



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MÁSTER EN: ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

**ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA**

Curso académico 2011-12

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Diferenciación *in vitro* de células madre  
aisladas de médula ósea humana sobre  
biomateriales de colágeno.**

**Clara Sanjurjo Rodríguez**

**Fecha de presentación del trabajo: 30 de Mayo de 2012**

Trabajo fin de máster dirigido por: Dra. Silvia M<sup>a</sup> Díaz Prado.

**Diferenciación *in vitro* de células madre aisladas de médula ósea humana sobre biomateriales de colágeno.**

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR.</b>	<b>6</b>
1.1 ESTRUCTURA.	6
1.2. COMPOSICIÓN DEL CARTÍLAGO HIALINO.	7
1.3. FUNCIÓN DEL CARTÍLAGO HIALINO.	8
1.4. INTEGRIDAD DEL CARTÍLAGO.	8
<b>2. ARTROSIS.</b>	<b>9</b>
2.1. PREVALENCIA.	9
2.2 TRATAMIENTO.	10
<b>3. TERAPIA CELULAR E INGENIERÍA TISULAR.</b>	<b>10</b>
3.1. TERAPIA CELULAR.	10
3.2. INGENIERÍA TISULAR.	12
<b>4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.</b>	<b>13</b>
<b>5. BIOMATERIALES.</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
<b>1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.</b>	<b>18</b>
1.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.	18
1.2. EXTRACCIÓN DEL CONJUNTO CELULAR PRESENTE EN LA MÉDULA ÓSEA.	18
1.3. AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.	19
<b>2. CULTIVO EN MONOCAPA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.</b>	<b>19</b>
<b>3. OBTENCIÓN DE LOS BIOMATERIALES.</b>	<b>20</b>
<b>4. CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LOS BIOMATERIALES.</b>	<b>20</b>
4.1. AGRUPACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.	20
4.2. SIEMBRA DEL GRUPO CELULAR EN LOS BIOMATERIALES.	20
4.3. CULTIVO.	21
<b>5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.</b>	<b>21</b>
<b>6. ESTUDIO DE LA MULTIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.</b>	<b>22</b>
6.1. ESTIMULACIÓN ADIPOGÉNICA.	22
6.2. ESTIMULACIÓN OSTEOGÉNICA.	23
6.3. ESTIMULACIÓN CONDROGÉNICA.	24
<b>7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y CITOLÓGICO.</b>	<b>25</b>
7.1. VALORACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CMMS-MOH CULTIVADAS EN MONOCAPA.	25
7.2. CÉLULAS DIFERENCIADAS EN CULTIVO SOBRE BIOMATERIALES.	26
<b>8. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN.</b>	<b>28</b>
8.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS CÉLULAS EN MONOCULTIVO.	28
8.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS CÉLULAS CULTIVADAS SOBRE BIOMATERIALES.	28
8.3. CUANTIFICACIÓN DEL ARN.	28
8.4. SÍNTESIS DEL ADNC.	29

8.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE <i>PCR</i> EN TIEMPO REAL.	29
<b>9. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.</b>	<b>31</b>
<b>10. ENSAYOS DE ELISA.</b>	<b>32</b>
10.1. ELISA PARA LA DETECCIÓN DE COLÁGENO.	32
10.2. ELISA PARA LA DETECCIÓN DE GLUCOSAMINOGLUCANOS Y PROTEOGLUCANOS SULFATADOS.	32
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.</b>	<b>33</b>
1.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.	33
1.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.	33
1.3. POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA.	35
<b>2. CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA SOBRE BIOMATERIALES.</b>	<b>38</b>
2.1. CRECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA SOBRE LOS BIOMATERIALES.	38
2.2. ANÁLISIS CITOLÓGICO/HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DE LOS BIOMATERIALES CULTIVADOS.	42
2.3. EXPRESIÓN GÉNICA	53
2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	56
2.5. ENSAYOS DE ELISA.	64
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>71</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>86</b>

## **RESUMEN**

### Objetivos

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la idoneidad de diferentes biomateriales de colágeno como posibles soportes de ingeniería tisular, para el tratamiento de lesiones cartilaginosas.

### Metodología

Se aislaron células madre mesenquimales de la médula ósea humana (CMMs-MO<sub>h</sub>), de varios donantes, y se expandieron *in vitro*. Tras obtener un número suficiente de células, se formó un conjunto celular y se sembró sobre los biomateriales, con un medio de estimulación de la diferenciación condrogénica. Tras 30 días de estimulación se testó el crecimiento y diferenciación mediante microscopía electrónica, técnicas histológicas, técnicas inmunohistoquímicas y biología celular.

### Resultados

Todos los biomateriales presentaron crecimiento y proliferación celular. En todos los biomateriales tuvo lugar diferenciación condrogénica de las CMM-MO<sub>h</sub>, en mayor o menor medida.

### Conclusiones

Todos los biomateriales permitieron el crecimiento y proliferación de las CMMs-MO<sub>h</sub>, pero sólo en el biomaterial C1C2HS se observó formación de tejido con características similares a cartílago. Futuros estudios permitirán determinar si éste biomaterial es adecuado para la reparación de cartílago articular.

## INTRODUCCIÓN

### 1. El cartílago articular.

#### 1.1 Estructura.

El cartílago hialino es un tejido especializado derivado del mesénquima durante el desarrollo embrionario [1]. Al final del crecimiento la masa de cartílago consiste en condrocitos atrapados en una gran cantidad de matriz extracelular (MEC) [2], formando diferentes capas, y que se encuentra anclado al hueso subcondral [3] (Figura 1A).

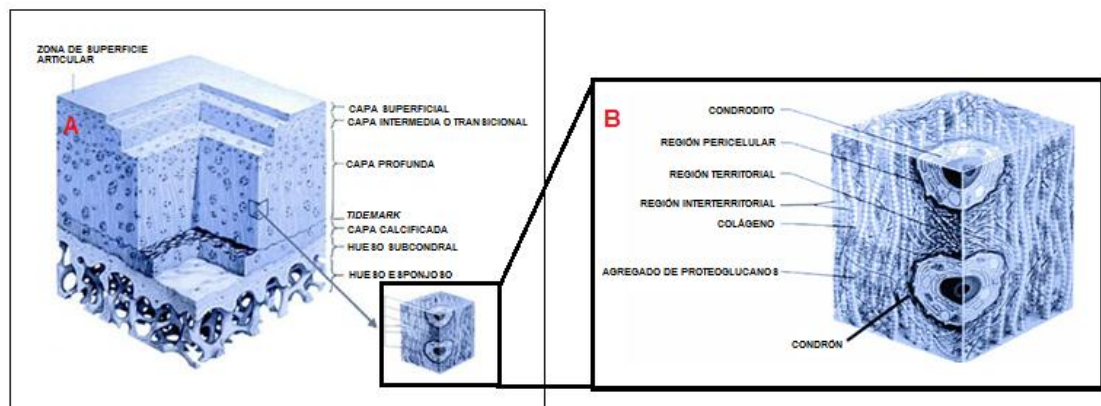


Figura 1: Representación esquemática de la estructura del cartílago hialino. (Imagen adaptada de [4] con modificaciones). A) Distribución celular en el cartílago hialino. B) El condron, subunidad funcional del cartílago.

Los condrocitos son las células características del cartílago, su forma es redondeada y en el tejido se encuentran alojadas en cavidades denominadas condromas o condrones (Figura 1B). Son responsables de la síntesis de la matriz que les rodea, una red de colágenos, glucosaminoglucanos (GAG) y glucoproteínas (Figura 1B). Además secretan numerosas citocinas y factores que contribuyen a su crecimiento, proliferación y diferenciación [3].

Este cartílago carece de vasos sanguíneos y consecuentemente el intercambio de metabolitos entre los condrocitos y los tejidos circundantes depende de la difusión a través de la sustancia fundamental. Esto limita el espesor que el cartílago puede desarrollar para el mantenimiento de la viabilidad de las células más internas [2].

El cartílago hialino se encuentra sobre las superficies óseas de las articulaciones sinoviales [5] (Figura 2).

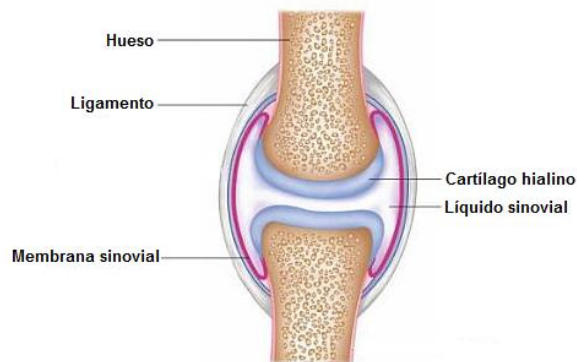


Figura 2: Disposición del cartílago en una articulación sinovial típica. Imagen modificada de [5].

### 1.2. Composición del cartílago hialino.

Los condrocitos suponen entre el 1-2% del volumen total del cartílago [3].

El colágeno es el mayor componente fibrilar de la MEC, constituyendo sobre el 20-30% del total [6], del cual el colágeno tipo II (Col II) forma el 90%-95% del total de colágeno [7].

Los proteoglicanos (Figura 3) se disponen en agregados, formando la sustancia fundamental, dando solidez y flexibilidad al cartílago. Los GAG sulfatados (condroitín-sulfato y keratán sulfato) predominan en los agregados de proteoglicanos, con moléculas de GAG no sulfatados (ácido hialurónico) [2].

