMBILICAL.

5.2.1 Caracterización de CMMs

Se realizó la caracterización de las CMMs mediante citometría de flujo antes de la diferenciación condrogénica para determinar su pluripotencialidad. Un alto porcentaje de CMMs fueron positivos para CD73 (> 40%), CD90 (> 40%) y CD105 (> 30%). Menos del 5 % de células fueron positivas para VEGF y menos del 1% lo fueron para CD34 y CD45, por lo que podemos concluir que son esencialmente negativas para estos marcadores (figura 4.6A).

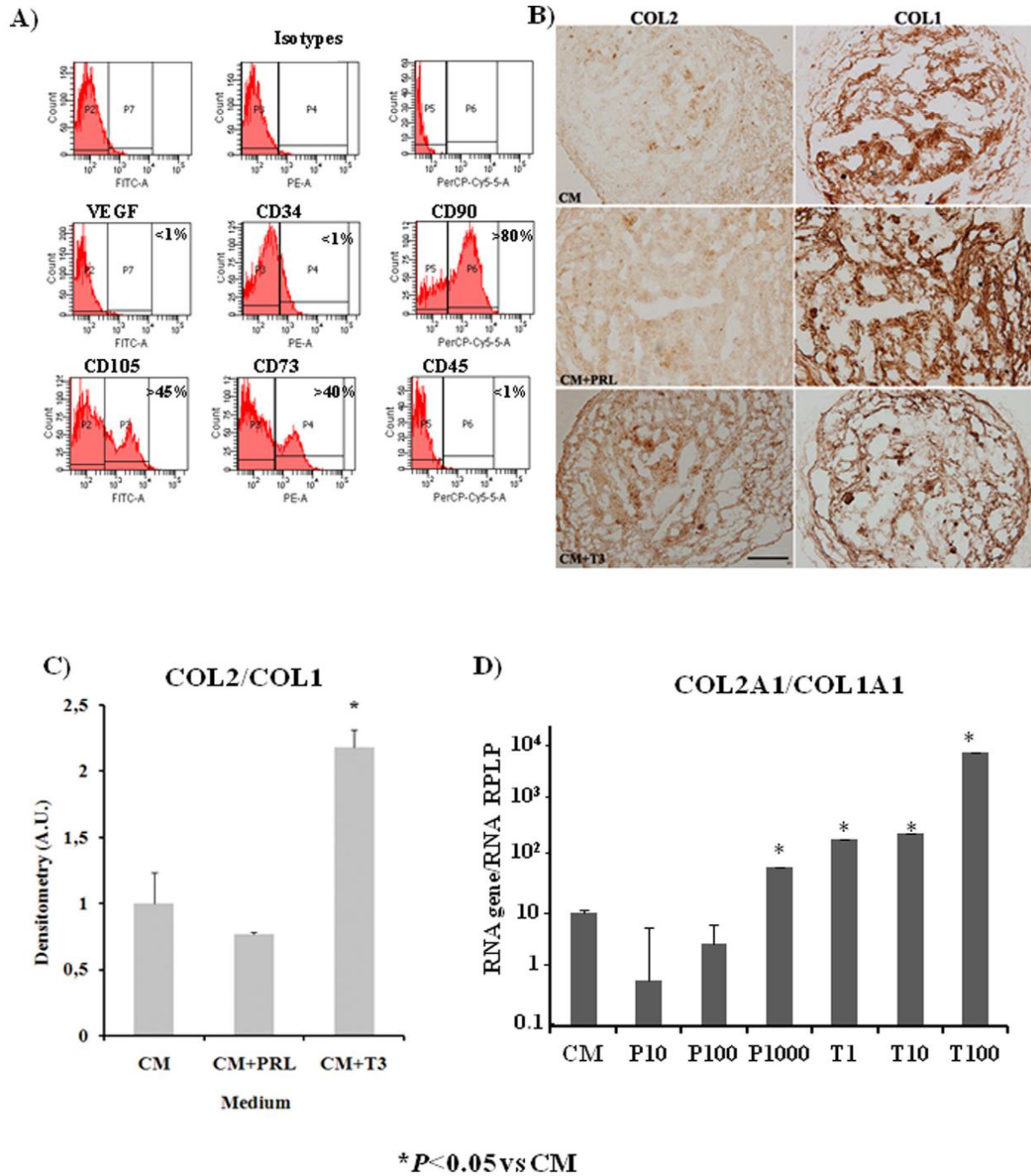


Figura 5.6: Caracterización de CMM-CUs mediante citometría de flujo de los marcadores de CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, y VEGF. El porcentaje de células positivas se muestra el porcentaje de células positivas para cada marcador (A) Inmunohistoquímica para los anticuerpos contra COL2, Y COL1 realizada en esferoides formados en medio condrogénico (MC), MC+ 1.000 ng/mL de prolactina CM+PRL o CM + 100 ng/mL de 3, 30, 5-triiodo-L-thyronine (T3) (MC+ T3) (barra=2 mm) (B). Ratios de COL2/COL1 obtenidas mediante densitometría del análisis inmunohistoquímico para COL2 y COL1 (C). resultados de qPCR: ratio de la expresión COL2A1/COL1A1 en esferoides producidos en MC y MC con las diferentes concentraciones de PRL Y T3. 10, 100, o 1,000 ng/mL de PRL (P10, P100, y P1,000 respectivamente) y 1, 10, oo 100 ng/mL de T3 (T1, T10, y T100 respectivamente). RPLP utilizado como housekeeping. P < 0.05 vs MC (D).

5.2.2 Estudio de la condrogénesis

Se analizó la curva de respuesta para diferentes concentraciones de PRL y T3 (PRL a 10, 100 ó 1000 ng / ml y T3 a 1, 10 ó 100 ng / ml) en medio condrogénico (CM) mediante la expresión génica de COL1 y COL2. La dosis de 100 ng / ml de T3 dio como resultado el aumento más estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la expresión del gen COL2, en comparación con el control CM (figura 4.6B). Los análisis de densitometría para las proteínas COL2 y COL1 mediante inmunohistoquímica después de 14 días en cultivo se realizaron usando 1000 ng / ml de PRL y 100 ng / ml de T3. Los resultados revelaron que la mejor relación de COL2/COL1 después de 14 días de condrogénesis fue cuando se añadió T3 al medio (figura 4.6C-D). Los proteoglicanos fueron más abundantes en los esferoides cultivados con T3 en comparación con CM o CM + PRL, como lo demuestra la tinción con safranina O después de 14 días (figura 4.7 A) y su análisis densitométrico (figura 4.7B). La diferencia fue estadísticamente significativa con un $p < 0,05$. Corroborando estos datos, el análisis por qPCR del gen agrecano (ACAN) muestra una expresión significativamente más alta ($p < 0,05$) en esferoides formados en CM + 100 mg / ml de T3 (figura 4.7 C). Dichos esferoides cultivados durante 14 días expresaron también niveles significativamente más altos ($p < 0,05$) de los genes AP-2 α , ITG α 10 y COL2 comparados con esferoides cultivados durante 14 días en CM solo (figura 4.8 A). En la figura 4.8 B se observa un esferoide en el que se pueden ver dos CMMs donde se diferencia el núcleo y la brecha entre células sin ninguna estructura interna. En la figura 4.8 C se muestra un esferoide cultivado en CM después de 14 días. En esta imagen se observan fibras de COL2 teñidas por inmunogold (IGS). En la figura 4.8 D y 4.8E se muestra un esferoide cultivado en CM + 100 mg / ml de T3 después de 14 días.

Las fibras de COL2 se observaron gracias a una tinción IGS con diferentes aumentos (120.000x y 100.000x, respectivamente).

La expresión génica de SRC2 se demostró utilizando qPCR en CMMs antes y después de la diferenciación condrogénica. Como control positivo se utilizaron condrocitos de donantes humanos sanos (figura 4.9 A). La mejora condrogénica producida por T3 en nuestro modelo de CMMs pudo ser inhibida cuando se añadió al medio una hora antes de añadir T3 un inhibidor específico de SRC2, el ML151. Se evaluaron tres dosis de ML151 (2,5, 10 y 20 μ M) en medio condrogénico sin añadir T3 (figura 4.9B). La dosis de ML151 a 2,5 μ M redujo significativamente ($p < 0,05$) la relación de expresión génica COL2 / COL1 en nuestro modelo, en comparación con su expresión en esferoides cultivados con CM más T3 (figura 4.9C). También se realizó ensayos de inmunohistoquímica para las proteínas COL2 y COL1 y se corroboraron los resultados de la expresión de sus respectivos genes; Todas las dosificaciones de ML151 redujeron significativamente ($p < 0,05$) la proporción COL2 / COL1 (figura 4.9 D, E).

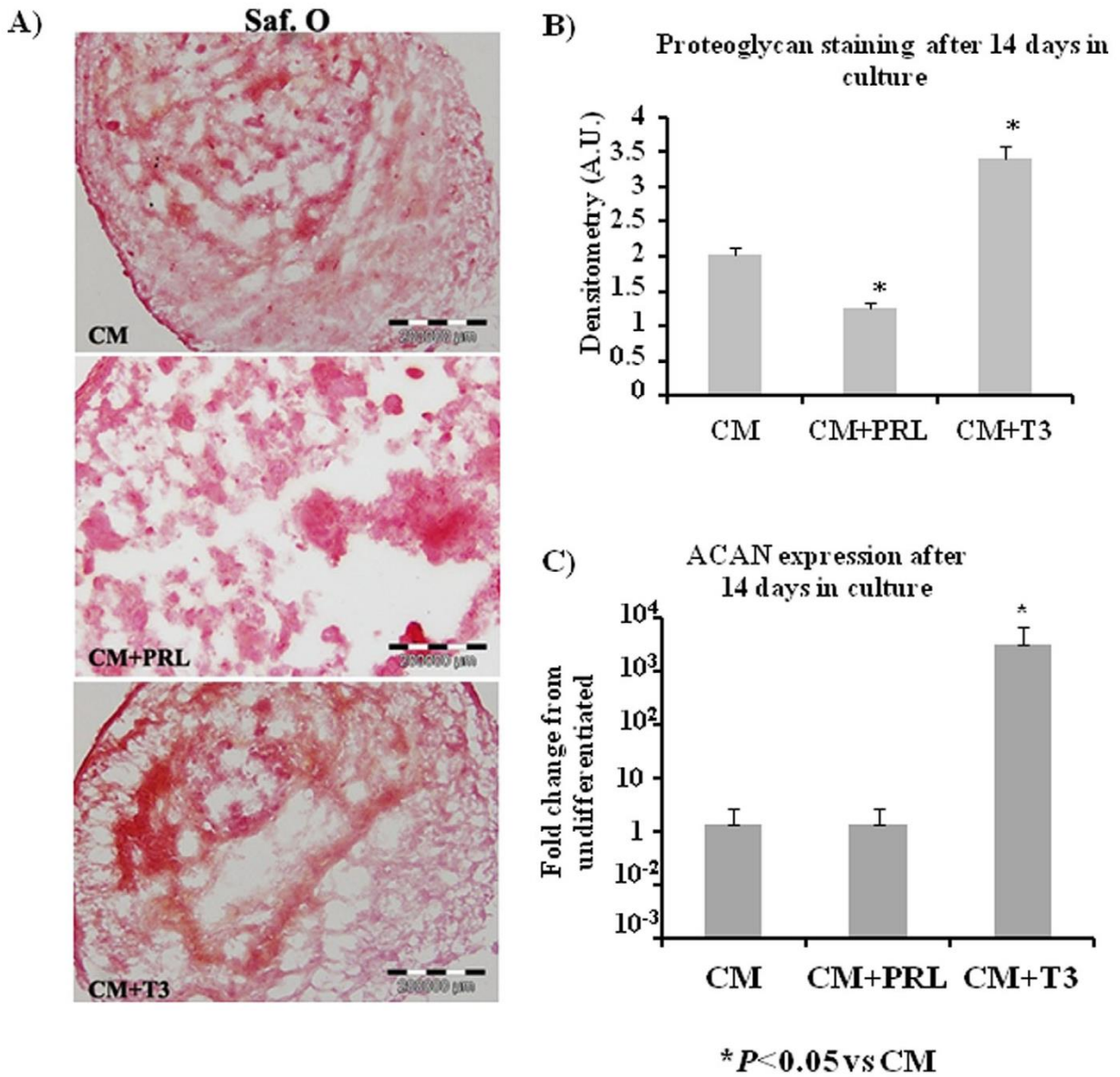


Figura 5.7.: Tinción de safranina O en esferoides formados en MC, MC+ 1,000 ng/mL PRL (CM+PRL), o MC + 100 ng/mL de T3 (MC+T3) (bar= 2 mm) (A). Densitometría de la tinción de safranina O en esferoides formados en MC, MC+ 1,000 ng/mL PRL (CM+PRL), o MC + 100 ng/mL de T3 (MC+T3) (B). qPCR que muestra la expresión de ACAN en esferoides formados en MC, MC+ 1,000 ng/mL PRL (CM+PRL), o MC + 100 ng/mL de T3 (MC+T3). $P < 0.05$ vs MC (C).

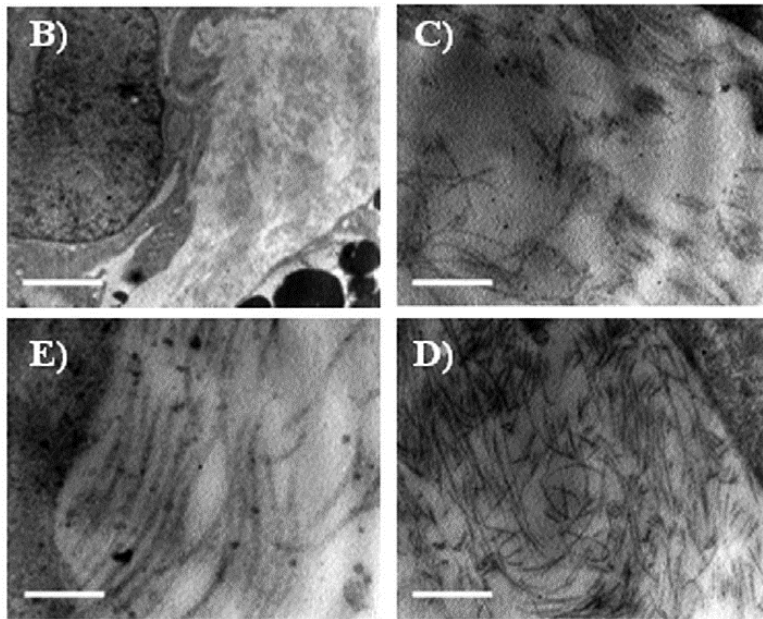
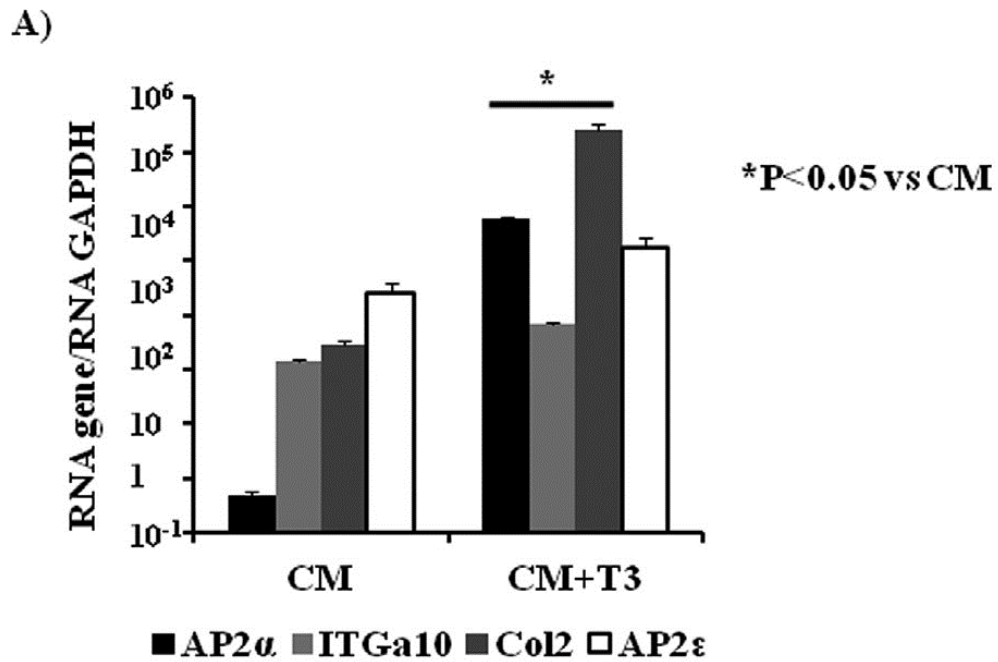


Figura 5.8: Analisis de la expresion génica por qPCR de AP-2 α , Ap-2 ϵ , ITGa10, y COL2A1 en esferoides formados en MC o MC + 100 ng/mL de T3 (MC+T3) . $P < 0.05$ vs MC (A). Microscopía electronica de barrido de esferoides formados despúes de 2 días en MC (barra= 2.5 μ m) (B). Microscopía electronica de barrido de esferoides formados despúes de 14 días en MC (barra= 2.5 μ m) (C). Microscopía electronica de barrido de esferoides formados despúes de 14 días en MC + 100 ng/mL de T3. (barra= 2.5 μ m) (D). Microscopía electronica de barrido de esferoides formados despúes de 14 días en MC (barra= 1 μ m) .