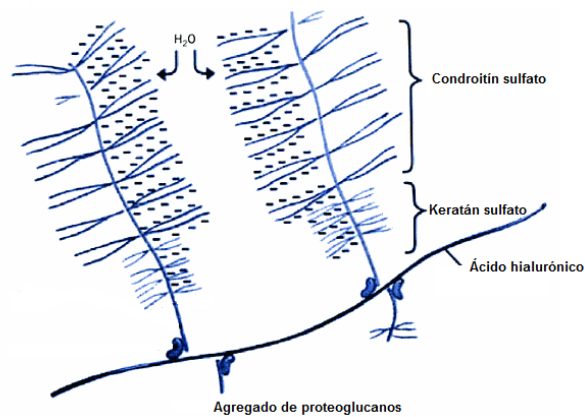


Figura 3: Proteoglicanos del cartílago hialino. Imagen modificada de [4].

### 1.3. Función del cartílago hialino.

El cartílago articular ofrece una superficie lisa y lubricada para un continuo movimiento de deslizamiento, absorbe golpes, y distribuye la carga al hueso [8].

### 1.4. Integridad del cartílago.

El condrocito desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la MEC del cartílago. Cualquier desequilibrio en el balance biológico del cartílago perjudica su integridad, lo convierte en más frágil y favorece la pérdida de este tejido [3].

El cartílago articular tiene una capacidad muy limitada para la autorreparación intrínseca. Dado que el tejido es avascular, una lesión no provoca la respuesta de “cicatrización de herida” típica, caracterizada por la inflamación e invasión de células mesenquimales indiferenciadas [8]. El proceso de reparación progresa hacia la formación de un tejido fibrocartilaginoso [9] que, debido a su composición bioquímica, no tiene la resistencia y la capacidad de deformación bajo carga típica de cartílago hialino [7].

Otros factores que explican la poca capacidad para la autorreparación del cartílago son: la baja actividad metabólica, incapacidad de los condrocitos



residentes para migrar al defecto debido a la presencia de la MEC y la baja celularidad [7].

## 2. Artrosis.

La artrosis (OA) es una enfermedad degenerativa de las articulaciones caracterizada por el deterioro de la integridad del cartílago hialino y el hueso subcondral subyacente [10] (Figura 4).

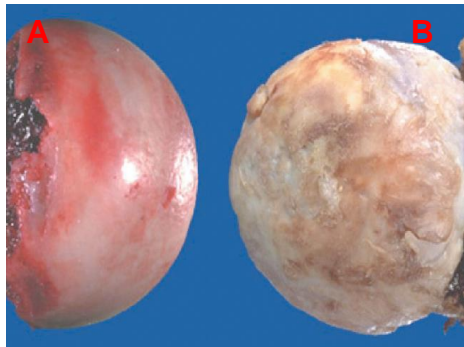


Figura 4: Imagen comparada de cabezas femorales A) No OA B) OA.

Su patogenia está relacionada con el envejecimiento y la lesión del cartílago articular. La OA se caracteriza por dolores articulares crónicos con grados diversos de deformidad de las articulaciones y de destrucción del cartílago articular [11].

Finalmente, el tejido óseo subcondral expuesto se convierte en la nueva superficie articular (Figura 4). Estos cambios determinan una reducción progresiva de la movilidad y un aumento del dolor con los movimientos articulares [11].

### 2.1. Prevalencia.

La OA es la patología articular más prevalente y la que con más frecuencia causa discapacidad. La incidencia de OA está directamente relacionada con la edad y se espera su incremento junto con el aumento de la edad media de la población [12]. La mayoría de las personas muestran algún indicio de esta enfermedad a los 65 años [11] y es la cuarta causa principal de “años vividos con discapacidad total” (AVD), lo que representa el 3% del global de AVD [13].

## 2.2 Tratamiento.

En la actualidad no existen tratamientos farmacológicos efectivos para curar la OA, aunque algunos medicamentos ralentizan su progresión [14].

La terapia celular empleando células madre mesenquimales (CMMs) o condrocitos diferenciados (implantación de condrocitos autólogos) es una opción terapéutica para la reparación de lesiones del cartílago articular [15].

## 3. Terapia celular e ingeniería tisular.

### 3.1. Terapia celular.

La terapia celular es una técnica, relativamente nueva, que se basa en la regeneración de un tejido dañado mediante el tratamiento con células.

Numerosos protocolos de terapia celular han sido propuestos para reparar el tejido cartilaginoso pero los resultados, sobre todo a largo plazo, han sido insatisfactorios [7, 14, 16].

#### 3.1.1. Empleo de condrocitos en terapia celular:

Una de las técnicas utilizadas para la regeneración de cartílago ha sido el implante de condrocitos autólogos (Figura 5). Este procedimiento consiste en obtener por artroscopia explantes de cartílago articular (Figura 5A), del paciente, de zonas poco comprometidas con la carga. Se aíslan y cultivan los condrocitos hasta obtener el número apropiado y finalmente se inyectan en la cavidad de la lesión condral (Figura 5B), cerrándola con el periostio (Figura 5C) del propio paciente [16].



Figura 5: Autotrasplante de condrocitos. A) Toma de biopsia. B) Cóndilo femoral con lesión condral. C) Cavity del defecto, cerrada con periostio, en donde se inyecta la suspensión de condrocitos. Imagen modificada del artículo [16].

El uso de esta técnica presenta desventajas:

- Sólo se recomienda esta técnica a pacientes menores de 55 años [16].
- El implante de condrocitos autólogos presenta la desventaja de que la toma de la biopsia mediante artroscopia, en una zona articular sana, puede generar una lesión que derive en OA [3]; esto supone una intervención quirúrgica adicional con daño añadido a la superficie articular [16].
- El tamaño de la lesión no debe ser superior a 10 cm<sup>2</sup> [16].
- Existe riesgo de fracaso funcional a corto plazo [16].
- Tiempo de cultivo *in vitro* demasiado largo, con posibilidad de contaminaciones [16].
- Dificultad del mantenimiento del fenotipo del condrocito *in vitro*, ya que el condrocito tiene una propensión a desdiferenciarse a un fenotipo de fibroblasto después de un cultivo prolongado (múltiples pases) *in vitro*

[17]. Una vez que se han liberado de su matriz, no son capaces de expresar los genes para agreganos y Col II, moléculas fundamentales para la síntesis de cartílago hialino [3].

### 3.1.2. Empleo de células madre mesenquimales en terapia celular:

Otra de las técnicas utilizadas es el implante de CMMs, cuya eficacia se ha demostrado en la reparación de defectos osteocondrales [3].

La ingeniería tisular mediada por CMMs es un tratamiento alternativo experimental con el potencial para inducir la regeneración del tejido hacia un cartílago hialino sano, aliviar el dolor y restaurar la función normal [8].

### 3.2. Ingeniería tisular.

Los estudios sobre el cartílago han avanzado hacia una nueva disciplina, la ingeniería tisular. Ésta es la ciencia encargada de generar sustitutos de órganos y tejidos que se han perdido o bien han resultado dañados [3]. El diseño y la fabricación de estos sustitutos tisulares se basan en células, biomateriales o ambos de forma conjunta, para que asuman todas las propiedades del tejido u órgano a sustituir [3,18]

Las células, los biomateriales y las señales de estimulación del crecimiento son los componentes clave para la ingeniería tisular. Los biomateriales, típicamente fabricados con polímeros naturales o sintéticos, proveen un soporte estructural para la adhesión celular y subsecuentemente para el desarrollo tisular [19].

Nuevos métodos de ingeniería tisular para las lesiones de cartílago se basan en el uso de biomateriales biodegradables en combinación con CMMs estromales derivadas de médula ósea (MO) [9].

El principio general consiste en seleccionar células madre y permitirles crecer y diferenciarse en un soporte adecuado para producir el tejido que necesita ser reparado. El proceso de formación de cartílago por medio de ingeniería tisular tiene 3 objetivos [7]:

- Incrementar el número de células para alcanzar el número necesario para reparar el defecto del cartílago.
- Obtener el fenotipo correcto
- La tridimensionalidad del producto y el tamaño debe ser adecuado para el tipo de defecto articular.

#### 4. Células madre mesenquimales.

De acuerdo a la propuesta de la *International Society for Cellular Therapy*, las CMMs son células progenitoras multipotentes no hematopoyéticas, localizadas dentro del estroma de la MO y otros órganos, que son fenotípicamente caracterizadas por la expresión de varios marcadores moleculares de superficie (ej. CD73, CD90 y CD105) y por la falta de expresión de otros marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45. Además, tienen la característica de que pueden ser aisladas mediante adherencia al plástico y pueden ser expandidas *ex vivo* [20].

Estas células, conocidas como CMMs o células medulares estromales, pueden ser aisladas y propagadas por clonaje *in vitro*. Se ha demostrado que tienen la capacidad de diferenciarse hacia varias líneas celulares, algunas de las cuales generan osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Figura 6) dependiendo de los factores de crecimiento que se usen para su estimulación [17].