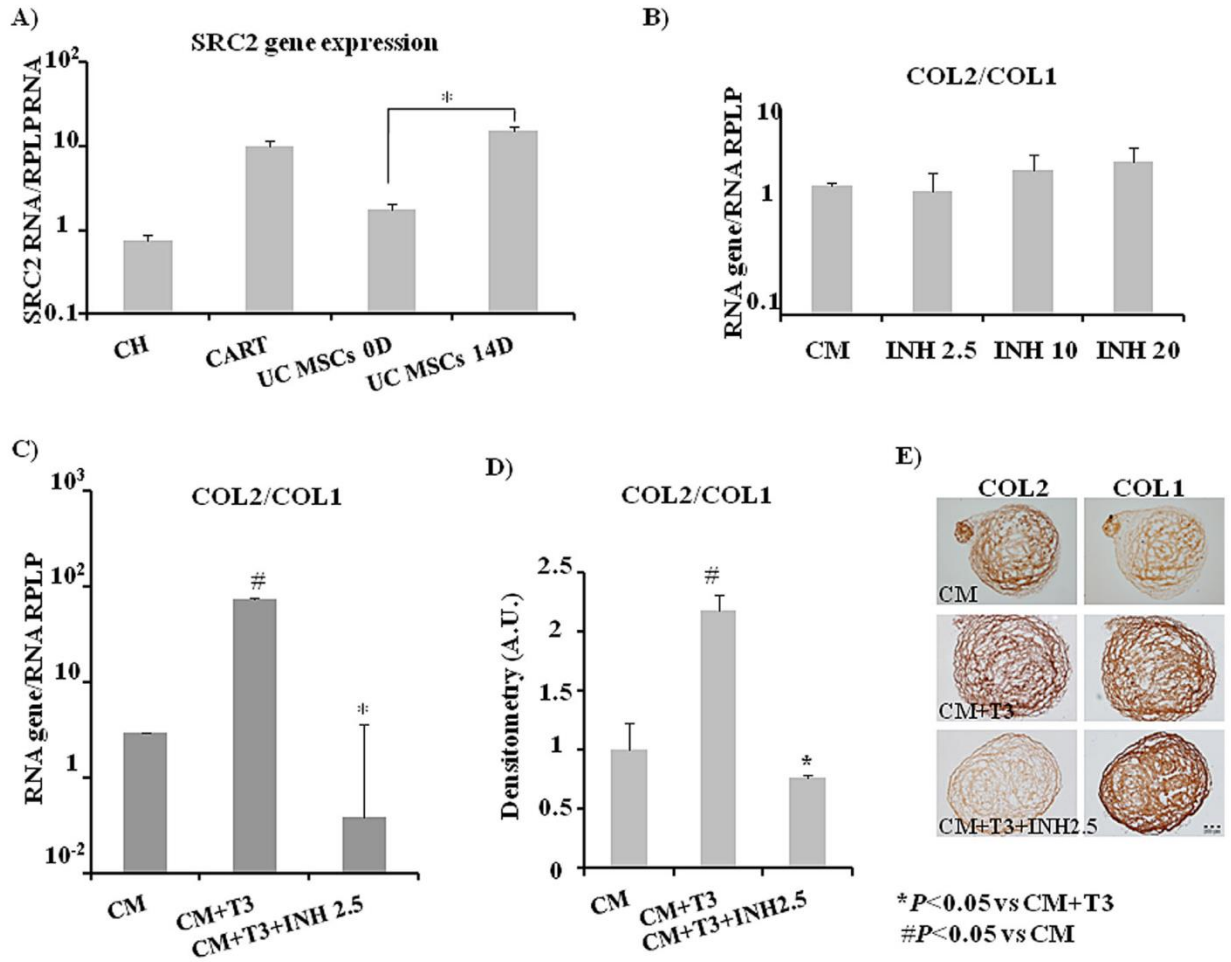


Figura 5.9: Expresión del gen SRC2 medida por qPCR en condrocitos humanos procedentes de donantes sanos, (CH), cartílago humano (CART), CMMs indiferenciadas (CMM-CUs 0D), y esferoides formados en MC después de 14 días. (CMM-CUs14D). (A) Ratio de la expresión génica COL2A1/COL1A1 en esferoides formados en MC + 2.5 μ M (INH2.5), 10 μ M (INH 10), o 20 μ M (INH 20) del inhibidor del receptor de T3 ML151 (B) Ratio CLO2/COL1 obtenida en el análisis por qPCR en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3 y CM+ 100 ng/ml de T3 + 2.5 μ M de ML151. RPLP usado como housekeeping. P<0.05 vs MC(C). Ratio CLO2/COL1 densitometría del análisis inmunohistoquímico en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3 y CM+ 100 ng/ml de T3 + 2.5 μ M de ML151. P<0.05 vs MC (D). Inmunohistoquímica para COL2 y COL1 en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3 y CM+ 100 ng/ml de T3 + 2.5 μ M de ML151 (E).

5.2.3 Estudio de la hipertrofia

Para estudiar la hipertrofia en nuestro modelo se realizó un análisis inmunohistoquímico para MMP-13, COLX y ALP (figura 4.10 A, B) y se analizó la expresión de sus genes por qPCR (figura 4.10 C). También se incluyó el análisis de expresión de los factores de transcripción Runx2 (como un marcador de hipertrofia) y Sox9 (como un marcador condrogénico). La tinción de MMP-13 se redujo significativamente cuando se añadió ML151 al medio CM + T3 ($p < 0,05$).

A pesar de que se encontraron resultados similares en los estudios de qPCR del gen MMP-13 (figura 4.9 B), estas diferencias no fueron significativas. Los niveles expresión de COLX disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) en los esferoides cultivados en CM cuando se añadió T3 al medio frente a los niveles en esferoides cultivados en CM sin añadidos. En comparación con los esferoides cultivados en CM + T3, la adición de ML151 aumentó significativamente la tinción de COLX ($p < 0,05$). La expresión de Runx2 se incrementó cuando el inhibidor ML151 estaba en el medio, pero no fue estadísticamente significativo. Por el contrario, la disminución en la expresión de Sox9 sí fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en presencia del inhibidor (figura 4.10 C).

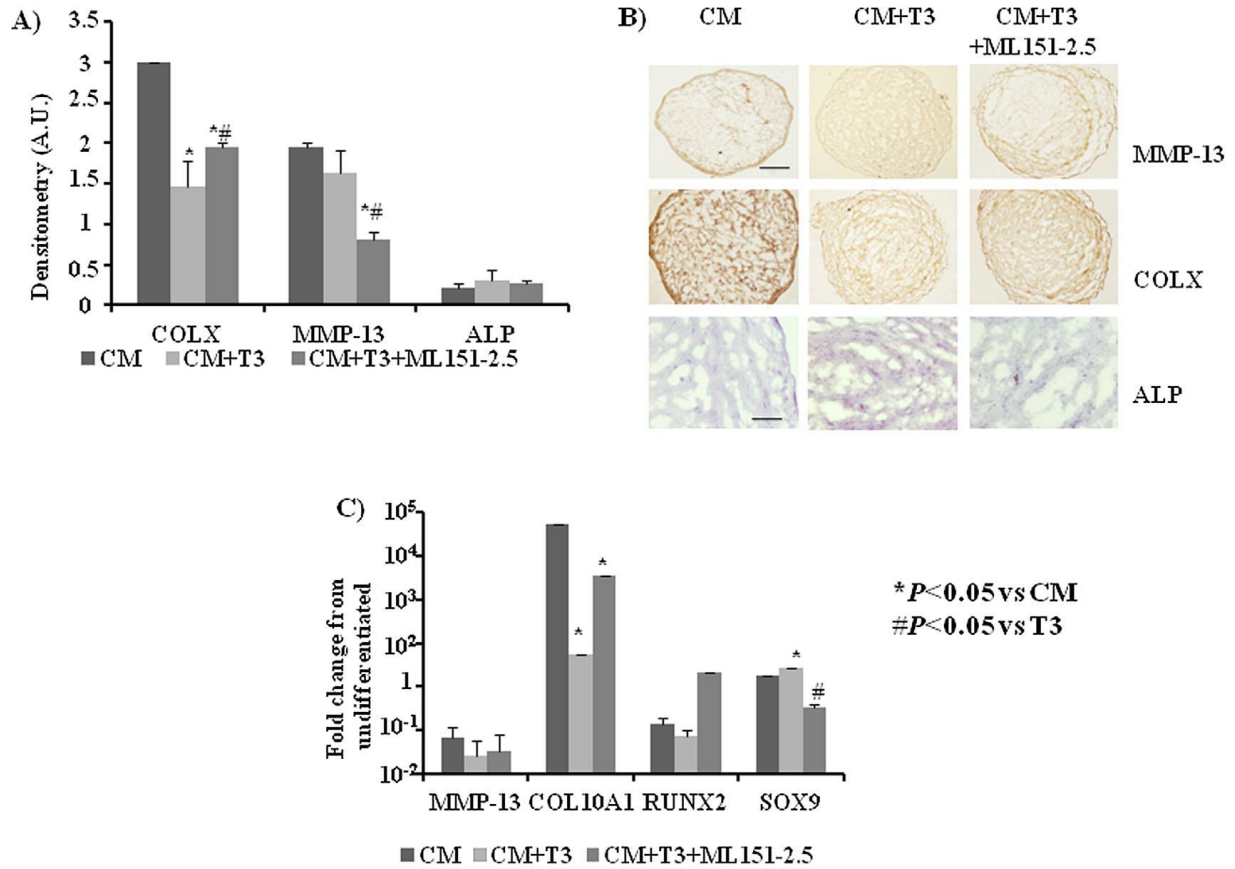


Figura 5.10: Densitometría de la inmunohistoquímica para MMP-13, COLX y ALP en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3 y CM+ 100 ng/ml de T3 + 2.5 μ M de ML151. $P < 0.05$ vs MC (A). Inmunohistoquímica para MMP-13, COLX y ALP en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3 y CM+ 100 ng/ml de T3 + 2.5 μ M de ML151. $P < 0.05$ vs MC (B) Expresión génica de MMP-13, COL10A1, y ALP en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3 y CM+ 100 ng/ml de T3 + 2.5 μ M de ML151. $P < 0.05$ vs MC(C).

5.2.4 Expresión de Wnt durante la condrogénesis

El comportamiento de la familia Wnt en nuestro modelo de condrogénesis fue estudiado por qPCR y western blot. Las expresiones de β -catenina, Frizzled y GSK3- β se vieron aumentadas cuando T3 estaba presente en el medio condrogénico, aunque sólo las de Frizzled y GSK3- β fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Cuando se añadió ML151 al medio, la expresión génica de β -catenina fue estadísticamente inferior ($p < 0,05$) si la comparamos con su expresión en CM sin añadidos (figura 4.11 A). El análisis por western reveló que los niveles de β -catenina, Frizzled y GSK3- β estaban significativamente aumentados ($p < 0,05$) en CM + T3, frente a CM solo; Además, sus niveles disminuyeron a niveles equivalentes a los de esferoides cultivados en CM sin T3 cuando se añadió ML151 a 2,5 μ M al medio CM + T3 (figura 4.11 B). Los resultados obtenidos después de añadir 200 ng/mL de DKK-1 en el CM fueron los esperados, ya que la β -catenina y Frizzled redujeron su expresión génica y GSK3- β la aumentó, respecto a los niveles de expresión encontrados en CM solo (figura 4.11 A y C). En cambio, estos genes invirtieron su expresión cuando T3 estuvo presente en el medio, apareciendo un aumento en los niveles de expresión de los genes β -catenina y Frizzled, así como una disminución en los niveles de GSK3- β ($p < 0,05$) (figura 4.11 C) con respecto a los niveles de los mismos genes en CM + DKK. Estos resultados fueron validados mediante western-blot para β -catenina y Frizzled (figura 4.11 D). El proceso condrogénico se evaluó mediante inmunohistoquímica contra COL2 en esferoides formados durante 14 días en CM + de DKK-1 con o sin T3. Los resultados indicaron que se produjo menos COL2 por esferoide en el caso del cultivo en CM + DKK respecto al cultivo en CM + DKK + T3 (figura 4.11 E).

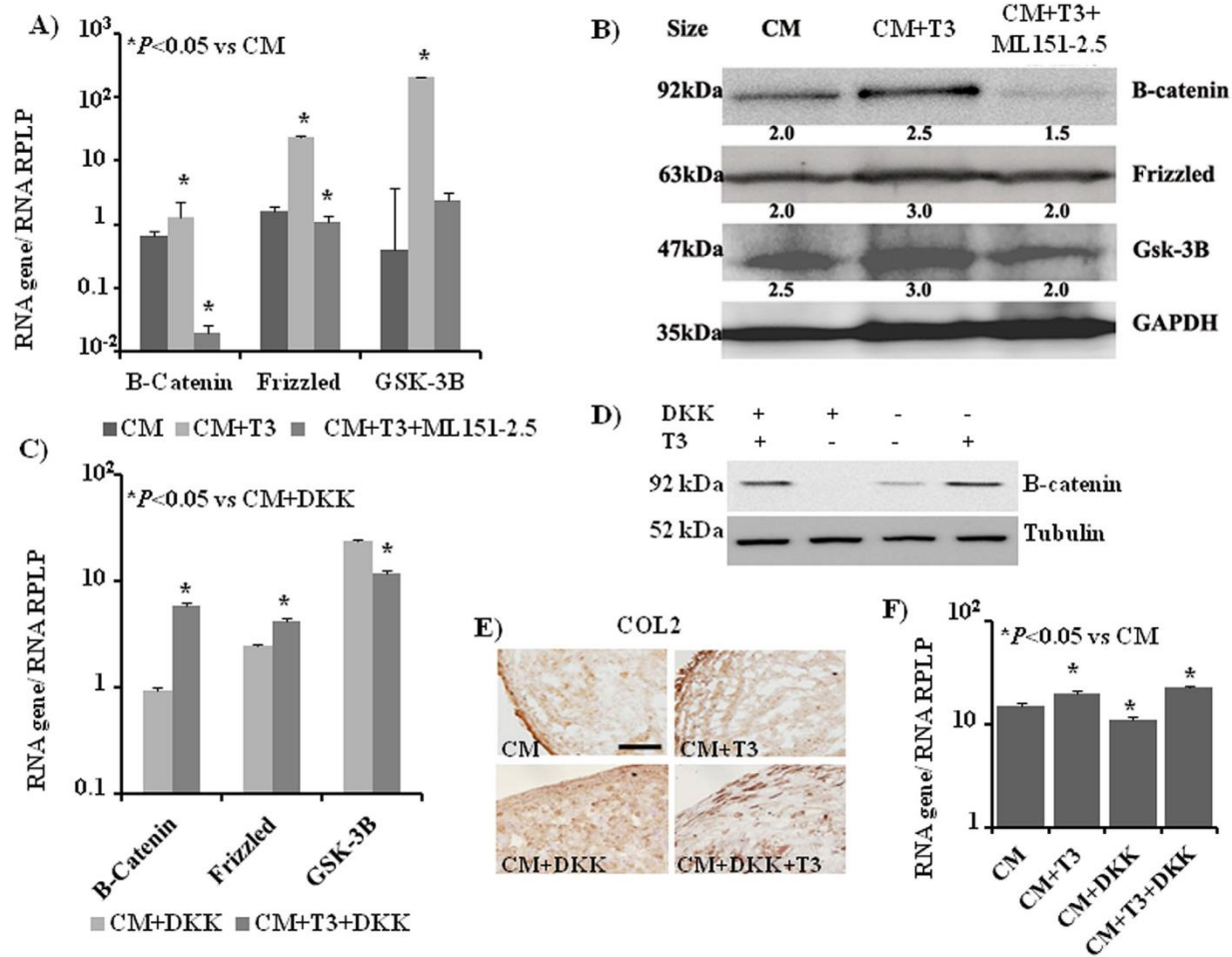


Figura 5.11: Análisis de qPCR para los genes de β -Catenina, Frizzled, y GSK-3 β en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3 y CM+ 100 ng/ml de T3 + 2.5 μ M de ML151. $P < 0.05$ vs MC (A) (B) Análisis de wester blot para las proteínas β -catenina, Frizzled y GSK-3 β en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3 y CM+ 100 ng/ml de T3 + 2.5 μ M de ML151. GAPDH utilizado como control de carga (B). qPCR para los genes de β -Catenina, Frizzled, y GSK-3 β en esferoides formados tras 14 días en MC + 200 ng/mL de DKK-1 (CM + DKK) y en MC + 100 ng/mL de T3 + 200 ng/mL de DKK-1 (MC + T3 + DKK). $P < 0.05$ vs (C). Análisis de western-blot para la proteína β -Catenina en esferoides formados tras 14 días en MC con las distintas combinaciones posibles de T3 (100 ng/mL) y DKK-1 (200 ng/mL). Tubulina utilizada como control de carga (D). Inmunohistoquímica de COL2 en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3, MC + 200 ng/ml de DKK-1 (CM + DKK) y en MC + 100 ng/ml de T3 + 200 ng/ml de DKK-1 (MC + T3 + DKK). (barra= 2mm) (E). Análisis por qPCR de la expresión de COL2A1 en esferoides formados tras 14 días en MC, CM+ 100 ng/ml de T3, MC + 200 ng/ml de DKK-1 (CM + DKK) y en MC + 100 ng/ml de T3 + 200 ng/ml de DKK-1 (MC + T3 + DKK). $P < 0.05$ vs MC (F).

5.3 GENERACIÓN DE CAS Y CMMs RESISTENTES A LA IL-1B MEDIANTE LA TÉCNICA CRISPR-CAS

5.3.1 Caracterización de las células 3A6

Se realizó una caracterización mediante citometría de flujo de las CMMs inmortalizadas (iCMMs) sometidas a la delección para los clásicos marcadores positivos y negativos de este tipo de células. Se compararon los resultados con los obtenidos de células control. No se encontraron diferencias significativas (figura 4.12 A). Así mismo se realizó una qPCR para los genes marcadores de pluripotencia NANOG y OCT4. Se compararon los resultados con los obtenidos de células control y no se encontraron diferencias significativas (figura 4.12 B). Podemos deducir que su potencialidad está intacta después de la delección.

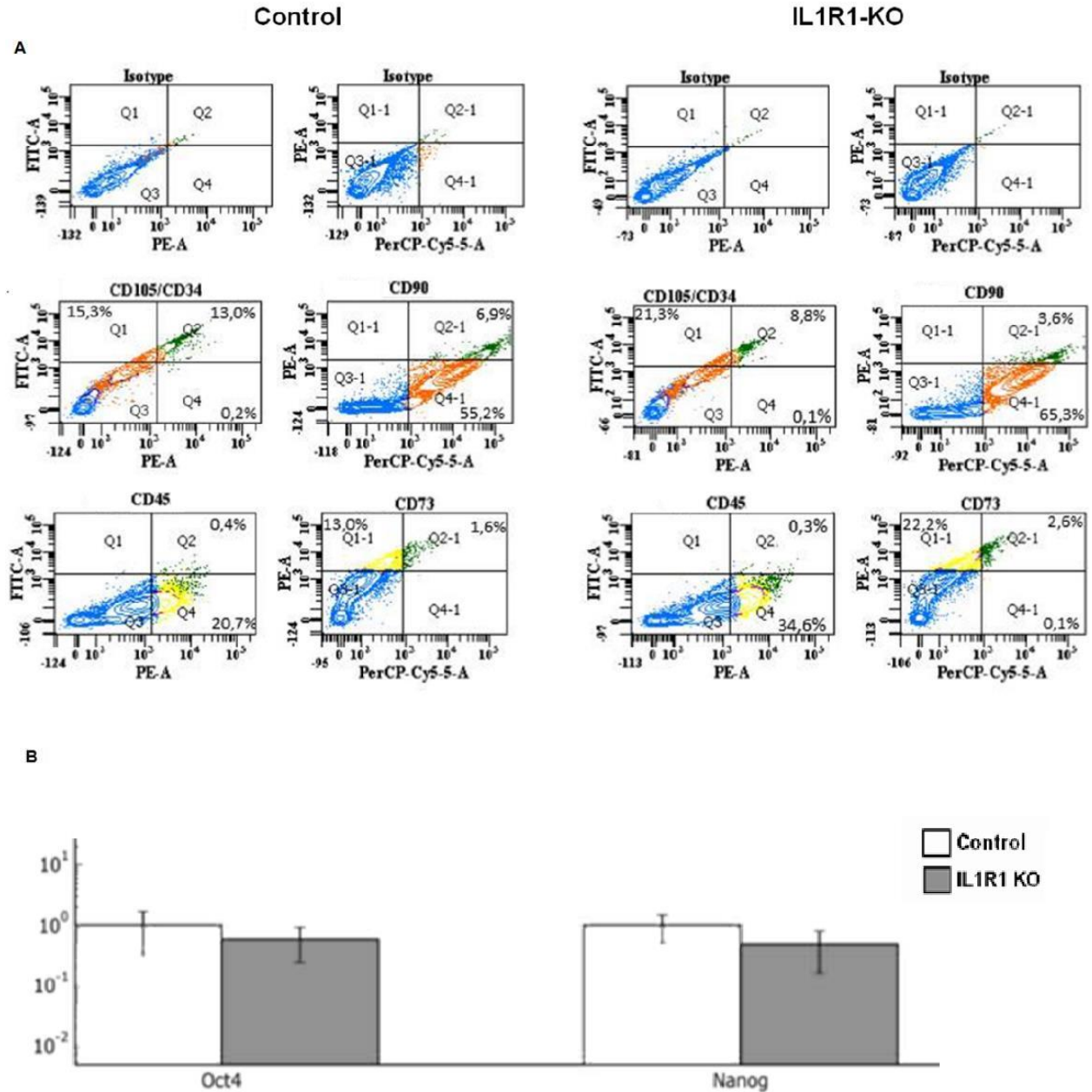


Figura 5.12: Caracterización por citometría de flujo de las iCMM control y knockout. iCMM control: CD105(FITC-A): 28,3%; CD34(PE-A): 13,2%; CD90(PerCP-Cy5-5-A):62,1%; CD45(FITC-A); 0,4%; CD90(PE-A): 14,6%. iCMM KO: CD105(FITC-A): 30,1%; CD34(PE-A): 8,9%; CD90(PerCP-Cy5-5-A):68,9%; CD45(FITC-A): 0,3%; CD90(PE-A): 24,8% (A). Expresión comparativa de los marcadores de pluripotencia OCT4 y NANOG. No existen diferencias significativas de expresión entre las iCMM control y las knockout (B).

5.3.2 Eficiencia de la delección del receptor IL1R1

Se realizó un análisis de qPCR para el receptor IL1R1 tanto en las células inmortalizadas 3A6 (figura 4.13 B) como en los 3 donantes de cartílago (figura 4.13 A). El sistema de edición del genoma de CRISPR-Cas dirigido a IL1R1 condujo a una reducción significativa de IL1R1 a nivel de ARNm.

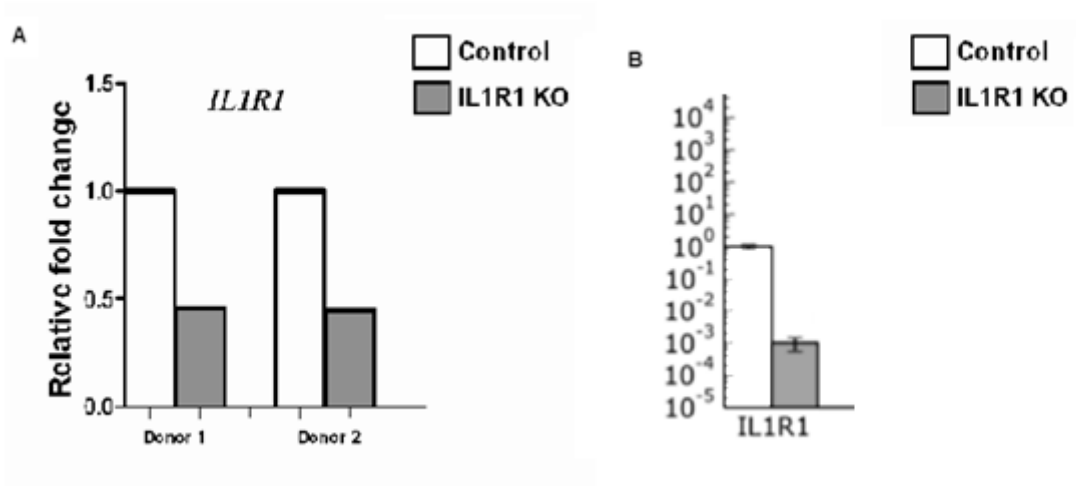


Figura 5.13: qPCR que muestra una reducción significativa de la expresión de *IL1R1* tras el knockout (*IL1R1-KO*) en los dos donantes de CAs (A) y las células iCMMs (B) KO frente a las células control.

5.3.3 Respuesta inflamatoria

Primero se estudió la respuesta inflamatoria en monocapa tras 24 horas de estimulación. Al añadir rIL-1 β las células control desencadena el aumento de la expresión de IL-1 β , IL6 y IL8, tanto en CAs (figura 4.14 A) como en iCMMs (figura 4.14 B). En el caso de las células delecionadas con CRISPR, dicha respuesta fue inexistente o significativamente reducida. La adición de TNF aumentó de la expresión de los mismos genes en ambas células, demostrando que la estimulación de citoquinas por TNF α es independiente de la señalización IL-1 β .

También se estudió la respuesta inflamatoria después de 10 días de condrogénesis en discos de alginato para ambos tipos celulares. La qPCR muestra como la adición de rIL-1 β en las células control desencadena de nuevo el aumento de la expresión de IL-1 β , IL6 y IL8 en CAs (figura 4.15 A) y en CMMs inmortalizadas (figura 4.15 B) viéndose significativamente reducida en el caso de las células KO.

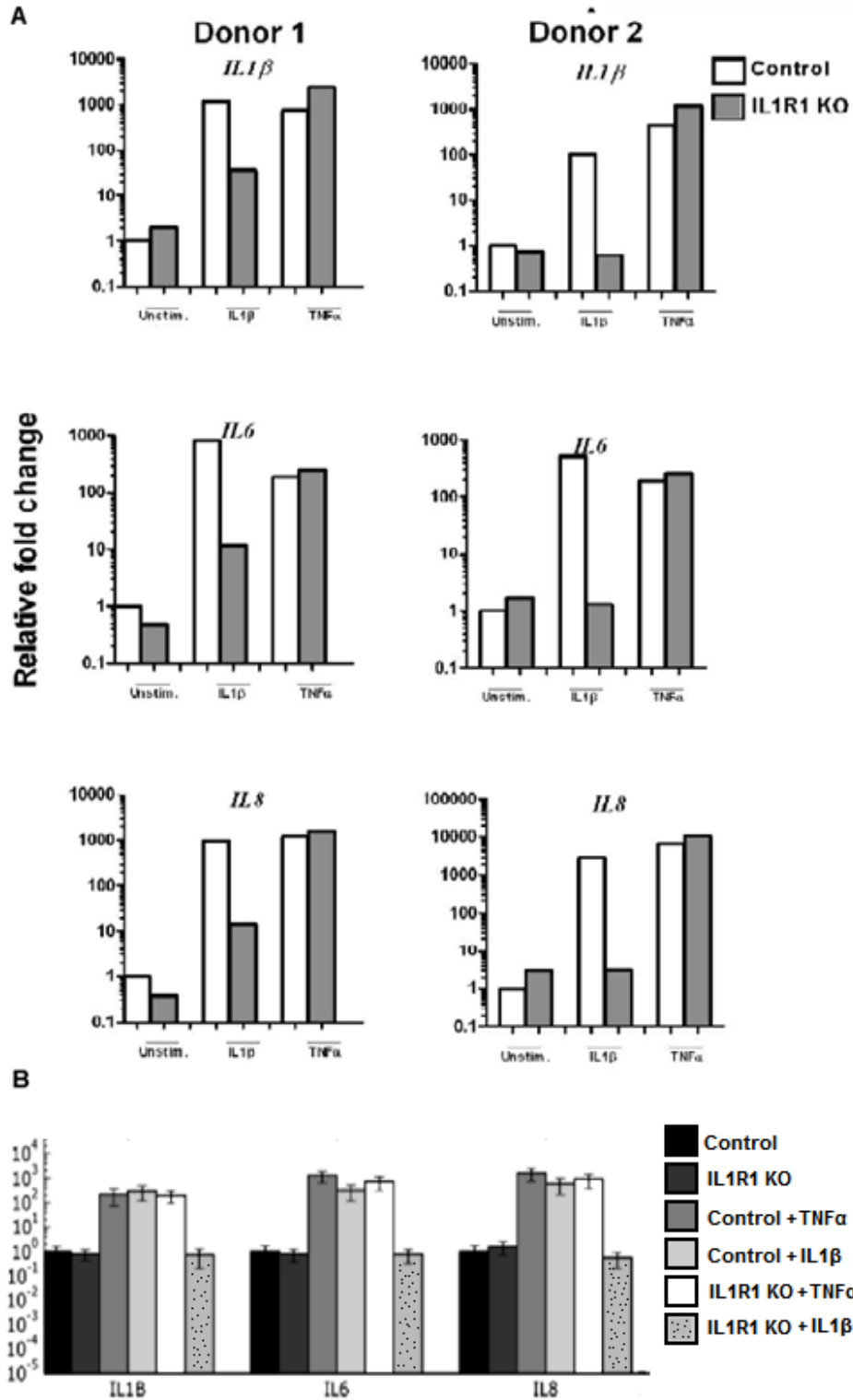


Figura 5.14 Expresión de genes inflamatorios tras la estimulación durante 24 horas con IL-1 β y TNF α en mono-capa, para los dos donantes de Cas (A). Expresión de genes inflamatorios tras la estimulación durante 24 horas con IL-1 β y TNF α en mono-capa en iCMMs (B).

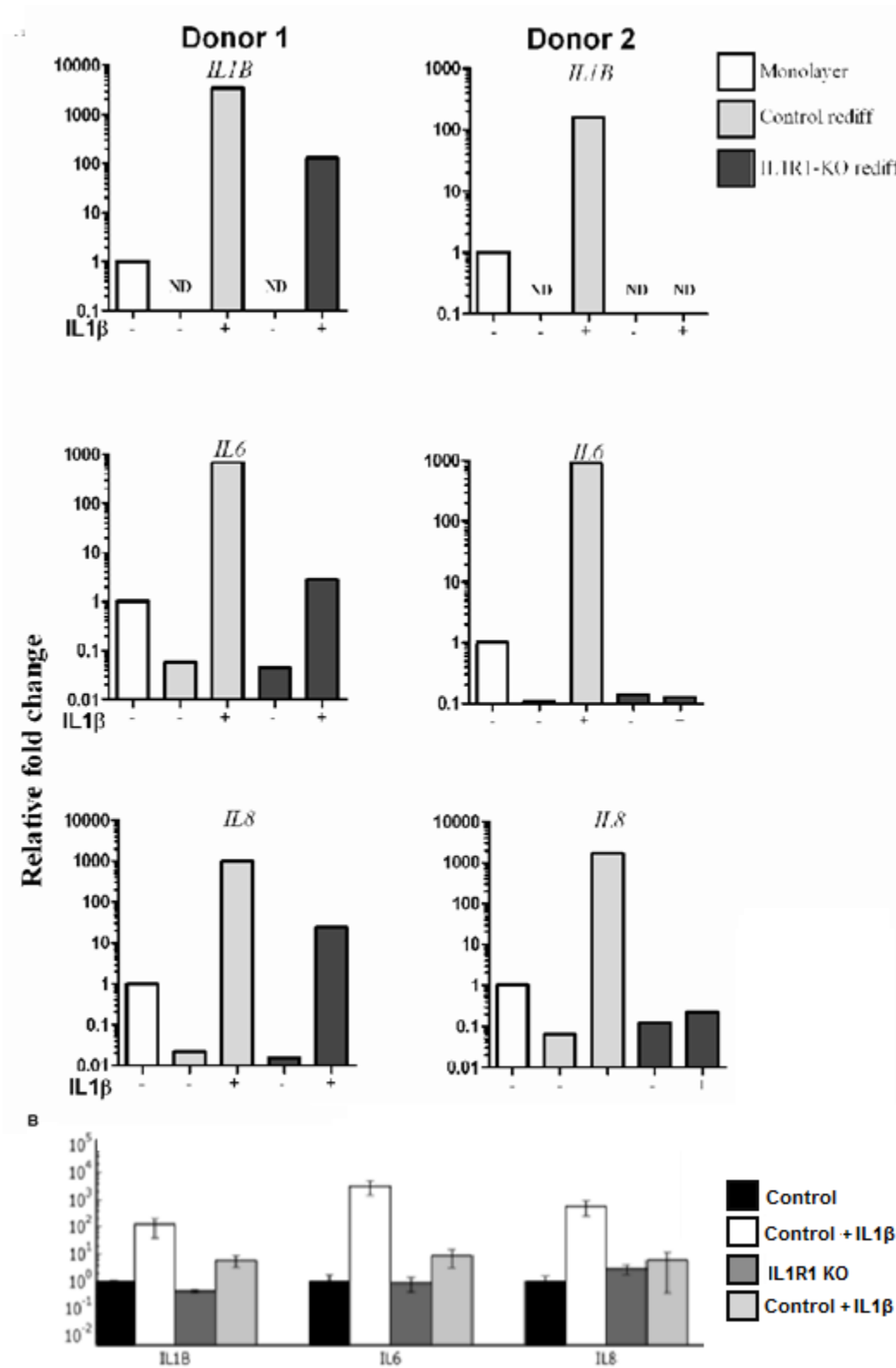


Figura 5.15 : Expresión de genes inflamatorios tras la diferenciación condrogénica en discos de alginato en presencia de IL-1 β y TNF α para los dos donantes de CAs (A). Expresión de genes inflamatorios tras la diferenciación condrogénica en discos de alginato en presencia de IL-1 β y TNF α en iCMMs (B).

5.3.4 Condrogénesis

El impacto de IL-1 β en la condrogénesis se muestra claramente en la rediferenciación y diferenciación de CAs y CMM respectivamente (figura 4.16 A y B). Un significativo aumento de ACAN y COL2A1 medido por qPCR indica que, en presencia de rIL-1 β , sólo las células IL1R1-knockout se rediferencian/ diferencian. No se observan variaciones significativas en la expresión de SOX9 a nivel de ARN. El análisis de western-blot muestran resultados similares para ACAN, pero esta vez sí que podemos ver diferencias en la expresión de SOX9 (figura 4.17). En particular, los niveles de ARNm de SOX9 permanecen sin cambios en presencia de rIL-1 β , pero están casi eliminados en los niveles de proteína. Como añadido se realizó un análisis de qPCR en CMMs inmortalizadas para los genes marcadores de OA MMP13 y ADAMTS5 (figura 4.18) Se observa como el silenciamiento de IL1R1 inhibe la expresión de enzimas encargados de la degradación de matriz extracelular inducida por IL-1 β .

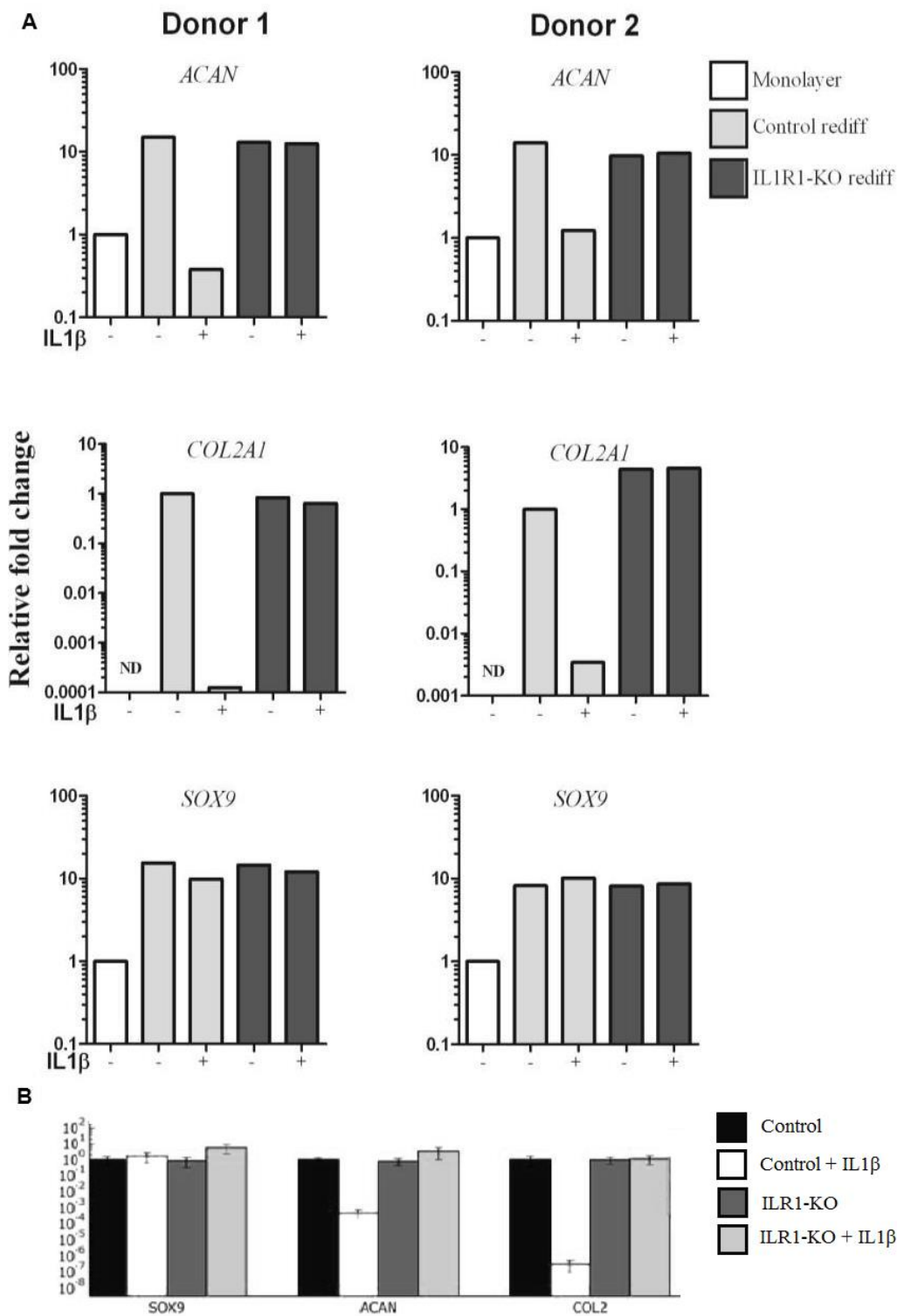


Figura 5.16 Expresión de genes marcadores de condrogénesis en CAs (A) y en iCMMs (B) tras 10 días en discos de alginato y medio condrogénico. El incremento en la expresión de agregcano (ACAN) y colágeno tipo dos (COL2) en las células knockout frente a las control nos muestran que únicamente las primeras son capaces de diferenciarse correctamente con IL-1 β en el medio. No se observan variaciones significativas en la expresión de SOX9 a nivel de ARN.