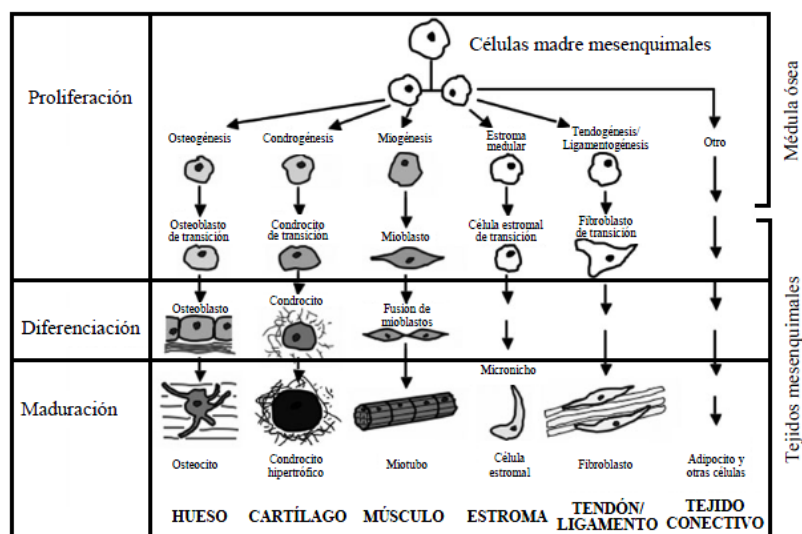


Figura 6: Esquema de diferenciación de las CMMs. Imagen modificada de [21].

Estas características son idóneas en medicina reparativa y en terapia celular [3].

Las CMMs son un tipo celular cada vez más utilizado en investigación por su gran versatilidad y potencial uso en clínica. El método celular más utilizado es el del cultivo celular, que nos permite obtener una población suficientemente numerosa y homogénea para realizar varias técnicas y ensayos [3].

La población de CMMs contiene condroprogenitores capaces de proliferar y diferenciarse *in vitro* en presencia de factores específicos como el factor de crecimiento transformante beta 3 humano (*hTGFβ*) que aumentan de manera significativa la frecuencia de formación del tejido [22].

## 5. Biomateriales.

El uso de biomateriales hace posible la mejora del implante celular, su reproducción y diferenciación, y físicamente mantiene las células en el área de la reparación [7], pudiendo actuar como una barrera ante la invasión del injerto por fibroblastos [23].

El mejor biomaterial para ingeniería tisular sería la MEC del tejido diana en su estado nativo. Sin embargo, las múltiples funciones, la composición compleja y la naturaleza dinámica de la MEC en los tejidos nativos dificultan la creación de una imitación exacta [19].

Los biomateriales tienen que presentar las siguientes funciones y características [19]:

- Proporcionar espacios para una nueva formación de tejido y remodelación, para facilitar la integración del tejido en el huésped tras la implantación.
- La estructura debe de ser lo suficientemente porosa para el transporte eficiente de nutrientes y metabolitos.
- Deben ser degradables tras la implantación a una velocidad pareja a la producción de nueva matriz para el desarrollo del tejido.
- Estos soportes deben permitir la proliferación celular y la producción de matriz, la cual al mismo tiempo garantiza la nutrición.
- Presentar compatibilidad celular y tisular tanto para células ajenas aplicadas o endógenas para su unión.
- Ser bioactivos: pueden incluir señales biológicas o señales físicas como la topografía para influir en la morfología celular y el alineamiento.
- Tener propiedades mecánicas que permitan la estabilidad, propiedad que depende también de la forma del biomaterial.

Un problema que surge con el empleo de materiales naturales es su limitada estabilidad física y mecánica y, por tanto, puede no ser adecuado para algunas aplicaciones de carga. Otro problema es que puedan provocar una respuesta inmune en el huésped [19].

Los biomateriales tienen distinta influencia en el metabolismo de las células huésped y, por lo tanto, la calidad del cartílago sintetizado va a variar en función del biomaterial elegido [24]. Biomateriales con buena

biocompatibilidad y que mejoran la viabilidad celular son los biomateriales de colágeno, sólo o combinado con otros componentes típicos de la MEC del cartílago. El colágeno además de ser un material biocompatible y biodegradable, puede ser reconstituido a estructuras fibrosas estimulando la MEC nativa en los tejidos [19].



## OBJETIVOS

### Objetivo general de este estudio:

Evaluación de la capacidad condrogénica de las CMMs-MOh, sobre diferentes biomateriales de colágeno, para la formación de constructos útiles en la ingeniería tisular del cartílago.

### Objetivos específicos:

1. Obtención y aislamiento de las CMMs-MOh.
2. Comprobación de que las células obtenidas de la médula ósea humana sean CMMs, mediante caracterización fenotípica y diferenciación celular *in vitro*.
3. Evaluar la capacidad del biomaterial como soporte para el crecimiento de CMMs-MOh.
4. Evaluar la capacidad de las CMMs-MOh de diferenciarse sobre el biomaterial, para formar un neot Tejido de propiedades similares a las del cartílago.
5. Valorar histológicamente, bioquímicamente y genéticamente las células de los constructos formados a partir de los diferentes biomateriales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Obtención de muestras y aislamiento de células madre mesenquimales.

#### 1.1. Obtención de muestras.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC de Galicia) y todas las muestras incluidas en él han obtenido el consentimiento informado (Anexo 1) de cada donante. En este estudio, las muestras analizadas comprendieron 14 cabezas femorales procedentes del Banco de Tejidos del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC).

El procesado de las muestras se realizó en el laboratorio de Cultivo Celular del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

#### 1.2. Extracción del conjunto celular presente en la médula ósea.

La extracción celular (Figura 7) se realizó mediante lavados de la MO de cada cabeza femoral. Para ello se sujetaron las cabezas femorales (Figura 7A) y se les inyectó en la MO medio de cultivo, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM*; Lonza, España) suplementado al 5% (*DMEM 5%*) con suero bovino fetal (SBF; Gibco, España), con una jeringa de 20 ml (Kendall Monoject Syringe, Estambul, Turquía) y una aguja de bisel ancho (*BD Microbalance<sup>TM</sup>3*, Oxford, Irlanda) (Figura 7B). Se recogió el medio de cultivo con las células en suspensión (Figura 7 C y D) y se hizo pasar por un filtro de nylon de 41µm de tamaño de poro (Millipore, Irlanda) (E y F). Se centrifugó (Figura 7G) para obtener las células en un precipitado (Figura 7H), se eliminó el sobrenadante mediante decantación (Figura 7I) y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo *DMEM* suplementado al 20% (*DMEM 20%*) con SBF (Figura 7 J y K). Se sembró (Figura 7L) en frascos de cultivo (*Costar Corning Incorporated*, E.E.U.U.) de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> ó 162 cm<sup>2</sup>, dependiendo de la cantidad de precipitado, y se introdujeron en una estufa a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.



Figura 7: Extracción de células de la MO de la cabeza femoral. A) Sujeción de la cabeza femoral. B) Inyección del medio de cultivo en la MO. C y D) Recogida de la suspensión.

E y F) Filtración de la suspensión. G) Centrifugación del filtrado. H) El precipitado obtenido. I) Eliminación del sobrenadante. J) Resuspensión del precipitado. K) Adición de medio de cultivo al precipitado resuspendido. L) Sembrado de las células en frascos de cultivo.

Para aislar las CMMs-MOh, transcurridas 48 horas se realizó un lavado con suero salino (Fresenius Kabi, España) y se reemplazó el medio de cultivo, eliminándose las células no adherentes.

## 2. Cultivo en monocapa de células madre mesenquimales.

A los frascos de cultivo con las células sembradas, se les cambió el medio *DMEM* 20% cada 3 días y fue necesario realizar subcultivos para aumentar el área de cultivo, cuando la confluencia celular se aproximaba al 80%. Para ello, se retiró el medio, se lavó con suero salino y se incubó con tripsina-EDTA (Sigma Aldrich Química S.A., España) a 37°C. Se comprobó, en un microscopio invertido IX51 (Olympus España S.A., España), que las células no seguían adheridas al frasco de cultivo. Se inactivó la tripsina con medio *DMEM* 5% y se dejó 15 min. a 37°C para

que otros posibles tipos celulares (ej. fibroblastos y macrófagos), con mayor rapidez de adherencia, se quedaran unidos al frasco de cultivo. Se recogió la suspensión y se centrifugó. El precipitado de CMMs se resuspendió en medio de cultivo *DMEM* 20% y se sembró en un frasco de mayor área o en varios frascos, para su expansión.

Tras 4 semanas en cultivo en monocapa, se obtuvo el número suficiente de CMMs para la caracterización celular, el estudio de la multipotencialidad y para su cultivo sobre biomateriales. Para su manipulación se resuspendieron y se hizo una estimación del número aproximado realizando contajes en una cámara *Neubauer* (Marienfeld, Alemania), empleando un microscopio invertido.

### 3. Obtención de los biomateriales.

Los biomateriales fueron suministrados por la empresa italiana *Opocrin, S.P.A., Corlo di Formigine-Modena*. Para este estudio se obtuvieron 5 soportes de colágeno diferentes: colágeno I + colágeno II (C1C2), colágeno I + colágeno II+ heparán sulfato (C1C2HS), colágeno I + colágeno II + condroitín sulfato (C1C2CHS), colágeno I + heparina de bajo peso molecular (C1-OLH3) y colágeno I + condroitín sulfato (C1CHS).

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

#### 4.1. Agrupación de las células madre mesenquimales.

Las CMMs-MOh de 7 donantes se juntaron para formar un grupo celular y evitar así sesgos debidos a la variabilidad celular.