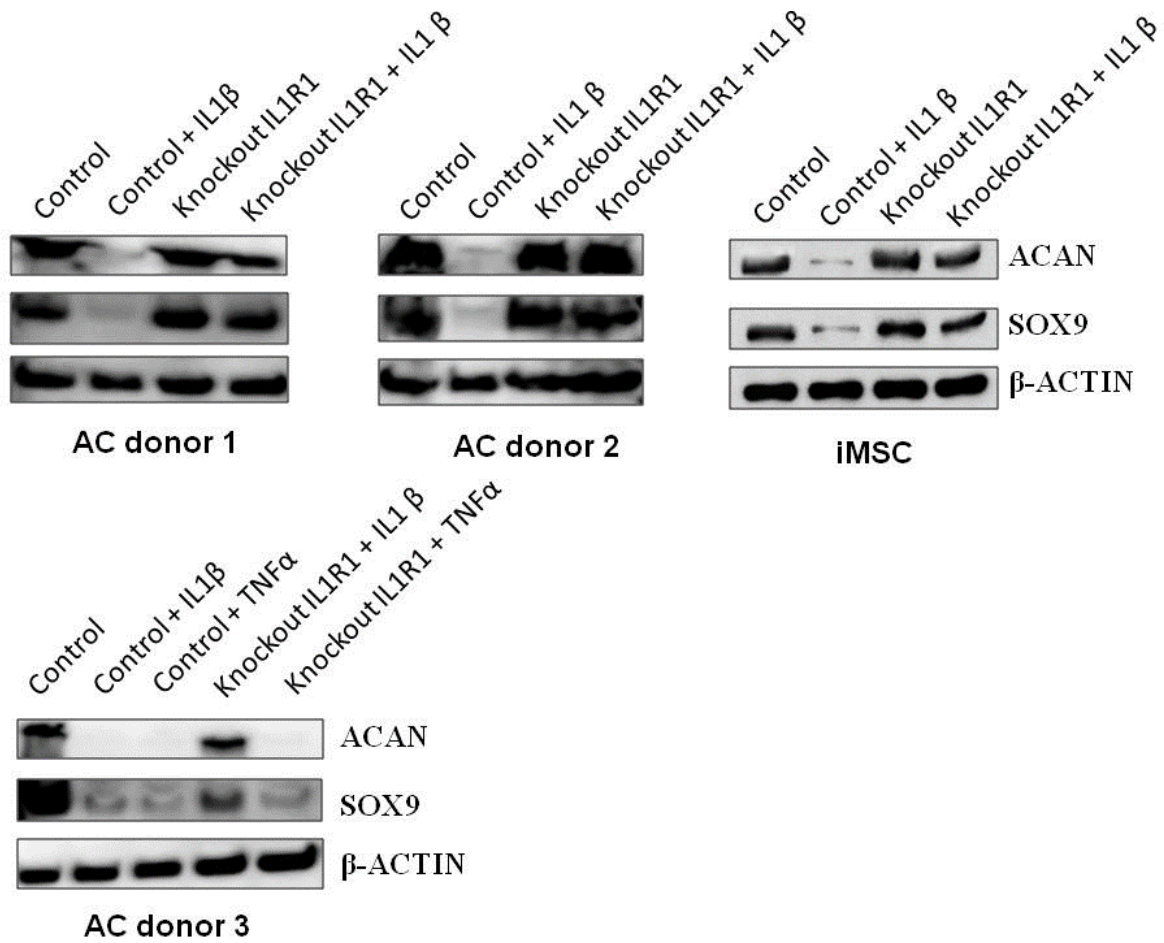


Figura 5.17: Análisis por western-blot de hAC (3 donantes) tras 10 días en condrogénesis y de iCMM tras 14 días en condrogénesis. De nuevo se observa un incremento en la expresión de ACAN y COL2. Además, a nivel proteico observamos también un incremento de los niveles de SOX9 en células IL1R1-KO frente a las células control en presencia de IL1 β .

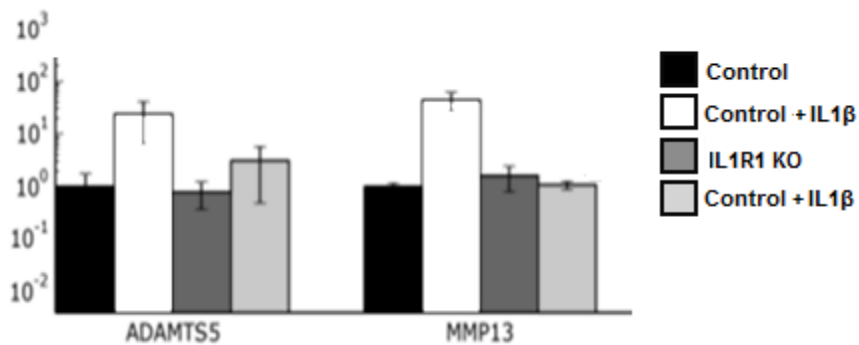


Figura 5.18 : Real-time PCR para las enzimas ADAMTSS y MMP13 en iCMM tras 10 días de condrogénesis. Dichas enzimas se muestran sobre-expresados en células expuestas a IL-1 β , sin embargo, en las células KO los niveles son significativamente más bajos, en especial en el caso de MMP13.

5.4 ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN DE CMMs EN UN MODELO ANIMAL PRIMATE NO HUMANO

5.4.1 Aislamiento, caracterización y marcaje de CD105⁺-CMMs

Antes de la separación, el porcentaje de células positivas para CD105 en la población CMMs de membrana sinovial estaba entre 15-20%, aumentando al 95% tras la separación. El análisis por FACS después de la separación utilizando el FACS Aria mostró que la metodología fue de 95% de precisión (figura 4.19 A). La caracterización fenotípica no mostró niveles de expresión para CD45 y CD34 y sí un alto porcentaje de CD105 (95%), CD90 (99%) y CD44 (80%) (figura 4.19 B). La efectividad del marcaje con Dil y DiO fue verificada mediante citometría de flujo en un FACScalibur, obteniendo el 92% de las células positivas para Dil y 95% de las células positivas para DiO (figura 4.19 C). Todas las GFP-CD105⁺CMMs inyectadas fueron positivas para GFP (figura 4.24 A).

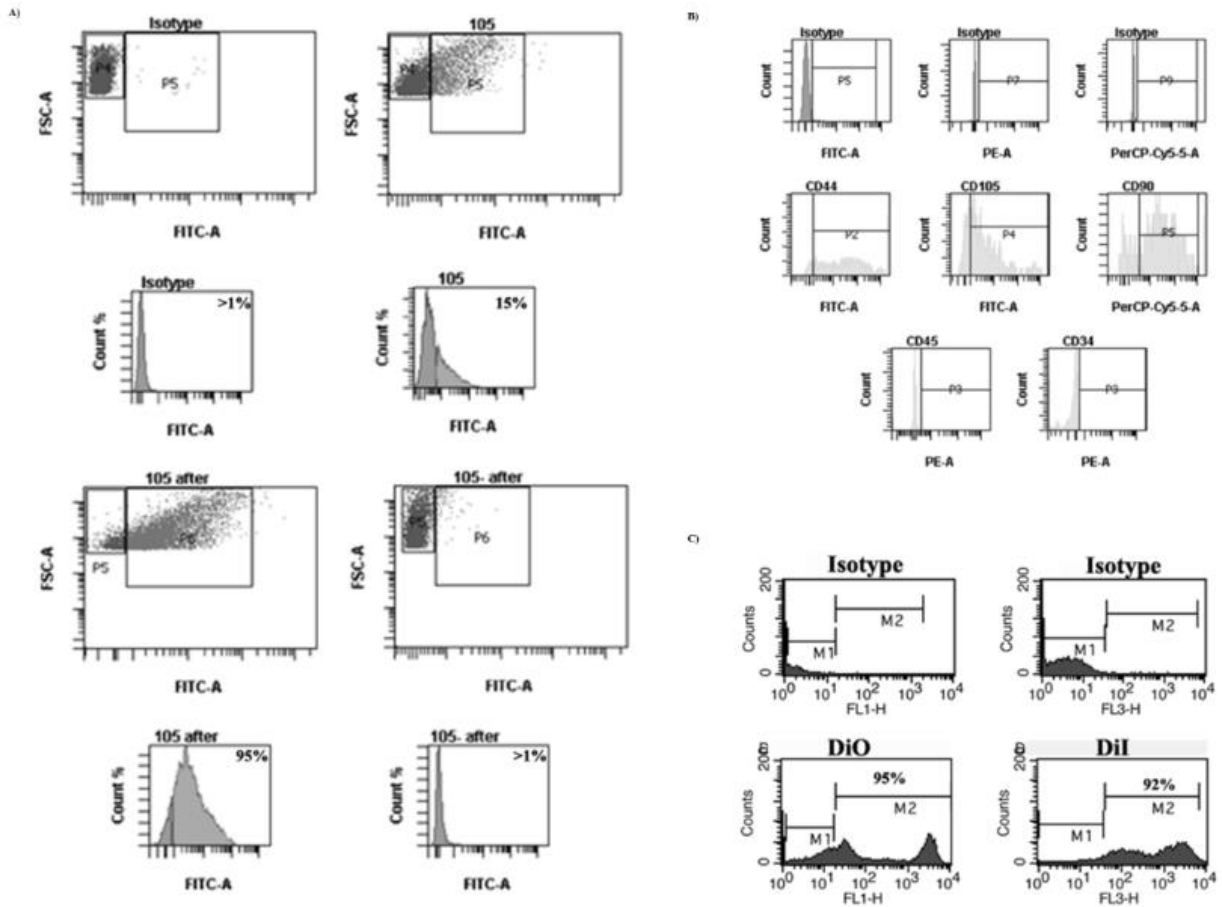


Figura 5.19 Separación de CD105⁺-CMMs mediante fluorescencia (FACS) (A). Caracterización mediante análisis de citometría de flujo de la población CD105⁺-CMM usando marcadores CMM, CD44, CD105, CD90 y marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 (B). Citometría de flujo de la subpoblación de CD105⁺-CMMs marcada con oxcarbocianina (DiO) y octadecil (C18) indocarbocianina (DiI), respectivamente (C).

5.4.2 Análisis inmunohistoquímico e inmunofluorescencia

Todos los órganos examinados mediante el análisis histológico de tinción de hematoxilina-eosina presentaron una morfología normal (figura 4.20 A). No se encontraron Dil-CD105⁺-CMMs ni DiO-CD105⁺-CMMs inyectadas intra-articularmente (IA) en corazón, músculo esquelético o músculo liso (figura 4.19 E). Sólo se detectaron menos del 1% de DiO-CD105⁺-CMM y GFP-CD105⁺-CMM inyectadas de manera intravenosa (IV) en ganglio, bazo, pulmón, riñón e hígado (Fig. 4.20 B,C). El análisis bioquímico y hematológico de los animales antes del sacrificio reveló que estaban sanos y que sus funciones metabólicas funcionaban correctamente (Tabla 4.2 y 4.3). El análisis de microscopía de inmunofluorescencia usando un microscopio Olympus nomostró Dil-CD105⁺-CMMs, ni GFP-CD105 + -CMM ni DiO-CD105⁺-CMMs en las rodillas sanas de los animales inyectados con células marcadas (figura 4.20 D). La membrana sinovial de la rodilla lesionada estaba hipertrofiada y se observó la destrucción del cartílago y la falta de proteoglicanos (figura. 4.21 A derecha). Además, no se observó hipertrofia en la membrana sinovial de la rodilla derecha (rodilla sana) donde se observó una estructura normal del cartílago (figura 4.21 B izquierda). El análisis macroscópico visual mostró falta de cartílago en la rodilla lesionada (figura 4.21 C derecha) y no se observó daño alguno en la rodilla sana (figura 4.21 C izquierda). Células Dil-CD105⁺-CMMs y DiO-CD105⁺-CMMs inyectados vía IA, fueron encontradas en el menisco medial y lateral, el músculo esquelético (vastusmedialis), la membrana sinovial, los ligamentos cruzados y en la rótula de la rodilla articular lesionada (Figura 4.21 C, D). Menos del 50% de las células inyectadas se encontraron en la rodilla lesionada y menos del 1% de las células inyectadas se encontraron en la rodilla sana (figura 4.20 D).

Se realizó un ensayo de co-localización por inmunofluorescencia para CD105, CD44 y CD90 en células DiO-CD105⁺-CMMs inyectadas intra-articularmente. Los resultados indicaron que la rótula, la membrana sinovial y los ligamentos cruzados de la rodilla lesionada de los animales inyectados IV con DiO-CD105⁺-CMMs eran también positivos para los anticuerpos CD90 y CD44 (figura 4.22 A, B). Además, se realizó un análisis densitométrico entre animales inyectados IA frente a IV con Dio-CD105⁺-CMM (Figura 4.22 B) observando que no se encontraron diferencias, independientemente de la forma de inyección. Se observó también un incremento estadísticamente significativo de células nativas positivas para CD44, CD90 y CD105 en la rodilla lesionada frente a la sana (figura 4.21 D, E). En el caso de los animales inyectados con GFP-CD105⁺-CMM vía IV los resultados fueron similares (figura 4.24 C, D).

Se detectaron mediante análisis de inmunofluorescencia para CD68 y SDF-1, señales de los mismos en los ligamentos sinoviales y cruzados de la rodilla lesionada en los animales inyectados IV con DiO-CD105⁺-CMMs o GFP-CD105⁺-CMMs. Los resultados indicaron que las células CD68 no co-localizan con las células positivas para DiO o GFP (figura 4.23 A). Sólo se encontraron células positivas SDF-1 en tejidos de la rodilla lesionada y algunas de ellas co-localizaron con DiO-CD105⁺-CMMs (figura 4.23 B).

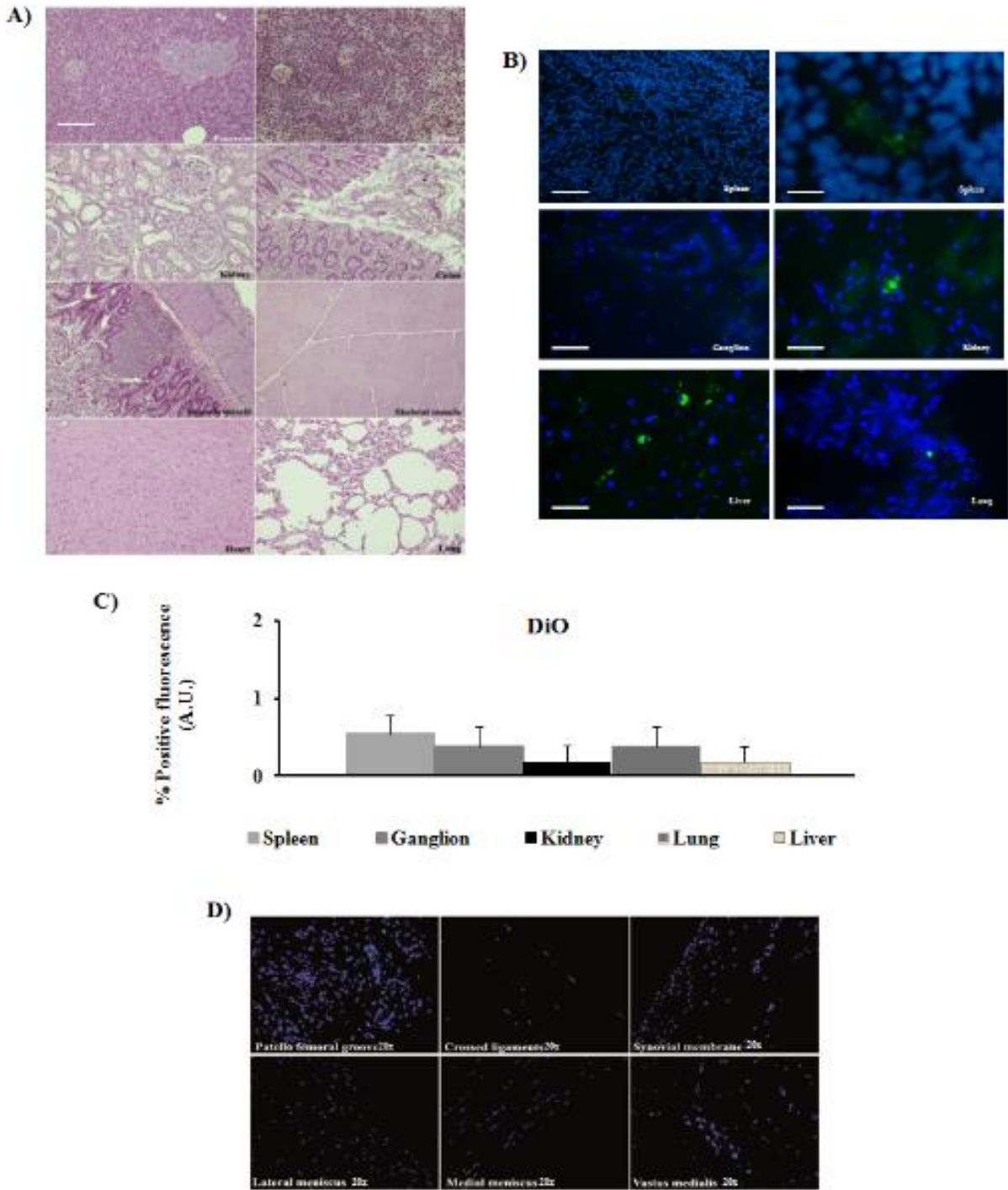


Figura 5.20 : Aspecto histológico del páncreas, bazo, riñón, colon, músculo liso y esquelético, corazón y pulmón de los animales sacrificados después de inyecciones de CMM. Se mostraron secciones a 4 μ m en parafina teñidas con hematoxilina-eosina (H-E). Todas las imágenes tienen la misma ampliación, la barra representa 20 μ m (A). Análisis de inmunofluorescencia de bazo, ganglio, riñón, hígado y pulmón de animales los escarificados después de las inyecciones CMMs. Todas las imágenes tienen la misma ampliación, la barra representa 20 μ m excepto el bazo a la derecha que representa 10 μ m (B). El análisis cuantitativo para determinar los niveles de fluorescencia de DIO frente a la señal DAPI. Se realizó mediante el software AnalySIS Image a partir de tejidos donde se encontraron DIO- CD105⁺-CMMs (C). Análisis de inmunofluorescencia de la rodilla derecha sana de los animales sacrificados después de las inyecciones de CMMs. Todas las imágenes tienen la misma ampliación, la barra representa 20 μ m (D).

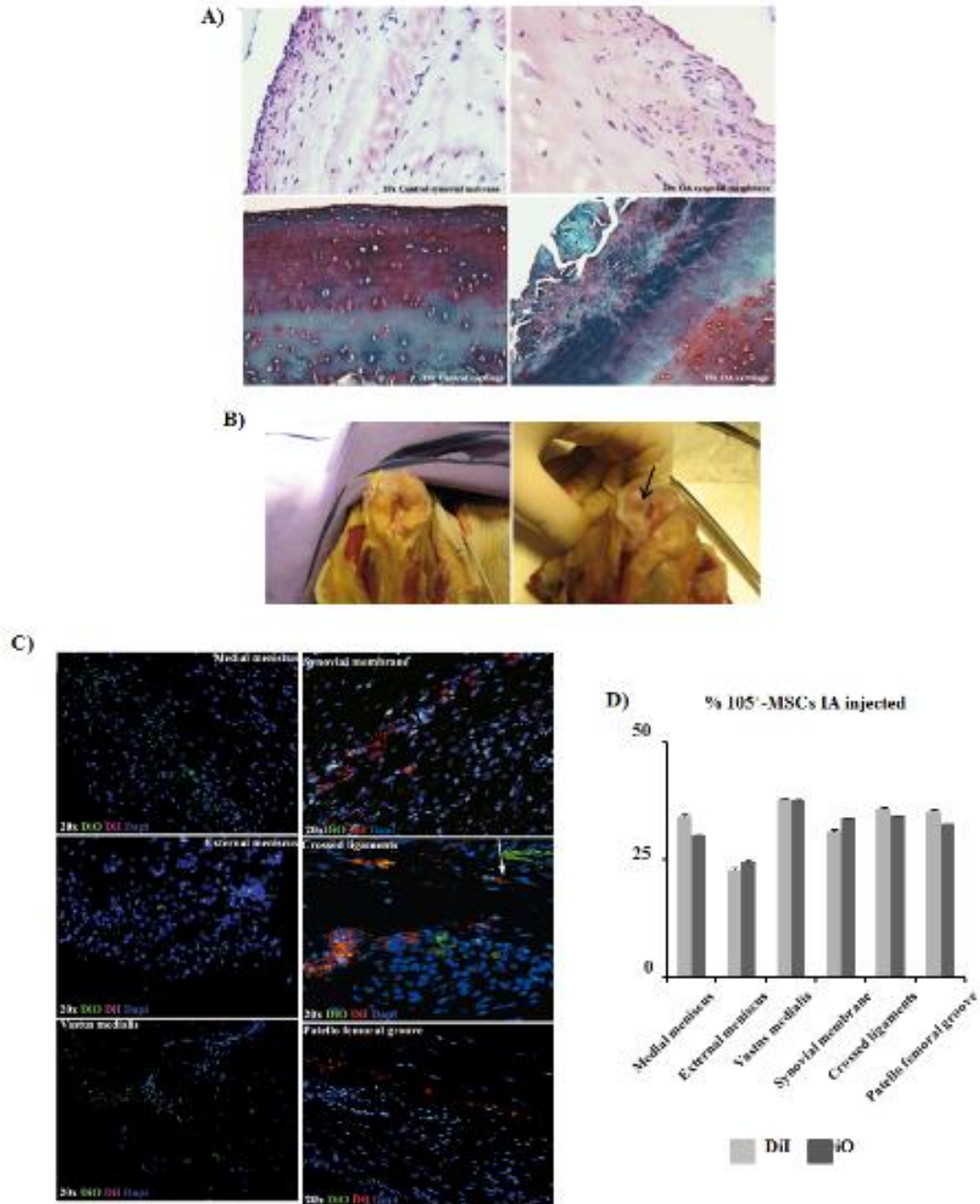


Figura 5.21 : Estudio microscópico de las rodillas sanas y lesionadas de de los animales después de ser sacrificados. Se muestran secciones de membrana sinovial y cartílago. Apariencia histológica de los tejidos a 4 μ m en parafina. Membrana sinovial teñida con hematoxilina-eosina (amplificación 20x) de la rodilla sana (izquierda) y la rodilla lesionada (derecha). Cartílago teñido con safranina O (aumento 10x) de la rodilla sana y la rodilla lesionada (A). Estudio macroscópico los cóndilos femorales sanos (izquierda) y lesionados (derecha). La flecha indica el pnto de lesión. (B). Análisis de inmunofluorescencia de la rótula, los ligamentos cruzados, la membrana sinovial, el menisco interno, el menisco externo y el músculo de la rodilla (vasto medial) de los animales inyectados intra-articularmente con DiO-CD105⁺-CMMs y con DiI-CD105⁺-CMMs por vía intravenosa. Todas las secciones son de la rodilla lesionada (ampliación 20x (C). Histograma generado mediante AnalySIS Image Processing que muestra el porcentaje de señal para DiO y DiI en los animales inyectados intra-articularmente (D).