#### 4.2. Siembra del grupo celular en los biomateriales.

En dos placas estériles de 24 pocillos (*Costar Corning Incorporated*) se introdujeron, de manera independiente, 5 tipos de biomateriales de 1cm<sup>2</sup>. De cada biomaterial se incluyeron para cultivo 5 réplicas y 1 réplica

control sin células. Se sembraron, del grupo celular,  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> de biomaterial.

#### 4.3. Cultivo.

A cada pocillo se le añadió medio condrogénico de diferenciación (Figura 8A) *hMSC Commercial Chondrogenic Differentiation Medium* (Lonza, Biowhittaker, Bélgica), suplementado con 10 ng/ml de *hTGF- $\beta$ 3* (*ProSpec-Tany Technogene Ltd.*, Rehovot, Israel). Cada 3 días se recogió el sobrenadante de cada pocillo (Figura 8B) y se cambió por nuevo medio condrogénico. Los sobrenadantes retirados, en cada cambio de medio de cultivo, se congelaron en tubos independientes a -20°C.

Tras 30 días de diferenciación, se recogieron los biomateriales para realizar análisis histológico/citológicos, análisis de expresión génica y ensayos de Elisa.

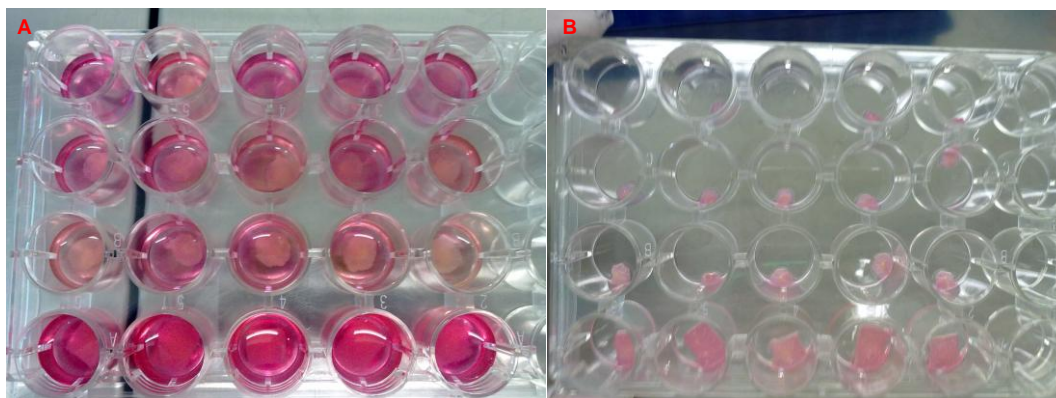


Figura 8: Cultivo en placa de CMMs-MOH sobre biomateriales. A) Adición del medio de diferenciación condrogénico. B) Recogida del sobrenadante de los pocillos.

5. Caracterización fenotípica, de las células madre mesenquimales, mediante citometría de flujo.

Se realizó, mediante citometría de flujo, el análisis de la expresión de los marcadores de superficie celular en muestras de 4 donantes, estudiando los siguientes marcadores: CD29, CD34, CD44, CD45, CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD166, CD271, STRO-1 y SSEA-4.

Se resuspendieron, de manera independiente, las CMMs-MOH de cada donante en tampón *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)*; BD Biosciences). En una placa de 96 pocillos (NUNC™, VWR International, Dinamarca) se colocaron  $2 \times 10^5$  células/pocillo. Se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se homogeneizó la suspensión celular en un agitador. Se añadieron los anticuerpos (Ac) 1<sup>os</sup> para cada marcador, en diferentes pocillos, siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales (Tabla 1, Anexo 2) y se incubaron durante 40 min a 4°C en oscuridad.

Tras la incubación, se realizaron dos lavados con tampón *FACS* junto con 2 centrifugaciones. Se realizó una segunda incubación de 30 min a 4°C en oscuridad en aquellos pocillos en los que era necesaria la adición del Ac 2<sup>o</sup> *polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/FITC Rabbit F(ab')<sub>2</sub>* (Dako Cytomation, E.E.U.U.). Se realizaron otros dos lavados con *FACS* y se traspasaron las células, en un volumen final de 200 µl, a tubos de citometría. Las 4 muestras se analizaron en un citómetro *FACSCalibur* (BD Biosciences) y los resultados obtenidos se procesaron utilizando el programa informático *CellQuest* (BD Biosciences).

La expresión de los marcadores de superficie celular se consideró positiva sólo cuando la presencia en la población fue superior al 2,5%.

## 6. Estudio de la multipotencialidad de las células madre mesenquimales.

Para la caracterización de la multipotencialidad se cultivó el grupo celular de CMMs-MOH en diferentes medios de cultivo, para favorecer su diferenciación hacia 3 linajes mesenquimales diferentes: adipocitos, osteoblastos y condrocitos.

### 6.1. Estimulación adipogénica.

Para testar histológicamente la diferenciación adipogénica se sembraron CMMs-MOH del grupo celular,  $33 \times 10^3$  células/pocillo en una cámara de ocho pocillos para microscopía (BD Falcon, Francia). Las células se cultivaron en monocapa en 3 pocillos. Se cultivaron células, en otro pocillo

de la cámara, en medio de cultivo *DMEM* 20% a modo de control negativo.

Para testar la expresión de genes propios de los adipocitos se sembraron  $25 \times 10^4$  CMMs-MOH/pocillo en una placa de 6 pocillos (*Costar Corning Incorporated*). Las células se cultivaron en monocapa en 2 pocillos para la estimulación adipogénica y en otros 2 como controles negativos.

Durante 21 días se trataron las células a estimular con un *kit* adipogénico comercial *Bullekit Adipogenic Differentiation Medium* (Lonza). Este *kit* está compuesto de dos medios de cultivo diferentes: un medio de inducción adipogénico y un medio de mantenimiento adipogénico. Se comenzó la estimulación celular con el medio de inducción y se realizaron cambios de medio cada 3 días, alternando el tipo de medio. Los controles negativos se mantuvieron con medio de cultivo *DMEM* 20%.

Tras 21 días, se eliminó el medio de estimulación y el medio de cultivo *DMEM* 20% de las cámaras de 8 pocillos para microscopía, se lavaron con suero salino y se realizó una fijación con paraformaldehído al 4% (Panreac Química S.A., España), de los 4 pocillos. Una vez fijadas, las células estimuladas y las células control, se tiñeron.

En la placa de 6 pocillos se eliminó el medio de estimulación y el medio *DMEM* 20%, se lavó con suero salino y se comenzó la extracción de ARN de las células.

## 6.2. Estimulación osteogénica.

Para testar histológicamente la diferenciación osteogénica se sembraron CMMs-MOH del grupo celular,  $33 \times 10^3$  células/pocillo en una cámara de ocho pocillos para microscopía. Las células se cultivaron en monocapa en 3 pocillos. Se cultivaron células, en otro pocillo de la cámara, en presencia de medio de cultivo *DMEM* 20% a modo de control negativo.

Para testar la expresión de genes propios de los osteoblastos, se sembraron  $25 \times 10^4$  CMMs-MOh/pocillo en una placa de 6 pocillos. Las células se cultivaron en monocapa en 2 pocillos para la estimulación osteogénica y en otros 2 como controles negativos.

Durante 21 días se trataron las células a estimular con un medio osteogénico comercial *hMSC Bullekit Osteogenic Differentiation Medium* (Lonza). Se realizaron cambios de medio cada 3 días. En los controles, las células se mantuvieron con medio de cultivo *DMEM* 20%.

Después de 21 días se realizó la fijación de las células y se tiñeron.

En la placa de 6 pocillos se inició la extracción de ARN de las células.

### 6.3. Estimulación condrogénica.

Para testar mediante histoquímica la diferenciación condrogénica se introdujeron  $25 \times 10^4$  CMMs-MOh del grupo celular en tubos con fondo cónico de poliestireno (J.C. Catalán S.L., España). Se incluyeron 4 réplicas para estimulación condrogénica y 2 réplicas como control negativo que se cultivaron en medio de cultivo *DMEM* 20%. Se centrifugaron para facilitar la formación de un microprecipitado o micromasa. La formación de este agregado tridimensional por parte de las células facilita la comunicación celular y por tanto la formación de MEC.

Para testar la expresión génica, se sembraron  $25 \times 10^4$  CMMs-MOh/pocillo en una placa de 6 pocillos. Las células se cultivaron en monocapa: en 2 pocillos para la estimulación condrogénica y en otros 2 como controles negativos.

Tanto en los tubos como en la placa, a las réplicas de estimulación se les añadió medio condrogénico de diferenciación *hMSC Commercial Chondrogenic Differentiation Medium*, suplementado con 10 ng/ml de *hTGF- $\beta$ 3*. Cada 3 días se reemplazó el medio, siempre previa centrifugación.



A los controles negativos se les añadió medio de cultivo *DMEM* 20% y también se reemplazó cada 3 días, previa centrifugación.

Las micromasas y la placa se mantuvieron en cultivo durante 21 días.

Una vez transcurrido este tiempo, las micromasas se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se cortaron en el microtomo. A los cortes se les realizaron tinciones histoquímicas e inmunohistoquímica.

En la placa de 6 pocillos se inició la extracción de ARN de las células.

## 7. Análisis histológico y citológico.

Este análisis se realizó en los Servicios Centrales de Histomorfología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

### 7.1. Valoración de la diferenciación de las CMMs-MOH cultivadas en monocapa.

#### 7.1.1. Diferenciación adipogénica.

Se realizó una tinción *Oil-Red-O* (Sigma, E.E.U.U.). Se observó la tinción en un microscopio Olympus BX61 (Olympus España S.A.) equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus España S.A.).

Esta tinción permite valorar la presencia de vacuolas lipídicas. Se consideraron positivas aquellas que presentaron coloración rojo-naranja.

#### 7.1.2. Diferenciación osteogénica.

Se realizó una tinción Rojo Alizarina (Merck, Alemania). Se observó la tinción en un microscopio Olympus BX61, equipado con una cámara digital Olympus DP70.

Esta tinción permite valorar la presencia de depósitos de calcio. Se consideraron positivas aquellas que presentaron coloración roja.

### 7.1.3. Diferenciación condrogénica.

A los cortes obtenidos en el microtomo se les realizaron tinciones con:

- Hematoxilina-Eosina (H-E): para una valoración general de la morfología celular. Tiñe de azul los núcleos y de rosa el citoplasma celular.
- Tricrómico de Masson modificado (MM): para una valoración de la morfología celular y para la detección de colágeno. Tiñe los núcleos de azul-negro, de rosa el citoplasma y el colágeno de azul.
- Azul Alcían (AA): para la detección de proteoglicanos. Presentan positividad en color azul.
- Safranina O (SO): para la detección de proteoglicanos. Positividad de color rojo-naranja.
- Azul de Toluidina (AT): para la detección de proteoglicanos. Positividad de color azul.

Además, se realizó inmunohistoquímica directa sobre los cortes para la detección de colágeno de tipo I (Col I), tipo II (Col II), tipo X (Col X), metaloproteinasa 13 (MMP-13) y agreganos (*Aggrecan* C-20), componentes típicos de la MEC del cartílago.

Se observaron en un microscopio Olympus BX61, equipado con una cámara digital Olympus DP70.

Para determinar el grado de tinción/presencia se utilizó una escala cualitativa de 4 valores: negativo o ausencia (-), levemente positivo o presencia débil (+), positivo o presencia (++) y muy positivo o mucha presencia (+++).

### 7.2. Células diferenciadas en cultivo sobre biomateriales.

De cada tipo de biomaterial cultivado se destinó una réplica para microscopía electrónica de barrido (MEB), otra réplica para microscopía electrónica de transmisión (MET) y otra para tinciones histológicas. Los

biomateriales sin células se dividieron en 3 y se destinaron para lo mismo, a modo de control. Las 2 réplicas restantes, de cada biomaterial cultivado, se destinaron a biología molecular.

El procesado de muestras de microscopía electrónica se realizó en las instalaciones del *Servizo de Apoio á Investigación* (SAI) de la *Universidade da Coruña*, bajo la supervisión del personal responsable de la Unidad de microscopía: Dras. Ada Castro Couceiro y Catalina Sueiro López.

#### 7.2.1. Tinciones histológicas.

Tanto los biomateriales con células como los controles sin células fueron deshidratados, incluidos en parafina y cortados en un microtomo. A los cortes se les realizaron tinciones con H-E y MM e inmunohistoquímica directa para la detección de Col I, Col II y de un marcador de proliferación celular (*Proliferating cell nuclear antigen, PCNA*).

#### 7.2.2. Microscopía electrónica de transmisión.

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

#### 7.2.3. Microscopía electrónica de barrido.

A los biomateriales con células y a los biomateriales control sin células se les realizaron varios lavados con suero salino. Se fijaron con tampón cacodilato y glutaraldehído al 3% diluido en tampón cacodilato. Las

muestras se tiñeron con  $\text{OsO}_4$  y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, ya que éste es miscible con el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y, el  $\text{CO}_2$  se eliminó en un equipo de deshidratación en punto crítico Bal-Tec CPD 030 (Balzers, Alemania). Posteriormente, se realizó una metalización en oro con un equipo de electrodeposición catódica Bal-Tec SCD 004 (Balzers). Las muestras se observaron en un MEB JSM 6400 (JEOL), para un análisis morfométrico de las CMMs-MOH diferenciadas sobre cada biomaterial.

## 8. Obtención y análisis de ARN.

### 8.1. Extracción de ARN de las células en monocultivo.

El ARN se extrajo con Trizol (Invitrogen, España) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

### 8.2. Extracción de ARN de las células cultivadas sobre biomateriales.

Los biomateriales se trocearon, se introdujeron en tubos junto con bolas de circonio y se congelaron en nitrógeno líquido. Los tubos se metieron en un soporte para introducirlos en un molino de bolas para la desintegración y homogeneización. Se realizaron 2 ciclos de 90 segundos con una frecuencia de agitación de 25/seg, congelando de nuevo en nitrógeno líquido entre ciclos. Una vez disgregados los biomateriales y tras la rotura celular, se añadió Trizol y se realizó la extracción de ARN.

### 8.3. Cuantificación del ARN.

Para cuantificar el ARN se hicieron mediciones de la absorbancia (Abs) a 280 nm, 260nm y 230nm en el espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific, España). Los resultados de concentración, Abs 260/280 y Abs 260/230 se obtuvieron con el programa informático Nanodrop 1000 3.7.1. Estas Abs relativas indican la calidad del ARN y la posible contaminación con solutos orgánicos y/o proteínas.

#### 8.4. Síntesis del ADNc.

Previamente se trató el ARN con DNAsa (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.

La síntesis de ADNc se realizó en un termociclador (*GeneAmp PCRSystem 9700*, Applied Biosystems, España) con el *kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), utilizando como cebadores OligodTs y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

#### 8.5. Análisis de la expresión génica mediante *PCR* en tiempo real.

El ADNc se cargó en una placa de 96 pocillos (Roche, Alemania) junto con *LightCycler 480 Syber Green I Master* (Roche) y los cebadores específicos (Tabla 2):

Nombre	Cebador sentido	Cebador antisentido	Contenido G/C		Amplicón
			Cebador sentido	Cebador antisentido	
TBP	5'gcccatagtgatctttgcagt3'	5'cgctggaactcgtctcacta3'	48%	55%	142 nt
SOX 9	5'gtacccgcacttgacacaac 3'	5'tcgctctcgttcagaagtctc 3'	58%	52%	72 nt
COL II	5'gtgtcagggccaggatgt 3'	5'tcccagtgacacagacagat 3'	61%	50%	116 nt
FABP4	5'ggatgataaactggtggtgga 3'	5'cacagaatggttagagttcaatgc 3'	48%	40%	125 nt
APM1	5'ggtgagaaaggagatccaggt 3'	5'tgctgagcgtatacataggc 3'	52%	52%	147 nt
LPL	5'agaacatcccattcactctgc 3'	5'ccattgagctcaacatgagt 3'	48%	41%	107 nt
ALP	5'gacggacccgtcactctc 3'	5'gtgcccggtgcaattct 3'	67%	56%	109 nt
OP	5'cgcagacctgacatccagt 3'	5'ggctgtccaatcagaagg 3'	58%	58%	136 nt

Tabla 2: Secuencias y características de los cebadores empleados en la *PCR* en tiempo real (*qPCR*) para la amplificación de los ARNm humanos específicos de la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica.

- Para la detección de expresión de genes constitutivos de referencia: Proteína de unión a *TATA* (*TATA Binding Protein, TBP*).
- Para la detección de expresión de genes de condrocitos: *COL II* (*Collagen, type II, alpha 1, COL2A1*) y *SOX9* [*SRY (sex determining region Y)-box 9*].

- Para la detección de expresión de genes de adipocitos: Gen transcrito más abundante en tejido adiposo 1 (*Adipose most abundant gene transcript 1, APM1*), Lipoproteína lipasa (*Lipoprotein Lipase, LPL*), y la Proteína 4 de unión al ácido graso (*Fatty Acid Binding Protein 4, FABP4*).
- Para la detección de expresión de genes de osteoblastos: Osteopontina (*Secreted Phosphoprotein 1, OP*) y Fosfatasa Alcalina (*Alkaline Phosphatase, ALP*)

La *qPCR* se realizó en un *Light-Cycler 480* (Roche) y los resultados se analizaron con *LightCycler 480 Software release 1.5.0. SP4*.

Los cálculos de los niveles relativos de expresión (NRE) se realizaron empleando el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [25], con la ayuda de una hoja de cálculo Excel (Office 2010 versión 14.0.6029.1000). El cálculo de los NRE se realizó de la siguiente forma:

- Para las diferenciaciones *in vitro* sobre células cultivadas en monocapa:
  - Adipogénesis y condrogénesis: los datos fueron normalizados frente al valor obtenido en los controles DMEM20% a 21 días, el cual fue considerado igual a 1, y se expresó como NRE.
  - Osteogénesis: para el gen ALP los datos fueron normalizados frente al valor obtenido en osteogénesis a 21 días, el cual fue considerado igual a 1, y fueron expresados como NRE; para el gen OP los datos fueron normalizados frente al valor obtenido en los controles DMEM20% a 21 días, el cual fue considerado igual a 1, y se expresó como NRE.

- Para biomateriales: los datos fueron normalizados frente al valor obtenido en C1C2HS, el cual fue considerado igual a 1, y se expresó como NRE.

Para ello se necesitó un gen de referencia (*housekeeping*), que en nuestro caso fue el TBP, que ya había sido determinado en estudios previos, mediante el algoritmo estadístico *geNORM*, que realiza una evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados.