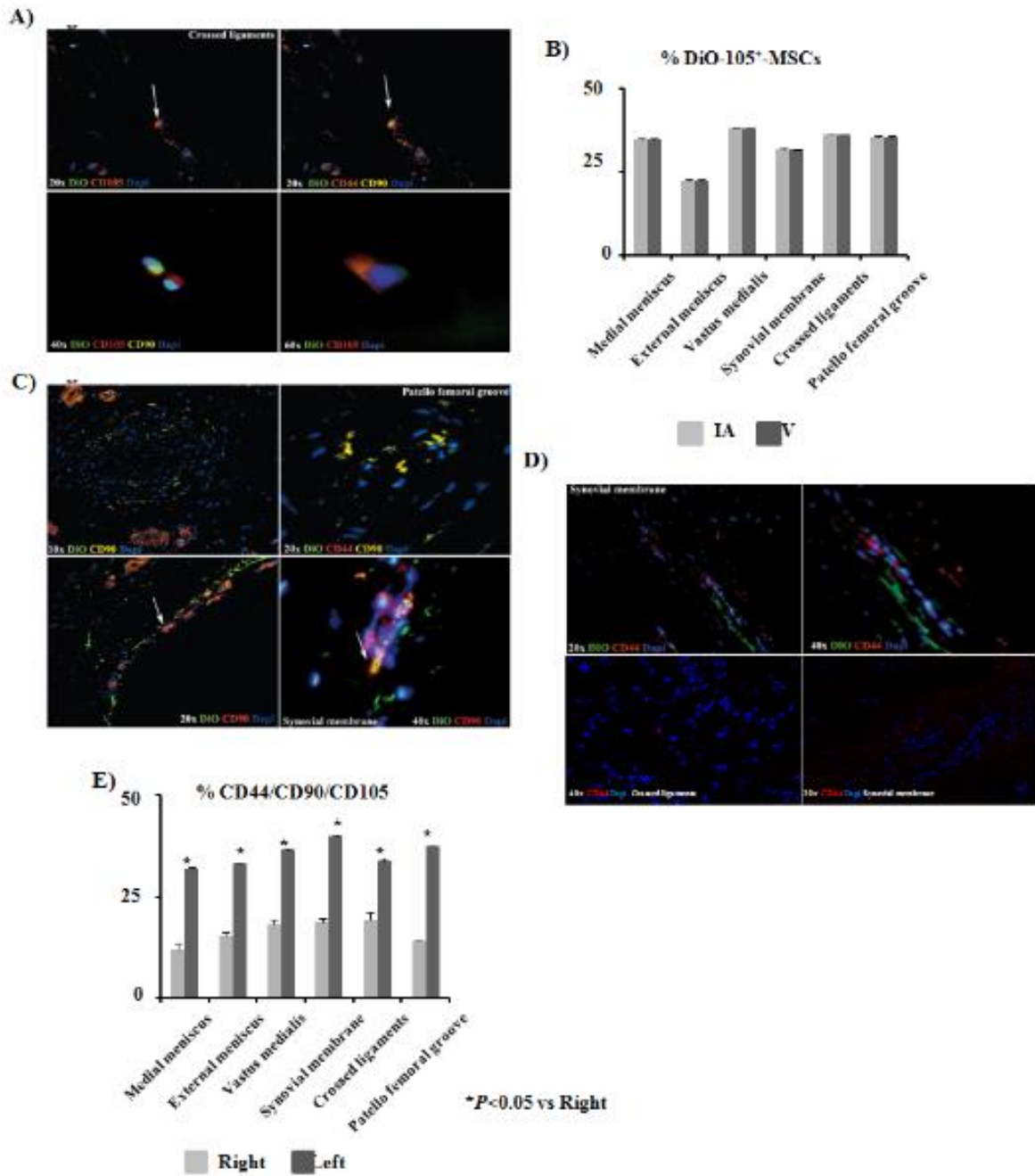


Figura 5.22 : Análisis de inmunofluorescencia en cortes de la rótula y membrana sinovial de la rodilla lesionada a diferentes aumentos (10x, 20x y 40x) de los animales inyectados IA con DiO-CD105 + -CMMs. Las flechas indican los puntos de co-localización para los anticuerpos CD105, CD44 y CD90 (A). Histograma que muestra el porcentaje de señal positiva para DiO normalizada con la señal DAPI en animales inyectados IA frente a animales inyectados IV (B). Co-localización de DiO-CD105⁺-CMMs con anticuerpos contra CD105, CD44 y CD90 en los ligamentos cruzados de la rodilla lesionada en animales inyectados IV (20x, 40x y 60x). Las flechas indican la colocalización con CD44 y CD90 (C). Análisis de inmunofluorescencia de secciones de membrana sinovial a 20x y 40x de la rodilla sana (arriba) y la rodilla lesionada (abajo) (C). E) Histograma generado mediante mediante AnalySIS Image Processing que muestra el porcentaje de señal positiva para CD44, CD90 y CD105 en animales inyectados IA con DiO-CD105⁺-CMMs. $P < 0,05$ (D).

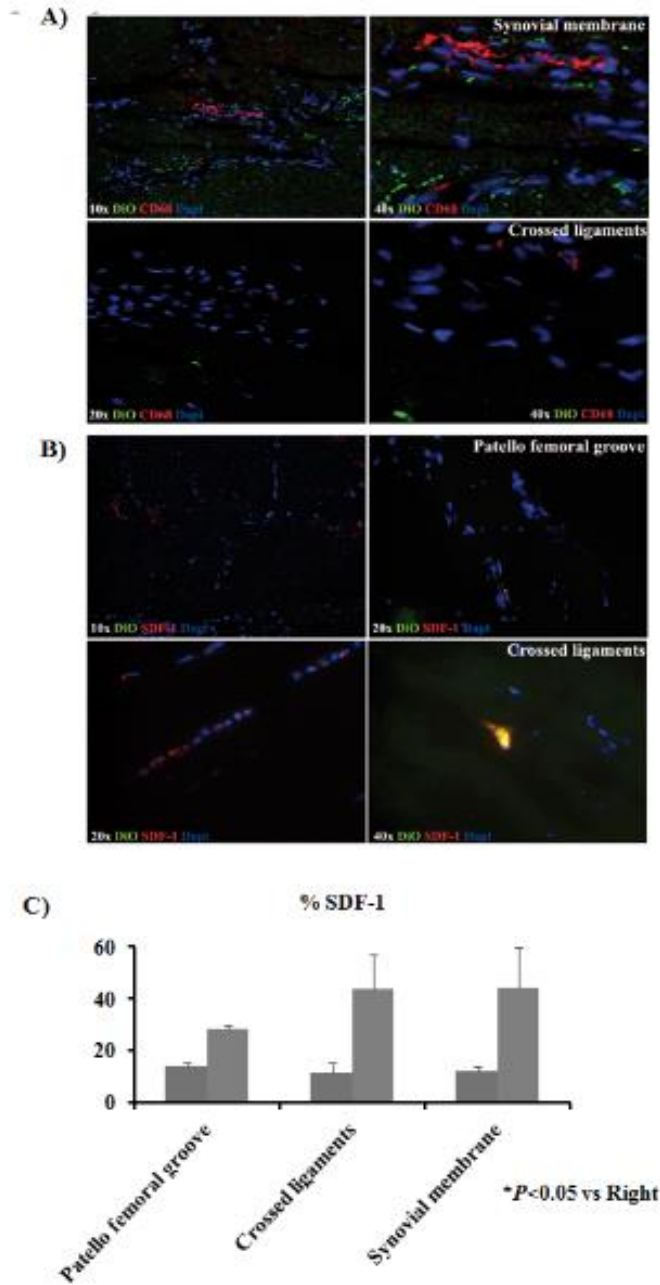


Figura 5.23 : Análisis de inmunofluorescencia para CD68 de cortes de membrana sinovial y ligamento cruzado de los animales inyectados con células DiO-CD105⁺-CMMs IV. Todas las secciones son de la rodilla (10x, 20x y 40x) (A). B) Análisis de inmunofluorescencia para SDF-1 de secciones de membrana sinovial y ligamento cruzado en animales inyectados con células DiO-CD105⁺-CMMs IV. Todas las secciones son de la rodilla lesionada (10x, 20x y 40x) (B). Histograma generado por AnalySIS Image Processing que muestra el porcentaje de señal positiva para SDF-1 en secciones de rodilla de animales inyectados con DiO-CD105⁺-CMMs IA y animales del grupo inyectado con GFP-CD105⁺-CMMs IV. P< 0,05 (C).

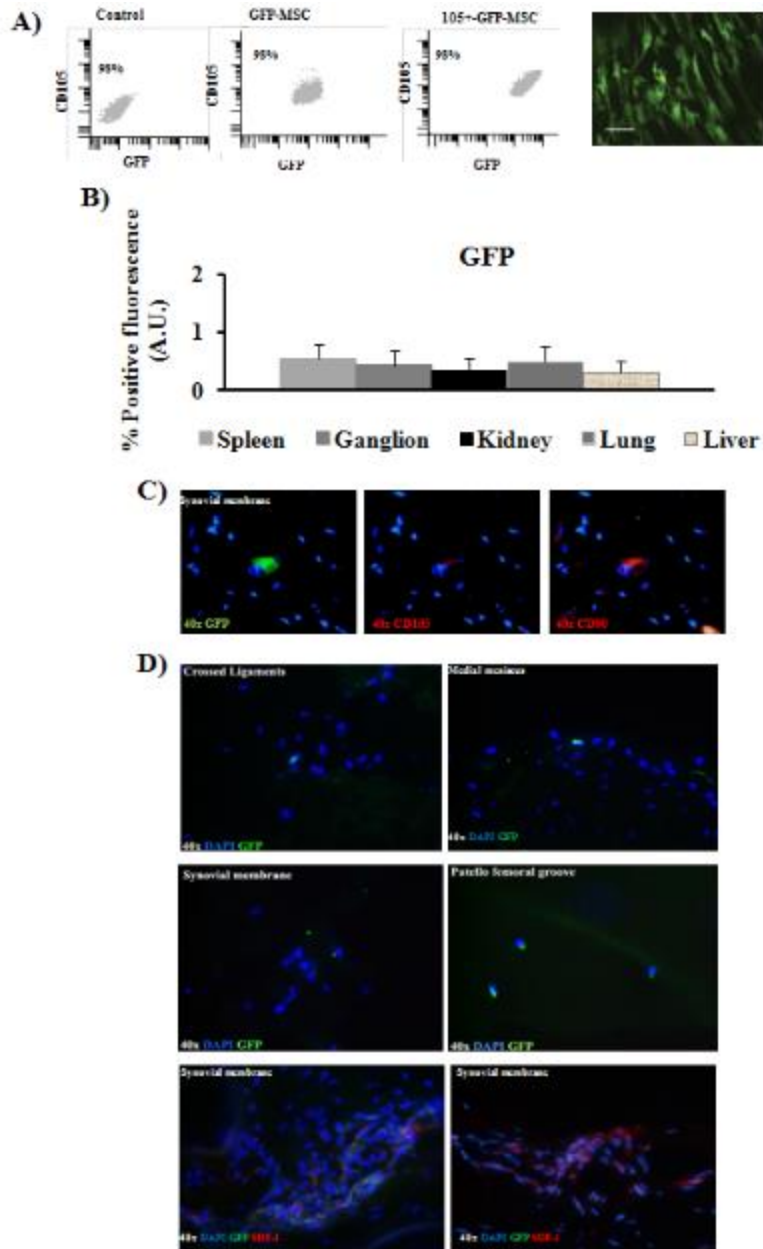


Figura 5.24 : Caracterización de las GFP-CD105⁺-CMMs utilizados para validar los datos anteriores utilizando DiO-CD105⁺-CMMs y Dil-CD105⁺-CMMs. Análisis mediante FACS de las poblaciones CMMs (a la izquierda), GFP-CMMs (en el medio) y CD105⁺-CMMs de membrana sinovial (a la derecha). La imagen muestra de GFP- CD105⁺-CMMs en placa antes de la inyección (Barra=20 µm) (A). Análisis cuantitativo que se realizó mediante Analysis Image de los órganos donde se encontraron GFP- CD105⁺-CMMs que muestra los niveles de fluorescencia GFP frente a la señal DAPI (B). Co-localización de GFP- CD105⁺-CMMs con anticuerpos contra CD105 y CD90 en secciones de membrana sinovial de la rodilla lesionada en animales inyectado con GFP-CD105⁺-CMMs IV. (40x) (C). Imágenes de GFP-CD105⁺-CMMs en el ligamento cruzado, membrana sinovial, menisco medial y rótula e inmunofluorescencia para SDF-1 de secciones de membrana sinovial en animales inyectados con GFP-CD105⁺-CMMs IV. (40x) (D).

Tabla 5.1. Grupos de animals en tratamiento. Inyección intra-articular (IA), inyección intravenosa (IV).

Groups	Animals (N)	IA	IV
1	2	DiO-105+-MSCs	--
2	2	DiI-105+-MSCs	DiO-105+-MSCs
3	2	DiI-105+-MSCs	GFP-105+-MSCs
4	3	--	GFP-105+-MSCs

Tabla 5.2: Resultados del análisis hematológico de los animales antes y después de ser sacrificados.

	Before sacrificing	After sacrificing
RBC (total)	5,07 10 ⁶ /μL-5,58 10 ⁶ /μL	5,63 10 ⁶ /μL±5,5810 ⁶ /μL
Haemoglobin	12,6 mG/dL-2,7 mG/dL	12,2 mG/dL±2,9 mG/dL
Hematocrit	37,5 %-46%	36,6%-45 %
WBG	13,74 10 ³ / μL-11,90 10 ³ / μL	11,48 10 ³ / μL-12,84 10 ³ / μL
Neutrofilos	63,7%-67,7 %	63,7 %-66,7 %
Linfocitos	25,6 %-32,2%	24,2 %-32%
Platelets	344 10 ³ / μL-340 10 ³ / μL	339 10 ³ / μL-341 103/μL

Tabla 5.3: Análisis bioquímico de los animals después de ser sacrificados.

		Before sacrificing	After sacrificing
Volume of blood	mL	5	5
Glucose	mG/dL	106-76	91-76
BUN-UREA	mG/dL	38-55	41-43
Creatinine	mG/dL	1.11-1.06	0.64-0.93
Total protein	G/dL	6.84-7.18	6.65-7.06
Albumin	G/dL	3.75-3.63	3.63-3.55
Calcium	mG/dL	8.8-9.08	9.08-8.93
Phosphate	mG/dL	4.78-2.87	2.87-4.31
Sodium	meq/L	152-151	151-144
Potassium	meq/L	4.33-3.84	3.84-3.25
Chloride	mmol/L	111-119	119-113
Cholesterol	mG/dL	73-93	93-90
Bilirubin	mG/dL	0.69-0.44	0.44-0.61
AST	U/L	42-47	47-54
ALT	U/L	29-37	37-29
Alkaline phos.	U/L	116-97	128-160
Triglycerides	mg/dl	108	136

6 DISCUSIÓN

6.1 LA DESREGULARIZACIÓN DE LAMINA A EN CMMS

Hemos demostrado que la desregulación de LMNA en nuestro modelo condrogénico previamente caracterizado compromete la diferenciación condrogénica a través, al menos parcialmente, de un desajuste en el estrés oxidativo. La lamina A es un factor clave que regula tanto el envejecimiento normal como el acelerado, así como la diferenciación de células madre. El envejecimiento se define como la acumulación de diversos cambios perjudiciales que ocurren en células y tejidos de avanzada edad y que aumentan considerablemente el riesgo de enfermedad y muerte ⁽¹⁰³⁾. El envejecimiento es hoy en día considerado un proceso multi-factorial muy complejo. Han sido expuestas numerosas teorías al respecto, pero ninguna es capaz de explicar por si sola todos los cambios fisiológicos asociados a la edad ⁽¹⁰⁴⁾.