#### 9. Técnicas electroforéticas.

Las muestras de ADNc de las células cultivadas en los biomateriales, amplificadas en la *qPCR* con los diferentes cebadores, se migraron en un gel electroforético de agarosa al 2%, para observar las bandas de amplificación.

Para la preparación del gel se disolvieron 2 g de agarosa (Sigma) en polvo en 100 ml tampón Tris-Acetato-EDTA 1 x (1xTAE). Para agilizar la disolución se calentó la mezcla. Se le añadió *SybrSafe* (Invitrogen) a la disolución caliente, se introdujo en la cubeta de electroforesis horizontal y se colocó el peine. Se añadió tampón de carga a las muestras y a un marcador de pesos moleculares, el *DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1500 bp)* (Roche). Una vez que la mezcla enfrió se extrajo el peine y se añadieron las muestras, junto con el marcador de pesos moleculares, a los pocillos de forma independiente. La cubeta de electroforesis se conectó a la fuente de alimentación (80 V) y se dejó migrar 60 min. Se reveló el gel con un láser de luz azul (460nm) empleando el digitalizador de imágenes LAS-3000 (*Fujifilm*, Japón) y las imágenes se obtuvieron con el programa informático *Image Reader LAS 3000 2.2*.

## 10. Ensayos de Elisa.

### 10.1. Elisa para la detección de colágeno.

Los ensayos de Elisa se realizaron sobre los sobrenadantes recogidos a diferentes tiempos de la placa de cultivo de los biomateriales. Para ello se utilizó el *kit* comercial *Sircol* (Biocolor, Reino Unido) siguiendo el protocolo estándar y realizando la concentración previa de la muestra, recomendada por la casa comercial. La medición de Abs se realizó en un espectrofotómetro *Infinite M200 PRO* (Tecan, Suiza) del Biobanco del CHUAC, con la versión 1.6 del programa informático *Tecan i-control* (Tecan).

Los cálculos se realizaron en una hoja de cálculo Excel.

### 10.2. Elisa para la detección de glucosaminoglucanos y proteoglucanos sulfatados.

Se realizaron también sobre los sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares sobre los biomateriales, utilizando el *kit* comercial *Blyscan* (Biocolor), según el protocolo recomendado por la casa comercial. La medición de Abs se realizó en un *Infinite M200 PRO* del Biobanco del CHUAC, con la versión 1.6 del programa informático *Tecan i-control*.

## 11. Análisis estadístico:

El análisis estadístico de los resultados de ensayos de Elisa, para colágeno, se realizó empleando el programa *SPSS 19.0* (IBM, España).

Se realizó análisis descriptivo, para hallar las medias y la desviación estándar. Se escogió, en cada biomaterial, el tiempo que mayor concentración de colágeno presentaba y se realizó una comparación de la medias mediante estadística no paramétrica (*U-Mann-Withney*). Se consideró estadísticamente significativo *p-valor* inferior a 0,05.



## RESULTADOS

### 1. Células madre mesenquimales.

#### 1.1. Caracterización morfológica de las células madre mesenquimales de médula ósea humana.

Del aislamiento de CMMs-MOH se obtuvo una población celular con una morfología típica de célula madre mesenquimal (Figura 9A). Esta morfología fibroblástica (Figura 9A) se caracteriza por un citoplasma de forma irregular con grandes prolongaciones citoplásmicas (Figura 9B). En la Figura 9C se puede observar en detalle su capacidad de adherencia al plástico.

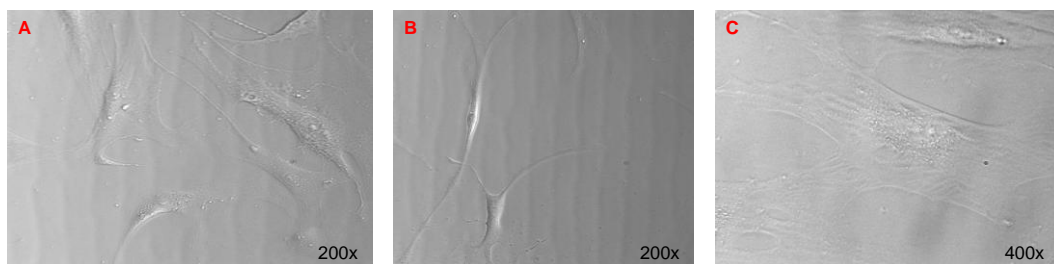


Figura 9: Fotografía de CMMs-MOH visualizadas al microscopio invertido.

#### 1.2. Caracterización fenotípica de las células madre mesenquimales de médula ósea humana.

En los análisis de la citometría se observaron poblaciones celulares muy bien definidas (Figura 10A). En la Figura 10, se aprecia la expresión de los diferentes marcadores de membrana en una muestra de uno de los 4 donantes: los marcadores CD34 (Figura 10B), CD45 (Figura 10C, FL1H) y CD69 no presentaron positividad; CD 29 (Figura 10D), CD44 (Figura 10E), CD90 (Figura 10F), y CD105 ó CD166 (Figura 10G, FL1-H) son los que mayor positividad mostraron; otros marcadores positivos fueron CD73 (Figura 10E, FL2-H), CD106 (Figura 10G, FL2-H), CD166 ó CD105 (Figura 10C, FL2-H) y SSEA-4 (Figura 10H); CD271 (Figura 10I),

CD117 (Figura 10J), STRO-1 (Figura 10K) y Antifibroblasto (Figura 10L) apenas mostraron positividad.

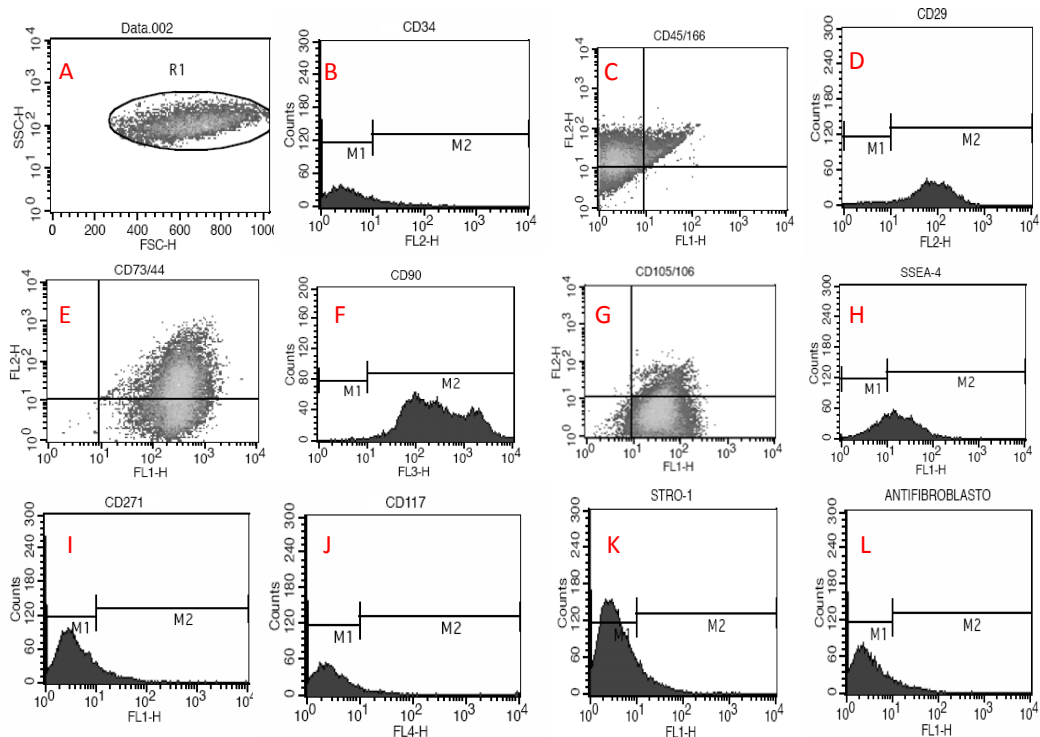


Figura 10: Gráficas, obtenidas en el citómetro, de uno de los donantes. En las gráficas de doble marcaje (C, E y G) se observa en cada eje un fluoróforo diferente y la zona de exclusión es el cuadrante inferior izquierdo. En las gráficas de marcaje simple (B, D, F, H, I, J, K y L) se indica la zona de exclusión M1 marcada por los controles sin células y la zona de positividad M2. A) Población celular definida. B) Gráfica de marcaje simple de CD34. C) Gráfica de doble marcaje de CD45 (FL1-H) y CD166 (FL2-H). D) Gráfica de marcaje simple de CD29. E) Gráfica de doble marcaje de CD44 (FL1-H) y CD73 (FL2-H). F) Gráfica de marcaje simple de CD90. G) Gráfica de doble marcaje de CD105 (FL1-H) y CD106 (FL2-H). H) Gráfica de marcaje simple de SSEA-4. I) Gráfica de marcaje simple de CD271. J) Gráfica de marcaje simple de CD117. K) Gráfica de marcaje simple de STRO-1. L) Gráfica de marcaje simple de Antifibroblasto.

En la Figura 11 se representan los valores medios de los marcadores medidos en los 4 donantes. Los marcadores CD34, CD45, CD69, CD106, CD117, CD271, STRO-1 y Antifibroblasto no presentaron positividad. Resultaron positivos CD29 (82,167%  $\pm$  0,946%), CD44 (94,373%  $\pm$  2,774%), CD73 (52,89%  $\pm$  19,028%), CD90 (96,21%  $\pm$  1,285%), CD105

(44,598%  $\pm$  17,059%), CD166 (57,020%  $\pm$  15,291%) y SSEA-4 (14,243%  $\pm$  14,243%).