Habitualmente se utilizan síndromes de envejecimiento prematuro como modelo de estudio, para intentar entender como ocurre el envejecimiento normal. Entre todos estos síndromes, la progeria de Hutchinson- Gilfor (HGPS) es una de las más estudiadas. Recientes estudios han teorizado que una disfunción de las células madre fomenta el envejecimiento, tanto normal como acelerado ^(105,106). Con el objetivo de examinar esta premisa en nuestro modelo de diferenciación condrogénica de CMMS de cordón umbilical a través de la formación de esferoides, utilizamos un sistema de transducción lentiviral para conseguir sobre-expresar LMNA, PG y GFP como control. Los niveles de expresión se determinaron mediante inmunoblot; Las células LMNA-

CMMs acumularon LMNA wt y las PG-CMMs acumularon PG. El bajo nivel de PG detectado puede ser debido al bajo número de pasaje de la línea celular, sin embargo, es similar al nivel encontrado en la línea celular de fibroblastos derivados de HGPS, AG01972. En las CMM transducidas con PG se detectaron defectos nucleares y una disminución en la tasa de proliferación, ambas características típicas de células pre-senescentes y que expresan PG. También se detectan leves defectos nucleares y una disminución en la tasa de proliferación en CMMs transducidas con LMNA lo que nos indica que la acumulación nuclear de la isoforma de tipo salvaje podría alterar la lámina nuclear de forma similar a la acumulación de PG. Esto coincide con los datos previamente publicados ⁽¹⁰⁷⁾. Por el contrario, las GFP-CMMs presentan una tasa de proliferación similar a CMM no-transducidas. Hemos decidido utilizar el GFP-CMMs como control para los experimentos de diferenciación debido a esto. Primero se caracterizaron las CMM de estroma del cordón umbilical humano por citometría de flujo (figura 3 suplementos) las cuales mostraron un porcentaje similar de células positivas para los marcadores de superficie CD105, CD90 y CD73 y fueron negativas para CD45 y 34, como se encontró en obras anteriores de Arufe *et al.* ⁽¹⁰⁸⁾. Hemos demostrado que las GFP-CMMs mantienen un potencial de diferenciación similar al de las células no transducidas. Se utilizó el GFP-CMMs como control por varias razones. A diferencia de las CMM no transducidas, las GFP-CMMs se transdujeron en paralelo con las otras líneas celulares que se sometieron a la infección lentiviral y la selección de puromicina. Además, las GFP-CMMs sobreexpresan una proteína exógena. Estudios extensos documentados en la literatura han verificado que la expresión de GFP es inocua para las células. Por último, un estudio recientemente publicado demostró que la transfección lentiviral de GFP en CMM-CUs humanas no afectó su pluripotencia ⁽¹⁰⁹⁾.

Se observaron alteraciones en el potencial de diferenciación del mesodermo en las líneas celulares transducidas, en las que la osteogénesis, la adipogénesis y especialmente la condrogénesis se vieron comprometidas en PG-CMM en comparación con los controles. En nuestro modelo, hemos encontrado depósitos de calcio secretado por PG-CMMs a disminuir después de 21 días en medio osteogénico en comparación con GFP-CMMs. Una explicación a esto podría ser el bajo nivel de expresión del gen ALP en estas células. Por contra, la expresión OC significativamente más altas en LMNA-CMM puede indicar que la osteogénesis no se ve altera en estas células. Después de 21 días en medio adipogénico, la capacidad adipogénica se redujo en PG-CMMs, hecho demostrado por una expresión significativamente menor de los genes LPL y FABP frente a las células control, así como una tinción de Oil Red disminuida (cerca de 50% menos). En cambio, las células transducidas con LMNA muestran un aumento significativo en la expresión de estos marcadores adipogénicos. Nuestros resultados difieren de los encontrados previamente por Kha *et al.* ⁽¹¹⁰⁾. De sus resultados, habríamos esperado encontrar un potencial osteogénico mejorado en PG-CMMs debido a que la adipogénesis se redujo. Una posible explicación de este resultado inesperado puede ser que todos los mecanismos de diferenciación mesodérmica en células PG-CMMs fueron desregulados como consecuencia de la sobre-expresión de PG.

La diferenciación condrogénica en nuestro modelo se ve afectada por la desregulación de LMNA, especialmente en PG-CMMs. Podemos verlo en la menor relación de COL2 / COL1 y la menor expresión de COL2 y AGG que muestra la qPCR. Si bien nuestros hallazgos no están completamente de acuerdo con los resultados del estudio de Scaffidi y Misteli ⁽¹⁰⁵⁾, cualquier discrepancia puede explicarse por los diferentes métodos de transfección de genes, los diferentes orígenes de las CMM y los diferentes modelos de diferenciación utilizados. Los marcadores de

hipertrofia, MMP-13 y COLX, se detectaron significativamente elevados en PG-CMMs por inmunohistoquímica, en comparación con el control, después de 21 días en medio condrogénico. Además, las LMNA-CMMs presentaron un aumento en la expresión de COLX, pero no en MMP-13. Un análisis de qPCR mostró que estos dos marcadores de hipertrofia estaban significativamente elevados tanto en PG-CMMs como en LMNA-CMMs. Estos resultados fueron similares a los observados en los condrocitos OA ⁽¹¹¹⁾. Es bien sabido que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son responsables de la desregulación de la condrogénesis ^(112, 113). Hemos dicho previamente que la MnSODM está regulada en OA y que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son responsables de la desregulación de la condrogénesis ⁽¹¹¹⁾. Por lo tanto, nos propusimos determinar si el potencial condrogénico disminuido de LMNA-CMMs y PG-CMMs está vinculado a defectos en la MnSODM o al desequilibrio en el estrés oxidativo. Se analizaron los niveles de MnSODM en el día 0. El western reveló una disminución de MnSODM total en ambas líneas celulares, que fue acompañada por una acumulación estable de ROS. Esta acumulación se invierte parcialmente mediante la incubación de las células con el anticuerpo antioxidante NAC, que actúa como un eliminador de ROS. Anteriormente, se ha propuesto un incremento rápido y transitorio en la generación de ROS en CMM humanas a partir de médula ósea como un factor inicial para mantener la capacidad migratoria de estas células ⁽¹¹⁴⁾, lo que sugiere un escenario bifásico para la reparación *in vivo* de tejidos lesionados. Decidimos estudiar si la capacidad migratoria en nuestro modelo *in vitro* está alterada en nuestras células transfectadas. El ensayo de cámara de Boyden modificado muestra que estas células presentan una mayor capacidad de migración orientada activada por dos quimiocinas inflamatorias, SDF-1 e IL-8, en comparación con las GFP-CMM control. No es irracional pensar que el aumento en la generación de ROS que

hemos detectado en nuestro modelo con lamina A, pueda interferir con la cadena de eventos que conduce a una migración adecuada de estas células. Los niveles de expresión génica de COL2 y COL1 se midieron mediante qPCR después de 21 días en medio condrogénico con y sin NAC. La relación COL2 / COL1 indica que el tratamiento con NAC mejora la diferenciación condrogénica. Esta relación es significativamente más alta en GFP-CMMs y LMNA-CMMs, pero no en PG- CMMs, aunque el nivel de expresión de genes COL2 fue mayor si se trataban con NAC en comparación con las PG -CMM sin tratar. (datos no mostrados). El fenotipo hipertrófico se ve atenuado por el tratamiento con NAC en células transducidas con LMNA y PG, como se puede ver por el aumento de AGG y la disminución en la expresión de MMP-13.

Estos resultados indican que los modelos LMNA-CMMs y PG-CMMs fueron más sensibles al tratamiento con NAC debido a una acumulación de ROS que se correlaciona con una disminución de los niveles de proteína MnSODM. Nuestros resultados están de acuerdo con los de Morita *et al.* Indicando que los niveles de ROS regulan la inhibición de la proliferación y modulan el inicio de cambios hipertróficos en condrocitos⁽¹¹⁵⁾ y se demuestran la importancia de los niveles de ROS durante la diferenciación de células madre⁽¹¹⁶⁾.

6.2 LA T3 EN LA CONDRÓGENESIS *IN VITRO*

Es bien conocido que la proliferación y diferenciación de los condrocitos están reguladas por diversos agentes endocrinos, paracrinos y autocrinos, incluyendo el crecimiento, las hormonas tiroideas y sexuales, la beta-catenina, las proteínas morfogenéticas óseas, el factor de crecimiento insulínico, la yodotironina desiodinasa, leptina, óxido nítrico, B y vitamina D y metabolitos⁽¹¹⁷⁾. Nosotros quisimos estudiar los efectos que podrían tener la utilización de T3 y PRL en nuestro modelo de condrogénesis en CMMs de cordón umbilical. La caracterización de CMMs figura 4.6 A confirma los resultados anteriores ya publicados en nuestro grupo ^(67, 100, 108). Se añadieron diferentes dosificaciones de T3 y PRL a nuestro medio para probar su efecto sobre la condrogénesis. La PRL no tuvo ningún efecto que pudiera encontrarse mediante qPCR o análisis inmunohistoquímico. Estos resultados concuerdan con los resultados publicados por Seriwatanachai *et al.* ⁽¹¹⁸⁾ que proporcionaron evidencia de que la PRL aumentó el crecimiento óseo endocondral y el alargamiento óseo, presumiblemente mediante la aceleración de la apoptosis de los condrocitos hipertróficos en la placa de crecimiento y / o posterior mineralización de la matriz condrogénica, pero no relacionada con el inicio de la condrogénesis. Después de realizar los experimentos de respuesta a las distintas dosis, los resultados de qPCR y de inmunohistoquímica indicaron que el cultivo durante 14 días en MC con T3 a 100 ng / ml produjo un aumento significativo en la expresión de COL2 (figura 4.6 B) y genes de agregano y tinción con safranina O Encontrado con medio condrogénico solo (figura 4.7) Boeloni *et al.* ⁽¹¹⁹⁾ publicaron resultados del efecto T3 sobre la diferenciación osteogénica utilizando células madre mesenquimales de médula ósea de rata. Consideraron que la dosis de 1 pM de T3 dio como resultado una mayor síntesis de colágeno y actividad fosfatasa alcalina comparada con dosis

mayores. En nuestro estudio 100 ng / ml de T3 es una dosis mayor que 1 pM pero sigue siendo una dosis fisiológica. Decidimos enfocarnos únicamente en experimentos a 14 días de diferenciación, al igual que muchas publicaciones ⁽¹²⁰⁻¹²²⁾.

La calidad de nuestro modelo condrogénico se evaluó mediante qPCR analizando genes relacionados con la condrogénesis como AP2 α , ITG α 10, COL2 y AP2 ϵ . AP2 ϵ está implicado en la regulación de la ITG α 10 durante la transcripción en condrocitos ⁽¹²³⁾, y es considerado un marcador hipertrófico. Niebler *et al.* ⁽¹²⁴⁾ demostró que AP2 ϵ se encuentra sobreexpresado en condrocitos durante la fase de diferenciación, especialmente en condrocitos hipertróficos. Por el contrario, AP2 α se expresa en condrocitos durante el crecimiento en placa y en cartílago articular, y ha sido descrito como un regulador negativo de diferenciación ⁽¹²⁵⁾, manteniendo las células en un estado de diferenciación temprana. Nuestros resultados muestran como en nuestro modelo T3 aparece un incremento de ambos factores, pero el de AP2 ϵ es mucho mayor, lo que podría explicar la acción condrogénica de T3, así como el incremento significativo de COL2. A su vez esto puede explicar por qué no encontramos hipertrofia en nuestro modelo (figura A4.8). La microscopía electrónica de barrido de nuestros esferoides corrobora el incremento de COL2 en los espacios entre células. (figura 4.8 A, D)

Utilizamos ML151 para bloquear SRC2 después de confirmar que SRC2 estaba presente en nuestras células (4.9 A). Aunque hubo diferencias en el nivel de expresión del gen SRC2 entre las CMMs y los condrocitos de donantes sanos, estos no fueron significativos. Las CMMs fueron tratadas con las diferentes concentraciones del inhibidor en el CM sin T3 para descartar posibles interacciones que el ML151 pudiera tener por sí mismo (figura 4.9 B). La molécula inhibidora ML151 (CID 5184800),

bloqueó la interacción (TR β)-SRC2. Los estudios mecánicos revelaron que ML151 es un inhibidor covalente y se une irreversiblemente a Cys298 dentro de la fisura AF-2 de TR β . Nuestros resultados indicaron que 2,5 μ M de ML151 es suficiente para anular el aumento de condrogénesis logrado con T3, causando una disminución significativa en la expresión génica de COL2 y agrecano, en comparación con sus niveles en medio condrogénico más T3 (Fig. 4.9 c-e).

Los resultados de un estudio previo publicado por Mueller *et al.* ^[126] ratifican el papel de T3 y TGF- β en la maduración del cartílago; TGF- β estimuló la proliferación y la hipertrofia suprimida, mientras que T3 estimuló la hipertrofia y la apoptosis. Sin embargo, en nuestro modelo el papel de T3 parece promover la condrogénesis sin hipertrofia. El tratamiento con T3 no solo no incrementó, sino que incluso redujo la señal de MMP13, COLX y ALP en el análisis inmunohistoquímico después de 14 días (figura 4.9 A, B). Los resultados de nuestro estudio podrían ser explicados por el corto tiempo en cultivo o la divergencia en la fuente de CMMs. Pero la diferencia más importante es que en nuestro estudio la dosis de T3 que utilizamos fue fisiológica, mucho más baja en comparación con la utilizada en otros estudios.

También es posible que la combinación de la retirada de TGF- β , la reducción en el nivel de dexametasona y la adición de T3 fuera esencial para la inducción de hipertrofia en el trabajo de Mueller⁽¹²⁶⁾. También se evaluó la expresión génica de Runx2 por qPCR para comprobar la hipertrofia o el aumento de la osteogénesis a nivel genético como en Liu Z *et al.* ⁽¹²⁷⁾, y no detectamos signos de hipertrofia (figura 4.10 C). Jiang *et al.* ⁽¹²⁸⁾ usaron T3 para estimular la hipertrofia y mineralización de condrocitos articulares en cultivos monocapa de condrocitos primarios durante un largo periodo de tiempo. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que T3, junto con TGF- β 3, aumentó

la expresión de *ACAN* en la matriz extracelular de nuestras célula CMMs de cordón umbilical después de 14 días condrogénesis (Fig. 4.7). Esto no contradice la posibilidad de que la hipertrofia pueda aparecer en nuestro modelo con más tiempo de diferenciación.

Las vías de señalización de Wnt son las dos vías de señalización más importantes que desempeñan un papel clave en el desarrollo embrionario y en la biología de CMMs, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y la interacción epitelio-mesenquima ⁽¹²⁹⁻¹³¹⁾. Representan los dos canales principales de comunicación utilizados por las células animales para controlar su identidad y comportamiento durante el desarrollo. Hayward *et al.* Revisó la evidencia de la relación entre la señalización Wnt, que actúa como componentes de un dispositivo integrado que, en lugar de definir el destino de una célula, determina la probabilidad de que una célula adopte ese destino ⁽¹³²⁾. Nuestros resultados mostrados en la figura 4.10 A que la presencia de T3 en el medio condrogénico aumentó la expresión génica y los niveles de proteína de β -catenina y Frizzled y GSK-3 β . Estos resultados coinciden con los publicados por Wang *et al.* ^[133], que sugirió que esta acumulación de proteínas podría ser el resultado de una reducción de su degradación. Day *et al.* ^[134] demostraron que la β -catenina era esencial para determinar si las células progenitoras mesenquimales se convertirían en osteoblastos o condrocitos independientemente de las ubicaciones regionales o de los mecanismos de osificación. Del mismo modo, nuestros resultados parecen indicar que un aumento de la condrogénesis producida por la adición de T3 en el medio condrogénico sería mediada por β -catenina debido a que se incrementó en las células tratadas con T3 (figura 4.10 A, B), así como el aumento de la expresión COL2 en esas células (figura 4.6 B, C). En el sentido opuesto, la disminución de la β -catenina producida por ML151, que bloquea SRC2 impidiendo la actuación T3, también disminuyó el proceso de la

condrogénesis, como indica la disminución de la producción de COL2 (Figura 4.9 C-D). Sin embargo, ML151 parece afectar a la expresión de β -catenina independientemente de Frizzled y GSK-3B cómo demostrar los resultados encontrados por qPCR y western (figura. 4.10 C, D). Profundizando en este hecho, la proteína Dickkopf 1 (DKK-1), que es un miembro de la familia de proteínas Dkk y un antagonista de la señalización Wnt ^[127,135] inhibiendo la translocación de β -catenina en el núcleo y su enlace a LRP5/6. La suplementación con Dkk-1 del medio condrogénico no disminuyó los niveles de β -catenina en esferoides después de 14 días. La expresión de β -catenina se incrementó de manera significativa en comparación con el control de CM con Dkk1 sin T3, como muestra el análisis mediante western (figura 4.10 E). El resultado fue contrastado mediante qPCR e inmnohistoqímica (figura 4.10 C, D, F) Leijten *et al.* ⁽¹³⁶⁾. Encontraron resultados similares utilizando cartílago humano lo que parecen indicar que T3 está actuando a través de SRC2 directamente sobre la β -catenina, previniendo la unión de Dkk con LRP5/6.

6.3 GENERACIÓN DE CÉLULAS RESISTENTES A IL-1 β MEDIANTE EL SISTEMA CRISPR / CAS9

IL-1 β es un mediador inflamatorio importante en el desarrollo de la osteoartritis (OA), necesario para inducir la expresión de muchos genes relacionadas con OA, incluyendo las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL6, IL8, así como enzimas que degradan la matriz del cartílago articular, ADAMTS5 y MMP13. Otra citoquina conocida por su relación con la OA es TNF α . Curiosamente, la exposición de los condrocitos articulares humanos (CAs) al TNF α conduce al aumento en la expresión de IL-1 β , aunque no se sabe si el aumento de la TNF α en OA podría estar mediado a través de la regulación al alza de IL-1 β . La terapia celular es una opción prometedora de tratamiento para la OA; sin embargo, la presencia de citoquinas inflamatorias puede inhibir la síntesis de cartílago articular nuevo o puede conducir a la destrucción del cartílago articular recién formado por las células trasplantadas. Debido a esto, la superación de los efectos pro-inflamatorios representa un desafío importante en medicina regenerativa ^(137,138).

Los resultados de nuestro estudio parecen demostrar utilidad del sistema CRISPR / Cas9 para aplicaciones en ingeniería tisular y medicina regenerativa mediante el desarrollo de células madre con propiedades personalizadas mediante ingeniería genética. Gracias a esta tecnología de nucleasas guiadas específicamente por ARN, hemos diseñamos CMMs y CAs con con la particularidad de ser resistentes a la IL-1 mediante la delección de la secuencia del péptido de IL1RI, el principal receptor de IL-1 β . Brunger *et al.* ⁽¹³⁹⁾ han demostrado recientemente la utilidad de esta estrategia en en IPSs. En su estudio, la delección mediante CRISPR / Cas9 de la IL1RI resultó en la pérdida completa en la señalización de IL-1. En

nuestros experimentos la expresión génica de *IL1R1* se redujo significativamente en todos nuestros tipos celulares (figura 4.12), pero la expresión no es nula. Cabe esperar que esto es debido a que nuestro objetivo principal era trabajar con CAs humanos, lo que implica la imposibilidad de realizar experimentos en clones y, por lo tanto, trabajar con muestras modificadas genéticamente en homocigosis. Nuestras poblaciones están conformadas por un pool de células que pueden haber sido editadas en ambos *loci* o solo en uno de ellos, por lo que es imposible que la expresión sea nula. En el caso de las CMMs inmortalizadas, si sería posible realizar una selección de clones, pero en un principio se optó en no hacerlo y tratar los experimentos como una validación en otro tipo celular, o como una primera aproximación. Es posible que realicemos dichos experimentos en el futuro.

Estudios previos han demostrado que el tratamiento con 1 ng / ml de IL-1 α han resultado en una grave degradación del cartílago en varios modelos de estudio ⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾. En el presente estudio, se examinaron los efectos de IL-1 α y del TNF α , sobre las células modificadas, pero no IL-1 β . Los condrocitos primarios muestran una mayor sensibilidad a IL-1 α que a IL-1 β , posiblemente debido a diferencias en la afinidad de unión a IL-1RI y / o al señuelo receptor IL-1RII ⁽¹⁴³⁾. Es importante señalar que IL-1RI media la señalización de ambas proteínas, y se podría esperar que su pérdida conlleve también a la pérdida de señalización de IL-1 β ^[144].