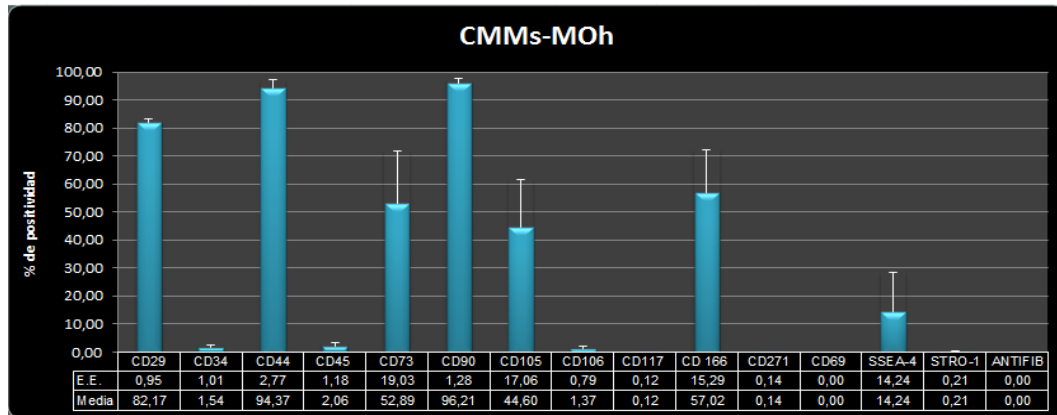


Figura 11: Gráfica en la que se representa mediante barras la media de los porcentajes de positividad de los marcadores analizados en 4 donantes. Las barras de error representan el error estándar (E.E.).

1.3. Potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales de médula ósea humana.

1.3.1. Adipogénesis.

1.3.1.1. Análisis histológico.

Más de un 50% de las CMMs-MOh, estimuladas con medio adipogénico, se tiñeron con *Oil-Red-O* (Figura 12A). Las CMMs-MOh sin estimular no presentaron positividad para esta tinción (Figura 12B).

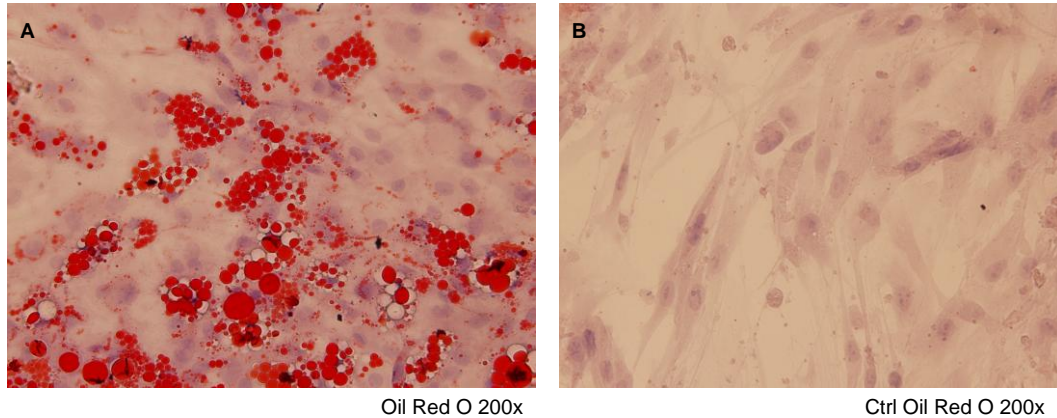


Figura 12: Tinción *Oil-Red-O* de A) CMMs-MOH cultivadas en medio de diferenciación adipogénico. B) CMMs-MOH cultivadas en medio *DMEM*.

### 1.3.2. Osteogénesis.

#### 1.3.2.1. Análisis histológico.

Se observó una gran positividad para la tinción con Rojo Alizarina en las CMMs-MOH estimuladas osteogénicamente (Figura 13A). Las CMMs-MOH sin estimular no presentaron positividad (Figura 13B).

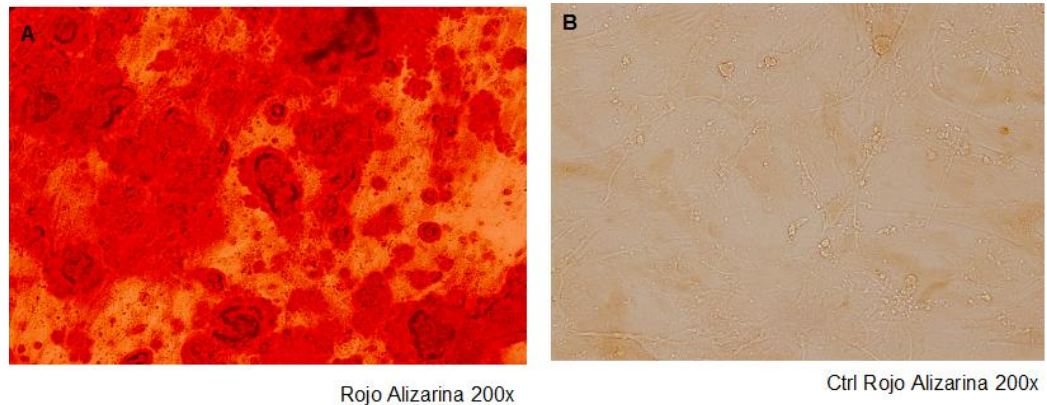


Figura 13: Tinción Rojo Alizarina de A) CMMs-MOH cultivadas en medio de diferenciación osteogénico. B) CMMs-MOH cultivadas en medio *DMEM*.

### 1.3.3. Condrogénesis.

#### 1.3.3.1. Análisis histológico.

**Diferenciación *in vitro* de células madre aisladas de médula ósea humana sobre biomateriales de colágeno.**

### A) Histoquímica.

La tinción H-E en micromasas estimuladas (Figura 14A) y sin estimular (Figura 14F) mostró la homogeneidad de presencia celular en todo el conjunto. Las tinciones MM (Figura 14 B y G) y AT (Figura 14 E y J) fueron levemente positivas tanto en la muestras estimuladas (Figura 14 B y E) como en los controles sin estimular (Figura 14 G y J). La mayor diferencia se encontró en las tinciones AA (Figura 14 C y H) y SO (Figura 14 D, I), en las que la presencia de proteoglicanos fue más evidente en las micromasas estimuladas (Figura 14 C y D).

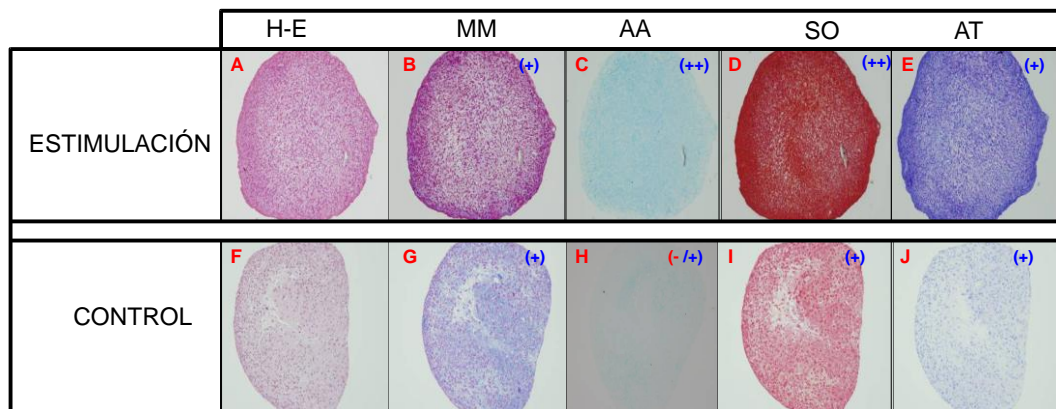


Figura 14: Tinciones de micromasas: estimuladas A-E y sin estimular F-J. A y F) Tinción H-E. B y G) Tinción MM. C y H) Tinción AA. D e I) Tinción SO. E y J) Tinción AT.

### B) Inmunohistoquímica.

La detección de Col I fue menor en micromasas estimuladas (Figura 15A) que en sin estimular (Figura 15F). La positividad de las micromasas estimuladas fue evidente en Col II (Figura 15B) y *Aggrecan* C-20 (Figura 15E), sin embargo en las micromasas sin estimular no (Figura 15G y J, respectivamente). Col X presentó mayor positividad en las micromasas control (Figura 15H). Se detectó presencia de MMP13 (Figura 15D) en las micromasas estimuladas pero no en el control (Figura 15I).