El estudio de la respuesta inflamatoria en monocapa realizado mediante qPCR demuestra que, tras la estimulación con IL-1 β durante 24 horas, la expresión de IL-1B, IL-6 y IL-8 resultó significativamente inferior en las células modificadas frente al control sin deleccionar en ambos donantes de CAs (figura 4.13 a). En el caso de las CMMs, no existió sobreexpresión significativa de dichos genes en comparación a los controles sin estimular (figura 4.13B). Sin embargo, la adición de TNF α al medio incrementó la

expresión de los mismos genes en el control y las células IL1R1-KO, demostrando que la señalización de IL-1 y TNF son independientes. Los estudios de condrogénesis mediante qPCR después de 10 días de diferenciación en discos de alginato indicaron que los condrocitos IL1R1-KO en presencia de rIL-1 β alcanzan un nivel de rediferenciación equivalente o similar al de los controles en ausencia de rIL-1 β , y presentaban un significativo aumento en expresión de los genes SOX9, ACAN y COL2A1 así como también de agregano y colágeno tipo II (figura 4.14 A). Por el contrario, las células control aumentaba la expresión de los genes IL-1B, IL-6, IL-8, mientras que la transcripción y síntesis de los genes SOX9, ACAN y COL2A1 fue bloqueada. Los resultados en CMMs siguen exactamente la misma dirección. (figura 4.14 B). Para corroborar estos resultados se realizó un análisis mediante western en el que se observa como las células resistentes en presencia de IL-1 β presentan un nivel de expresión de ACAN y SOX9 a nivel proteico equivalente a las células control no estimuladas con IL-1 β , mientras que en el caso de las células control no resistentes mostraron tener la expresión de dichas proteínas bloqueada cuando existe IL en el medio. (figura 4.15). También se observó qué ocurría con los genes marcadores de OA MMP13 y ADAMTS5 en CMMs tras 10 días de condrogénesis en discos de alginato. Ambos encima se encargan de la degradación del cartílago. La qPCR muestra que los genes de dichos enzimas se muestran sobreexpresados en células expuestas a IL-1 β , sin embargo, en las células silenciadas los niveles son significativamente más bajos, en especial en el caso de MMP13 (figura 4.16).

Hay que aclarar que este estudio se encuentra actualmente en desarrollo, por lo que muchos resultados serán añadidos en un futuro próximo. Algunos de los más inmediatos será la comprobación de las modificaciones realizadas mediante el sistema CRISPR- Cas por medio de southern-blot, el chequeo a nivel proteico la expresión del receptor

IL1R1, el análisis de MMP13 y de ADAMST5 en CAs, el estudio de ciertos microRNAs relacionados con la condrogénesis, etc. También somos conscientes de la necesidad de aumentar el número de donantes de CAs en orden de obtener unos resultados robustos. Es muy posible que se realicen ensayos clonogénicos en el caso de las CMMs, y algún estudio de reparación de cartílago, al menos *in vitro*, sería interesante. A pesar de todo creemos que los resultados expuestos por el momento indican que la generación de células mediante ingeniería genómica con propiedades especiales podría ser una interesante estrategia en terapia celular y, en concreto, que las células resistentes a señales pro-inflamatorias podrían suponer una opción útil para la reparación de lesiones en cartílago.

6.4 MIGRACIÓN DE CMMs EN UN MODELO ANIMAL DE PRIMATE NO HUMANO

Nuestro grupo desarrolló un procedimiento eficiente y reproducible para el aislamiento de CMMs de tejidos sinoviales basado en la expresión del antígeno CD105 y demostró el subconjunto celular CD105⁺-CMMs posee alta capacidad condrogénica. También se demostró la similitud entre CD105⁺-CMMs cultivadas a partir de membranas sinoviales normales y OA, lo que reflejó una ausencia de cualquier efecto de esta patología ⁽¹⁰⁰⁾. La facilidad de aislamiento y expansión, al igual que la capacidad de diferenciación multipotencial (especialmente condrogénica), hacen de estas células una buena elección para la ingeniería tisular en cartílago ^(145,146). Además, sus funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias hacen de las CMMs el candidato ideal para la terapia celular en enfermedades con características inflamatorias como las encontradas en OA y AR ⁽¹⁴⁷⁾. Las CMMs humanas han sido utilizadas en el trasplante xenogénico oveja, demostrando una diferenciación específica ⁽¹⁴⁸⁾. De hecho, son consideradas como células candidatas para el tratamiento de enfermedades articulares artríticas, tanto como un sustituto estructural, como para una terapia celular independiente o como una combinación de ambas ⁽¹⁴⁹⁾. El tratamiento farmacológico actual para la OA temprana presenta un éxito limitado, y varios procedimientos quirúrgicos, incluyendo desbridamiento, perforación, trasplante osteocondral, implantación de condrocitos autólogos, son capaces de aliviar el dolor temporalmente pero finalmente fracasan. La investigación en cartílago articular es un esfuerzo sorprendentemente reciente y aún queda mucho por aprender sobre el desarrollo normal de la articulación y los componentes que interactúan en la osteoartritis y otros defectos del cartílago ⁽¹⁵⁰⁾. Nuestros resultados obtenidos por bioquímica y análisis

hematológico indicaron que no se encontró ninguna toxicidad relacionada con el trasplante de células madre en este estudio (Tabla 4.2 y 4.3), resultados similares obtenidos por diferentes tipos de análisis fueron publicados por Wang *et al.* ⁽¹⁵¹⁾. Las lesiones superficiales en el cartílago articular no se autorreparan espontáneamente y se ha sugerido que es debido en parte a la falta de células progenitoras dentro de la articulación o que puedan alcanzar la lesión de alguna forma. Karlsson *et al.* ⁽¹⁵²⁾ han demostrado que una pequeña población de células progenitoras estaba presente en el surco pericondral de Ranvier, así como dentro del cartílago articular de rodilla. Grogan *et al.* ⁽¹⁵³⁾ mostraron en su último trabajo que existe un sorprendentemente alto número de células que expresan marcadores de células progenitoras en cartílago OA humano en comparación al sano. En nuestro experimento hemos encontrado unos resultados similares, donde se encontró que había un incremento estadísticamente significativo de CMMs nativas en las áreas lesionadas (figura 4.20 A-B-C). Varios grupos han publicado que el aumento del número de CMM en cartílago OA podría ser debido a la degeneración del cartílago coincidiendo con altos índices de rotación ósea *in vitro* ⁽¹⁵⁴⁾. Isakova *et al.* ^(155, 156) inyectaron células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (CMMs) en el sistema nervioso central de macacos rhesus adultos jóvenes para evaluar su seguridad y viabilidad como vectores para la intervención directa de trastornos neurológicos. Realizaron un doble marcaje que mostró que las células donantes injertadas carecían de expresión del marcador de macrófagos CD68. Nosotros realizamos el mismo análisis, confirmando que las DiO-CD-105⁺-CMM, resultaron negativas para la tinción CD68 (figura 4.22 A).

La SDF-1 es una potente citoquina quimio-atrayente que estimula la migración direccional de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas ⁽¹⁵⁷⁻¹⁵⁹⁾. Nos preguntamos qué podría estar reclutando las células madre

únicamente en la articulación lesionada y no en la sana. Para responder a esta pregunta se comprobó la expresión de SDF-1 en los tejidos donde aparecían Di-CD-105⁺-CMMs, DiO-CD-105⁺-CMMs (figura 4.22 B-C) o GFP-CD-105⁺-CMMs (figura 6D). Se observó que la expresión de SDF-1 en los tejidos lesionados era significativamente más alta con respecto a los sanos, lo que podría señalar la SDF-1 como agente reclutante (figura 4.22 C). Estas publicaciones fueron similares a las publicadas con otros autores en las que se encontró que un aumento en la expresión de esta citocina tuvo un papel clave en el reclutamiento de células hematopoyéticas en carcinomas con sorprendente tendencia a invadir el hueso ⁽¹⁶⁰⁾. No se encontraron células marcadas en la rodilla sana ni se detectaron tumores en ningún órgano analizado, lo que podría ser debido al corto periodo de tiempo esperado hasta sacrificar los animales (un mes), o tal vez a que los CMMs de la fuente utilizada, la membrana sinovial, tienen un perfil molecular distinto que se correlaciona con su nicho intrínseco en la rodilla. Por esta razón los experimentos más largos de lo que debe realizarse para descartar la génesis del tumor y para comprobar la regeneración en la rodilla lesionada.

7 CONCLUSIONES

- La diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales procedentes de cordón umbilical humano se ve comprometida por una desregulación de la lamin A que produce una alteración en el equilibrio de estrés oxidativo, modificando sus propiedades migratorias e induciendo defectos en su capacidad de diferenciarse en condrocitos *in vitro*.
- T3, en concentraciones fisiológicas, estimula el proceso de condrogénesis sin estimular su hipertrofia *in vitro*. Este efecto es mediado a través de SRC2. El efecto condrogénico de T3 es modulado por la ruta Wnt independientemente del componente LRP5 / 6.
- Los condrocitos articulares knockout para IL1R1, mediante la tecnología CRISPR-cas9, se re-diferencian normalmente incluso en presencia de rIL-1 β en el medio. Las células madre mesenquimales knockout demostraron unos resultados en condrogénesis favorables en presencia de rIL-1 β .
- En un modelo animal de *Macaca Fascicularis*, las células madre mesenquimales inyectadas en el torrente sanguíneo son reclutadas por la rodilla lesionada y conservan su perfil fenotípico a lo largo del tiempo estudiado. Además, las células madre mesenquimales nativas están aumentadas en la zona de la lesión.

CONCLUSIONS

- The chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord is compromised by a deregulation of lamin A that causes an alteration in the oxidative stress balance, modifying their migratory properties and inducing defects in their ability to differentiate into chondrocytes *in vitro*.
- T3, in physiological concentrations, stimulates the process of chondrogenesis *in vitro* without stimulating hypertrophy. This effect is mediated through SRC2. The chondrogenic effect of T3 is modulated by the Wnt path independently of the LRP5 / 6 component.
- The knockout articular chondrocytes for IL1R1, using CRISPR-cas9 technology, re-differentiate normally even in the presence of rIL-1 β in the medium. The knockout mesenchymal stem cells showed favorable chondrogenesis results in the presence of rIL-1 β .
- In an animal model of Macaca Fascicularis, the mesenchymal stem cells injected into the bloodstream are recruited by the injured knee and retain their phenotypic profile over the time studied. In addition, native mesenchymal stem cells are increased in the area of the lesion.

8 REFERENCIAS

1. O'Hara, B.P., Urban, J.P. and Maroudas, A. (1990) Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Annals of the rheumatic diseases*, 49, 536-539.
2. Shepherd, D.E. and Seedhom, B.B. (1999) Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Annals of the rheumatic diseases*, 58, 27-34.
3. Seibel, M.J., Robins, S.P. and Bilezikian, J.P. (2006) Dynamics of bone and cartilage metabolism. 2nd ed. Academic Press, San Diego.
4. Sellam, J., Berenbaum, F., (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6, 625–635.
5. Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Lavery, S. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical orthopaedics and related research*, S26-33.
6. Tallheden, T., Brittberg, M., Peterson, L. and Lindahl, A. (2006) Human articular chondrocytes--plasticity and differentiation potential. *Cells, tissues, organs*, 184, 55-67.
7. Dowthwaite, G.P., Bishop, J.C., Redman, S.N., Khan, I.M., Rooney, P., Evans, D.J., Haughton, L., Bayram, Z., Boyer, S., Thomson, B. et al. (2004) The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *Journal of cell science*, 117, 889-897.
8. Flannery, C.R., Hughes, C.E., Schumacher, B.L., Tudor, D., Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E. and Caterson, B. (1999) Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte

- stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*, 254, 535-541.
9. Poole, C.A. (1997) Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of anatomy*, 191 (Pt 1), 1-13.
 10. Harris E, Firestein G, Sargent J, Clement Sledge. 2006. *Kelley Tratado de Reumatología*.
 11. Goldring, M.B., Tsuchimochi, K. and Ijiri, K. (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 97, 33-44..12. Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 4, 499-511.
 13. Finberg, R.W., Wang, J.P. and Kurt-Jones, E.A. (2007) Toll like receptors and viruses. *Reviews in medical virology*, 17, 35-43.
 14. Kuznik, A., Bencina, M., Svajger, U., Jeras, M., Rozman, B. and Jerala, R. (2011) Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *Journal of immunology*, 186, 4794-4804.
 15. Matsumiya, T. and Stafforini, D.M. (2010) Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Critical reviews in immunology*, 30, 489-513.
 16. Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F. and Reis e Sousa, C. (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, 314, 997-1001.

17. Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J. and Gale, M., Jr. (2008) Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*, 454, 523-527.
18. Komuro, A. and Horvath, C.M. (2006) RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *Journal of virology*, 80, 12332-12342.
19. Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T. and Akira, S. (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of experimental medicine*, 205, 1601-1610.
20. Yan, W., Chen, W. and Huang, L. (2007) Mechanism of adjuvant activity of cationic liposome: phosphorylation of a MAP kinase, ERK and induction of chemokines. *Molecular immunology*, 44, 3672-3681.
21. Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M. and Olefsky, J.M. (2010) GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, 142, 687-698.
22. Spiegel, S. and Milstien, S. (2011) The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature reviews. Immunology*, 11, 403-415.
23. Cordeiro, J.V., Guerra, S., Arakawa, Y., Dodding, M.P., Esteban, M. and Way, M. (2009) F11-mediated inhibition of RhoA signalling enhances the spread of vaccinia virus in vitro and in vivo in an intranasal mouse model of infection. *PLoS One*, 4, e8506.

24. Kong, L., Sun, L., Zhang, H., Liu, Q., Liu, Y., Qin, L., Shi, G., Hu, J.-H., Xu, A., Sun, Y.-P. et al. (2009) An Essential Role for RIG-I in Toll-like Receptor-Stimulated Phagocytosis. *Cell Host & Microbe*, 6, 150-161.
25. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O. et al. (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, 23, 19-28.
26. Mukherjee, A., Morosky, S.A., Shen, L., Weber, C.R., Turner, J.R., Kim, K.S., Wang, T. and Coyne, C.B. (2009) Retinoic acid-induced gene-1 (RIG-I) associates with the actin cytoskeleton via caspase activation and recruitment domain-dependent interactions. *J Biol Chem*, 284, 6486-6494.
27. Huang AH, Stein A, Mauck RL. Evaluation of the complex transcriptional topography of mesenchymal stem cell chondrogenesis for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2010 Sep;16(9):2699-2708.
28. Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* 2010 Feb;222(2):268-277.
29. Bhattacharya B, Puri S, Puri RK. A review of gene expression profiling of human embryonic stem cell lines and their differentiated progeny. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009 May;4(2):98-106.
30. Georgieva BP, Love JM. Human induced pluripotent stem cells: a review of the US patent landscape. *Regen Med* 2010 Jul;5(4):581-591.
31. Tetzlaff W, Okon EB, Karimi-Abdolrezaee S, Hill CE, Sparling JS, Plemel JR, et al. A systematic review of cellular transplantation

- therapies for spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2011 Aug;28(8):1611-1682.
32. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface* 2010 Dec 6;7 Suppl 6:S689-706.
 33. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 2007 Nov;25(11):2886-2895.
 34. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008 Feb;26(2):300-311.
 35. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000 Aug;164(2):247-256.
 36. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J.C., Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16, 115–130.
 37. Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126, 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
 38. Blazquez-Martinez, A. et al. C-Kit identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in adipose tissue with higher telomerase expression and differentiation potential. *Differentiation* 87, 147–160 (2014).

39. Bari, C. De, Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. & Luyten, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44, 1928–1942 (2001).
40. Manini, I. et al. Multi-potent progenitors in freshly isolated and cultured human mesenchymal stem cells: A comparison between adipose and dermal tissue. *Cell Tissue Res.* 344, 85–95 (2011).
41. Almeida, M. & O'Brien, C. A. Basic Biology of Skeletal Aging: Role of Stress Response Pathways. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 68, 1197–1208 (2013).
42. Trivanović, D. et al. Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 141, 178–186 (2013).
43. D'souza, N. et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Med.* 13, 186 (2015).
44. Gong, X. et al. Isolation and characterization of lung resident mesenchymal stem cells capable of differentiating into alveolar epithelial type II cells. *Cell Biol. Int.* 38, 405–411 (2014).
45. Pacini, S. & Petrini, I. Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. *Cell Dev. Biol.* 2, 1–11 (2014).
46. Pappa, K. I. & Anagnou, N. P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen. Med.* 4, 423–433 (2009).
47. Xin, H. et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells* 30, 1556–1564 (2012).

48. Tanaka, Y. Human mesenchymal stem cells as a tool for joint repair in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 33, 58–62 (2015).
49. Chen, F. H. & Tuan, R. S. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 10, 223 (2008).
50. Gonzalez, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Buscher, D. & Delgado, M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 60, 1006–1019 (2009).
51. Ghannam, S., Pène, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C. & Yssel, H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J. Immunol.* 185, 302–312 (2010).
52. Ren, J. et al. Global transcriptome analysis of human bone marrow stromal cells (BMSC) reveals proliferative, mobile and interactive cells that produce abundant extracellular matrix proteins,
53. Sekiya, I., Colter, D.C. and Prockop, D.J. (2001) BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284, 411-418.
54. Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Reger, R.L. and Prockop, D.J. (2005) Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell and tissue research*, 320, 269-276.
55. Mueller, M.B., Fischer, M., Zellner, J., Berner, A., Dienstknecht, T., Prantl, L., Kujat, R., Nerlich, M., Tuan, R.S. and Angele, P. (2010) Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells, tissues, organs*, 192, 158-166.

56. Ito, T., Sawada, R., Fujiwara, Y. and Tsuchiya, T. (2008) FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling. *Cytotechnology*, 56, 1-7.
57. Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E. and Richter, W. (2010) Impact of Growth Factors and PTHrP on Early and Late Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of cellular physiology*, 223, 84-93.
58. Seibel, M.J., Robins, S.P. and Bilezikian, J.P. (2006) Dynamics of bone and cartilage metabolism. 2nd ed. Academic Press, San Diego.
59. Alberts, B. (2008) Molecular biology of the cell. 5th ed. Garland Science, New York ; Abingdon.
60. Mueller, M.B. and Tuan, R.S. (2008) Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 58, 1377-1388.
61. Edwards, G.O., Coakley, W.T., Ralphs, J.R. and Archer, C.W. (2010) Modelling condensation and the initiation of chondrogenesis in chick wing bud mesenchymal cells levitated in an ultrasound trap. *European cells & materials*, 19, 1-12.
62. Martin-Rendon, E., Hale, S.J., Ryan, D., Baban, D., Forde, S.P., Roubelakis, M., Sweeney, D., Moukayed, M., Harris, A.L., Davies, K. et al. (2007) Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells*, 25, 1003-1012.
63. Grayson, W.L., Zhao, F., Bunnell, B. and Ma, T. (2007) Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 358, 948-

64. Vinardell, T., Rolfe, R.A., Buckley, C.T., Meyer, E.G., Ahearne, M., Murphy, P. and Kelly, D.J. (2012) Hydrostatic pressure acts to stabilise a chondrogenic phenotype in porcine joint tissue derived stem cells. *European cells & materials*, 23, 121-132; discussion 133-124.
65. Ahrens, P.B., Solursh, M. and Reiter, R.S. (1977) Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol*, 60, 69-82.
66. Zhang, L., Su, P., Xu, C., Yang, J., Yu, W. and Huang, D. (2010) Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnology letters*, 32, 1339-1346.
67. Arufe MC, Lu M, Kubo A, Keller G, Davies TF, Lin RY. 2006. Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into thyroid follicular cells. *Endocrinology* 147: 3007-3015.
68. Vidal, M.A., Robinson, S.O., Lopez, M.J., Paulsen, D.B., Borkhsenius, O., Johnson, J.R., Moore, R.M. and Gimble, J.M. (2008) Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Veterinary surgery : VS*, 37, 713-724.
69. Furukawa, K.S., Suenaga, H., Toita, K., Numata, A., Tanaka, J., Ushida, T., Sakai, Y. and Tateishi, T. (2003) Rapid and large-scale formation of chondrocyte aggregates by rotational culture. *Cell Transplant*, 12, 475-479.
70. Ahmed, T.A. and Hincke, M.T. (2010) Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. *Tissue Eng Part B Rev*, 16, 305-329.
71. Hunziker, E.B. (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects.

- Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, 10, 432-463.
72. Ge, Z., Li, C., Heng, B.C., Cao, G. and Yang, Z. (2012) Functional biomaterials for cartilage regeneration. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 100, 2526-2536.
 73. Centers for Disease, C. and Prevention. (2010) Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation --- United States, 2007-2009. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 59, 1261-1265.
 74. Minas, T. (2011) *A primer in cartilage repair and joint preservation of the knee*. Saunders, Philadelphia, Pa. ; London.
 75. Curl, W.W., Krome, J., Gordon, E.S., Rushing, J., Smith, B.P. and Poehling, G.G. (1997) Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, 13, 456-460.
 76. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889-895.
 77. Green, W.T., Jr. (1971). Behavior of articular chondrocytes in cell culture. *Clin Orthop Relat Res* 75, 248-260.
 78. Lorentzon, R., Alfredson, H., and Hildingsson, C. (1998). Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantation. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 6, 202-208.

79. Alfredson, H., and Lorentzon, R. (1999). Superior results with continuous passive motion compared to active motion after periosteal transplantation. A retrospective study of human patella cartilage defect treatment. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 7, 232-238.
80. Hjelle, K., Solheim, E., Strand, T., Muri, R. and Brittberg, M. (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, 18, 730-734.
81. Knutsen, G., Drogset, J.O., Engebretsen, L., Grontvedt, T., Isaksen, V., Ludvigsen, T.C., Roberts, S., Solheim, E., Strand, T. and Johansen, O. (2007) A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*, 89, 2105-2112.
- 81 Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T.C., Drogset, J.O., Grontvedt, T., Solheim, E., Strand, T., Roberts, S., Isaksen, V., and Johansen, O. (2004). Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume* 86-A, 455-464
82. Steinwachs, M., and Kreuz, P.C. (2007). Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: a prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy* 23, 381-387.
83. Enea, D., Cecconi, S., Busilacchi, A., Manzotti, S., Gesuita, R., and Gigante, A. (2012). Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 20, 862-869.

84. Holtzer, H., Abbott, J., Lash, J. and Holtzer, S. (1960) The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells in Vitro, I. Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 46, 1533-1542.
85. Binette, F., McQuaid, D.P., Haudenschild, D.R., Yaeger, P.C., McPherson, J.M. and Tubo, R. (1998) Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop Res*, 16, 207-216.
86. Benya, P.D., Brown, P.D. and Padilla, S.R. (1988) Microfilament modification by dihydrocytochalasin B causes retinoic acid-modulated chondrocytes to reexpress the differentiated collagen phenotype without a change in shape. *J Cell Biol*, 106, 161-170.
87. Matsumoto, E., Furumatsu, T., Kanazawa, T., Tamura, M. and Ozaki, T. (2012) ROCK inhibitor prevents the dedifferentiation of human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 420, 124-129.
88. Matricali, G.A., Dereymaeker, G.P. and Luyten, F.P. (2010) Donor site morbidity after articular cartilage repair procedures: a review. *Acta orthopaedica Belgica*, 76, 669-674.
89. Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., and Goldberg, V.M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 76, 579-592.
90. Solchaga, L.A., Johnstone, B., Yoo, J.U., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. (1999). High variability in rabbit bone marrow-derived mesenchymal cell preparations. *Cell Transplant.* 8, 511-519.
91. Solchaga, L.A., Gao, J., Dennis, J.E., Awadallah, A., Lundberg, M., Caplan, A.I., and Goldberg, V.M. (2002). Treatment of

- osteocondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng.* 8, 333-347.
92. Koga, H., Muneta, T., Ju, Y.J., Nagase, T., Nimura, A., Mochizuki, T., Ichinose, S., von der Mark, K., and Sekiya, I. (2007) . Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* 25, 689-696.
 93. Loken, S., Jakobsen, R.B., Aroen, A., Heir, S., Shahdadfar, A., Brinchmann, J.E., Engebretsen, L., and Reinholt, F.P. (2008) . Bone marrow mesenchymal stem cells in a hyaluronan scaffold for treatment of an osteochondral defect in a rabbit model. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 16, 896-903.
 94. Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N., and Yoneda, M. (2002). Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 199-206.
 95. Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S., and Kurosaka, M. (2007). Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 226-231.
 96. Matsumoto, T., Okabe, T., Ikawa, T., Iida, T., Yasuda, H., Nakamura, H., and Wakitani, S. (2010). Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. *J. Cell. Physiol.* 225, 291-295.
 97. Tsai, C.-C., Chen, C.-L., Liu, H.-C., Lee, Y.-T., Wang, H.-W., Hou, L.-T., and Hung, S.-C. (2010). Overexpression of hTERT increases stem-like

- properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *Journal of Biomedical Science* 17, 64.
98. Messina E, et al. 2004. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 95: 911-921.
 99. Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. 2005. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 36: 758-769.
 100. Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes-Boquete I, De Toro FJ, Blanco FJ. 2009. Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J Cell Biochem* 108: 145-155.
 101. Zhang JD, Ruschhaupt M, Biczok R. 2010. ddCt method for qRT-PCR data analysis.
 102. Ramallal, M., E. Maneiro, E. López, I. Fuentes-Boquete, M. J. López-Armada, J. L. Fernández-Sueiro, F. Galdo, F. J. De Toro and F. J. Blanco (2004). "Xeno-implantation of pig chondrocytes into rabbit to treat localized articular cartilage defects: an animal model." *Wound Repair Regen* 12(3): 337-345.
 103. Harman, D., 2003. The free radical theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* 5 (5), 557-561
 104. Tosato, M., Zamboni, V., Ferrini, A., Cesari, M., 2007. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin. Interv. Aging* 2 (3), 401-412.
 105. Scaffidi, P., Misteli, T., 2008. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* 10, 452-459 (England)

106. Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Zhang, Y., Tse, H.F., Stewart, C.L., Colman, A., 2011. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell*, 8. Elsevier Inc, United States, pp. 31–45 (A 2011).
107. Young, S.G., Meta, M., Yang, S.H., Fong, L.G., 2006. Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J. Biol. Chem.* 281, 39741–39745 (United States).
108. Arufe, M.C., De la Fuente, A., Mateos, J., Fuentes, I., De Toro, F.J., Blanco, F.J., 2011. Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. *Stem Cells Dev.* 20 (7), 1199–1212
109. Qian, H., Zhang, X., Xu, W., Zhu, W., Cao, H., Chen, Y., Xu, X., Wang, M., Xie, Y., Sun, J., 2010. Lentivirus-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells maintain their pluripotency. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 55, 53–62 (England)
110. Kha, H.T., Basseri, B., Shouhed, D., Richardson, J., Tetradis, S., Hahn, T.J., Parhami, F., 2004. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat. *J. Bone Miner. Res.* 19 (5), 830–840.
111. Blanco, F.J., Rego, I., Ruiz-Romero, C., 2011. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7 (3), 161–169
112. Ruiz-Romero, C., Calamia, V., Mateos, J., Carreira, V., MartinezGomariz, M., Fernandez, M., Blanco, F.J., 2009. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 172–189 (United States).

113. Scott, J.L., Gabrielides, C., Davidson, R.K., Swingler, T.E., Clark, I.M., Wallis, G.A., Boot-Handford, R.P., Kirkwood, T.B., Taylor, R.W., Talyor, R.W., Young, D.A., 2010. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann. Rheum. Dis.* 69 (8), 1502–1510
114. Busletta, C., Novo, E., Valfrè Di Bonzo, L., Povero, D., Paternostro, C., Ievolella, M., Mareschi, K., Ferrero, I., Cannito, S., Compagnone, A., Bandino, A., Colombatto, S., Fagioli, F., Parola, M., 2011. Dissection of the biphasic nature of hypoxia-induced motogenic action in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 29 (6), 952–963
115. Morita, K., Miyamoto, T., Fujita, N., Kubota, Y., Ito, K., Takubo, K., Miyamoto, K., Ninomiya, K., Suzuki, T., Iwasaki, R., Yagi, M., Takaishi, H., Toyama, Y., Suda, T., 2007. Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. *J. Exp. Med.* 204 (7), 1613–1623.
116. Hao, Y., Cheng, D., Ma, Y., Zhou, W., Wang, Y., 2011. The relationship between oxygen concentration, reactive oxygen species and the biological characteristics of human bone marrow hematopoietic stem cells. *Transplant. Proc.* 43 (7), 2755–2761.
117. Burdan F, J Szumiło, A Korobowicz, R Farooquee, S Patel, A Patel, A Dave, M Szumiło, M Solecki, R Klepacz and J Dudka. (2009). Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* 47:5-16.
118. Seriwatanachai D, N Krishnamra and N Charoenphandhu. (2012). Chondroregulatory action of prolactin on proliferation and differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells in 3-

- dimensional micromass cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 420:108-13.
119. Boeloni JN, NM Ocarino, AB Melo, JF Silva, P Castanheira, AM Goes and R Serakides. (2009). Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Horm Res* 72:88-97.
 120. Perry JJ, Yannone SM, Holden LG, Hitomi C, Asaithamby A, Han S, Cooper PK, Chen DJ, Tainer JA. 2006. WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing. *Nat Struct Mol Biol* 13:414–422.
 121. Weimer JM, Benedict JW, Elshatory YM, Short DW, Ramirez-Montealegre D, Ryan DA, Alexander NA, Federoff HJ, Cooper JD, Pearce DA. 2007. Alterations in striatal dopamine catabolism precede loss of substantia nigra neurons in a mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain Res* 1162:98–112.
 122. Hardy R, Rabbitt EH, Filer A, Emery P, Hewison M, Stewart PM, Gittoes NJ, Buckley CD, Raza K, Cooper MS. 2008. Local and systemic glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Ann Rheum*
 123. Wenke AK, Rothhammer T, Moser M, Bosserhoff AK. 2006. Regulation of integrin alpha10 expression in chondrocytes by the transcription factors AP-2epsilon and Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun* 345(1): 495–501.
 124. Niebler S, Bosserhoff AK. 2013. The transcription factor activating enhancerbinding protein epsilon (AP-2e) regulates the core promoter of type II collagen (COL2A1). *FEBS J* 280(6):1397–1408.

125. Huang Z, Xu H, Sandell L. 2004. Negative regulation of chondrocyte differentiation by transcription factor AP-2alpha. *J Bone Miner Res* 19(2):245–255.
126. Mueller MB and RS Tuan. (2008). Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 58:1377-88.
127. Liu W, A Konermann, T Guo, A Jäger, L Zhang and Y Jin. (2014). Canonical Wnt signaling differently modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and from periodontal ligament under inflammatory conditions. *Biochim Biophys Acta* 1840:1125-34.
128. Jiang J, NL Leong, JC Mung, C Hidaka and HH Lu. (2008). Interaction between zonal populations of articular chondrocytes suppresses chondrocyte mineralization and this process is mediated by PTHrP. *Osteoarthritis Cartilage* 16:70-82.
129. Sarkar FH, Y Li, Z Wang and D Kong. (2010). The role of nutraceuticals in the regulation of Wnt and Hedgehog signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29:383-94.
130. Centola M, B Tonnarelli, S Schären, N Glaser, A Barbero and I Martin. (2013). Priming 3D cultures of human mesenchymal stromal cells toward cartilage formation via developmental pathways. *Stem Cells Dev* 22:2849-58.
131. Baghaban Eslaminejad M and N Fallah. (2014). Small Molecule-BIO Accelerates and Enhances Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell in Vitro Chondrogenesis. *Iran J Med Sci* 39:107-16.
132. Hayward P, T Kalmar and AM Arias. (2008). Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* 135:411-24.

133. Wang L, YY Shao and RT Ballock. (2007). Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 22:1988-95.
134. Day TF, X Guo, L Garrett-Beal and Y Yang. (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8:739-50.
135. Guerrero F, C Herencia, Y Almadén, JM Martínez-Moreno, A Montes de Oca, ME Rodriguez-Ortiz, JM Diaz-Tocados, A Canalejo, M Florio, I López, WG Richards, M Rodriguez, E Aguilera-Tejero and JR Muñoz-Castañeda. (2014). TGF- β prevents phosphate-induced osteogenesis through inhibition of BMP and Wnt/ β -catenin pathways. *PLoS One* 9:e89179.
136. Leijten JC, Emons J, Sticht C, van Gool S, Decker E, Uitterlinden A, Rappold G, Hofman A, Rivadeneira F, Scherjon S, Wit JM, van Meurs J, van Blitterswijk CA, Karperien M. 2012. Gremlin 1, frizzled-related protein, and Dkk-1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis. *Arthritis Rheum* 64(10):3302–3312.
137. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:33–42.
138. Blasioli DJ, Matthews GL, Kaplan DL. The degradation of chondrogenic pellets using cocultures of synovial fibroblasts and U937 cells. *Biomaterials* 2014;35:1185–91.
139. CRISPR/Cas9 Editing of Murine Induced Pluripotent Stem Cells for Engineering Inflammation-Resistant Tissues, Brunger 2017 *Arthritis & Rheumatology*

140. Glass KA, Link JM, Brunger JM, Moutos FT, Gersbach CA, Guilak F. Tissue-engineered cartilage with inducible and tunable immunomodulatory properties. *Biomaterials* 2014;35:5921–31.
141. Willard VP, Diekman BO, Sanchez-Adams J, Christoforou N, Leong KW, Guilak F. Use of cartilage derived from murine induced pluripotent stem cells for osteoarthritis drug screening. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:3062–72.
142. Blasioli DJ, Matthews GL, Kaplan DL. The degradation of chondrogenic pellets using cocultures of synovial fibroblasts and U937 cells. *Biomaterials* 2014;35:1185–91.
143. McNulty AL, Rothfusz NE, Leddy HA, Guilak F. Synovial fluid concentrations and relative potency of interleukin-1 α and β in cartilage and meniscus degradation. *J Orthop Res* 2013;31:1039–45.
144. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB, et al. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997;159:2452–61.
145. Caldwell, K. L. and J. Wang (2015). "Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration." *Osteoarthritis Cartilage* 23(3): 351-362. Castagnini, F., C. Pellegrini, L. Perazzo, F. Vannini and R. Buda (2016). "Joint sparing treatments in early ankle osteoarthritis: current procedures and future perspectives." *J Exp Orthop* 3(1): 3
146. Castagnini, F., C. Pellegrini, L. Perazzo, F. Vannini and R. Buda (2016). "Joint sparing treatments in early ankle osteoarthritis: current procedures and future perspectives." *J Exp Orthop* 3(1): 3
147. Ryu, J. S., Y. H. Jung, M. Y. Cho, J. E. Yeo, Y. J. Choi, Y. I. Kim and Y. G. Koh (2014). "Co-culture with human synovium-derived

- mesenchymal stem cells inhibits inflammatory activity and increases cell proliferation of sodium nitroprusside-stimulated chondrocytes." *Biochem Biophys Res Commun*447(4): 715-720.
148. Niemeyer, P., T. S. Schönberger, J. Hahn, P. Kasten, J. Fellenberg, N. Suedkamp, A. T. Mehlhorn, S. Milz and S. Pearce (2010). "Xenogenic transplantation of human mesenchymal stem cells in a critical size defect of the sheep tibia for bone regeneration." *Tissue Eng Part A*16(1): 33-43
 149. Shimomura, K., Y. Moriguchi, W. Ando, R. Nansai, H. Fujie, D. A. Hart, A. Gobbi, K. Kita, S. Horibe, K. Shino, H. Yoshikawa and N. Nakamura (2014). "Osteochondral repair using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells and a hydroxyapatite-based artificial bone." *Tissue Eng Part A*20(17-18): 2291-2304
 150. Baboolal, T. G., S. A. Boxall, S. M. Churchman, C. T. Buckley, E. Jones and D. McGonagle (2014). "Intrinsic multipotential mesenchymal stromal cell activity in gelatinous Heberden's nodes in osteoarthritis at clinical presentation." *Arthritis Res Ther*16(3): R119
 151. Wang, Y., Z. B. Han, J. Ma, C. Zuo, J. Geng, W. Gong, Y. Sun, H. Li, B. Wang, L. Zhang, Y. He and Z. C. Han (2012). "A toxicity study of multiple-administration human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys." *Stem Cells Dev*21(9): 1401-1408
 152. Karlsson, C., M. Thornemo, H. B. Henriksson and A. Lindahl (2009). "Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint." *J Anat*

153. Grogan, S. P., S. Miyaki, H. Asahara, D. D. D'Lima and M. K. Lotz (2009). "Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis." *Arthritis Res Ther*11(3): R85.
154. Salamon, A., A. Jonitz-Heincke, S. Adam, J. Rychly, B. Müller-Hilke, R. Bader, K. Lochner and K. Peters (2013). "Articular cartilage-derived cells hold a strong osteogenic differentiation potential in comparison to mesenchymal stem cells in vitro." *Exp Cell Res*319(18): 2856-2865.
155. Isakova, I. A., K. Baker, M. DuTreil, J. Dufour, D. Gaupp and D. G. Phinney (2007). "Age-and dose-related effects on MSC engraftment levels and anatomical distribution in the central nervous systems of nonhuman primates: identification of novel MSC subpopulations that respond to guidance cues in brain." *Stem Cells*25(12): 3261-3270.
156. Isakova, I. A., J. Dufour, C. Lanclos, J. Bruhn and D.G. Phinney (2010). "Cell-dose-dependent increases in circulating levels of immune effector cells in rhesus macaques following intracranial injection of allogeneic MSCs." *Exp Hematol*38(10): 957-967.e951
157. Ghadge, S. K., S. Mühlstedt, C. Ozcelik and M. Bader (2010). "SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction." *Pharmacol Ther*
158. Gyöngyösi, M., A. Posa, N. Pavo, R. Hemetsberger, H. Kvakan, S. Steiner-Böker, Z. Petrási, F. Manczur, I. J. Pavo, I. F. Edes, J. Wojta, D. Glogar and K. Huber (2010). "Differential effect of ischaemic preconditioning on mobilisation and recruitment of haematopoietic and mesenchymal stem cells in porcine

- myocardial ischaemia-reperfusion." *Thromb Haemost*104(2): 376-384.
159. Ai, H., H. Bai, C. B. Wang, J. F. Ou, Q. Zhao, X. Han, Z. Chen and X. Y. Hu (2011). "[Expression Characteristics of SDF-1 Receptor CXCR4 in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Tissue]." *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*19(1): 169-173.
160. Taichman, R. S., C. Cooper, E. T. Keller, K. J. Pienta, N. S. Taichman and L. K. McCauley (2002). "Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone." *Cancer Res*62(6): 1832-1837.

9 DIFUSIÓN DE RESULTADOS