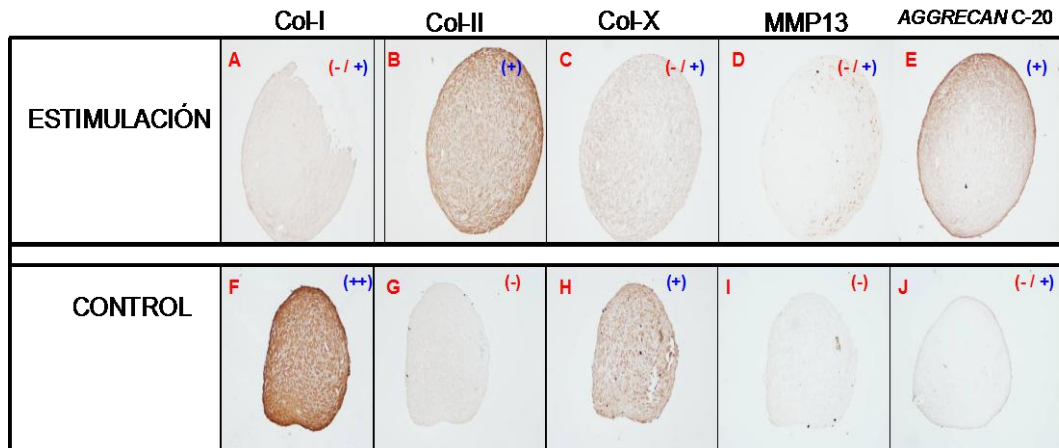


Figura 15: Inmunohistoquímica directa en micromasas: estimuladas A-E y sin estimular F-J. A y F) Col I. B y G) Col II. C y H) Col X. D e I) MMP-13. E y J) *Aggrecan C-20*.

2. Cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea humana sobre biomateriales.

2.1. Crecimiento de células madre mesenquimales de médula ósea humana sobre los biomateriales.

En el biomaterial C1C2, en un tiempo inicial ( $t=0$ ) se observó el biomaterial entero, redondo y en cuyo centro se observaban las células que habían sido sembradas en él (Figura 16). Tras 4 días, comenzó a evidenciarse la degradación de biomaterial que continuaría hasta el final del experimento ( $t=30$ ). A  $t=11$  se pudo observar como las células adquirían una consistencia y dureza mayor, aumentando su superficie en las 3 dimensiones (Figura 16).

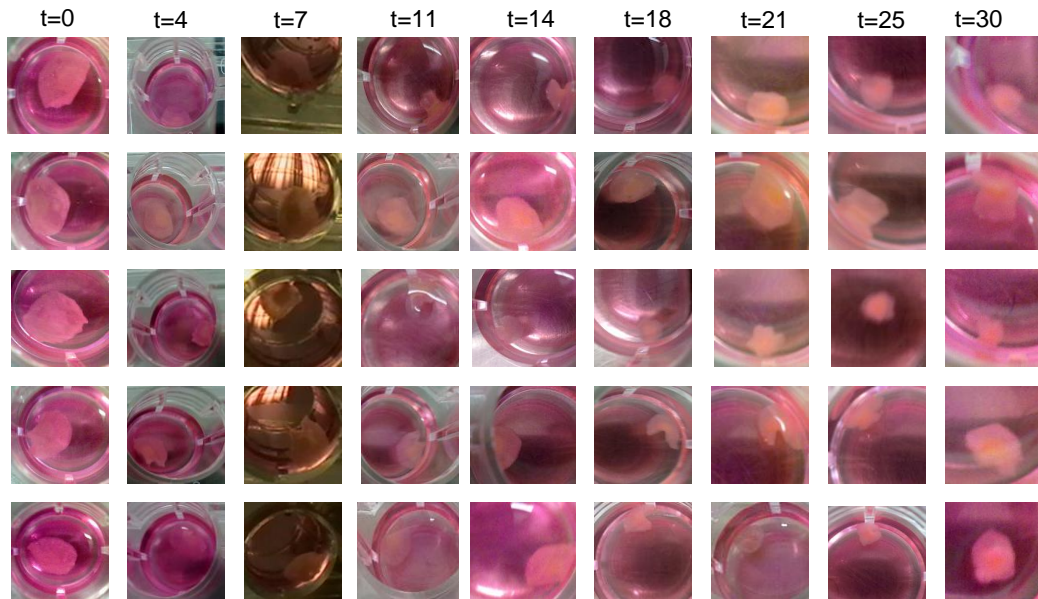


Figura 16: Fotos de las réplicas de C1C2 a diferentes tiempos.

En el biomaterial C1C2HS, en un tiempo inicial ( $t=0$ ) se observó el biomaterial entero, redondo y en cuyo centro se observaban las células que habían sido sembradas en él (Figura 17). Hasta pasados 11 días no comenzó la degradación de biomaterial que continuaría hasta el final del experimento ( $t=30$ ). El aumento de consistencia y dureza se comenzó a observar pasados 14 días desde el inicio del experimento (Figura 17).

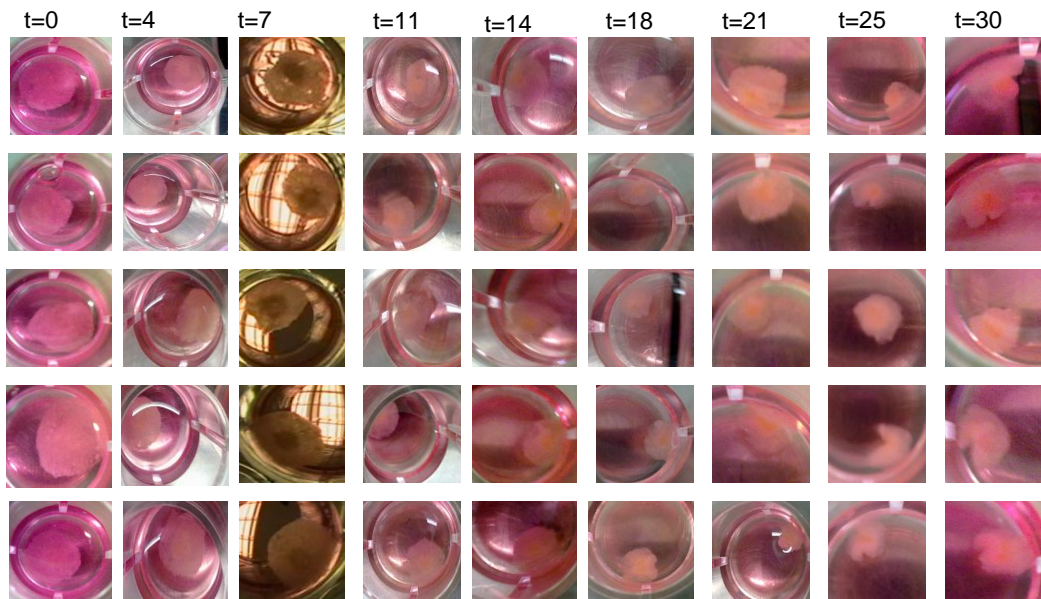


Figura 17: Fotos de las réplicas de C1C2HS a diferentes tiempos.

En el biomaterial C1C2CHS, en  $t=0$  el biomaterial estaba entero, era redondo y en su parte central se observaban las células que habían sido sembradas en él (Figura 18). Tras 11 días comenzó a ser patente la degradación del biomaterial, que continuaría hasta el final del experimento ( $t=30$ ), y se observó el aumento de consistencia y dureza (Figura 18).

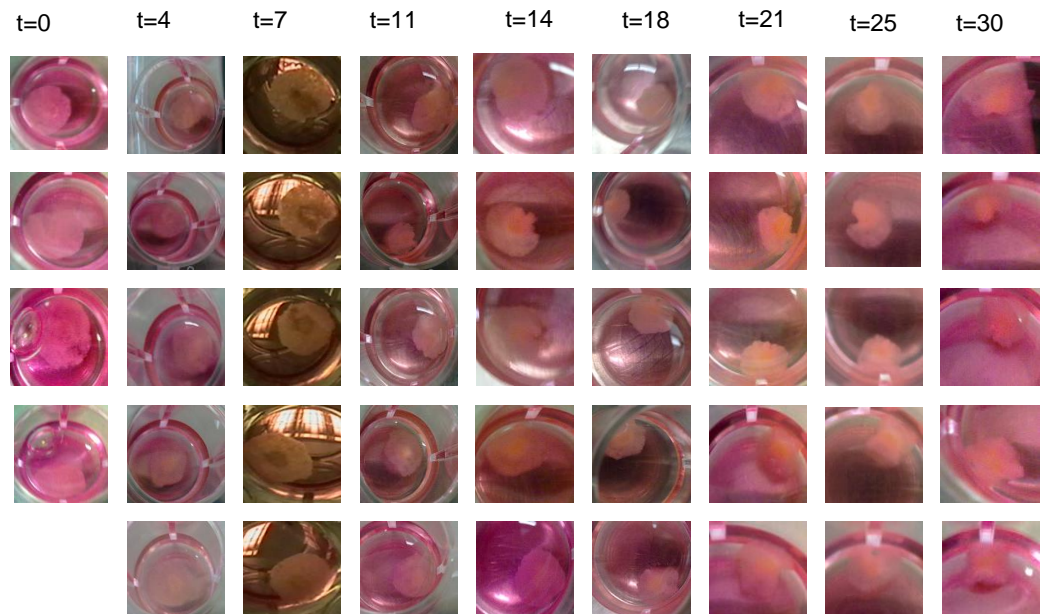


Figura 18: Fotos de las réplicas de C1C2CHS a diferentes tiempos.

**Diferenciación *in vitro* de células madre aisladas de médula ósea humana sobre biomateriales de colágeno.**



En el biomaterial C1-OLH3, en un tiempo inicial ( $t=0$ ) se observó el biomaterial entero, cuadrado y en cuyo centro se observaban las células que habían sido sembradas en él (Figura 19). Durante todo el experimento no se llegó a observar degradación del biomaterial aunque su consistencia disminuía (Figura 19). A  $t=21$  las células sembradas se hacían todavía más patentes (Figura 19).

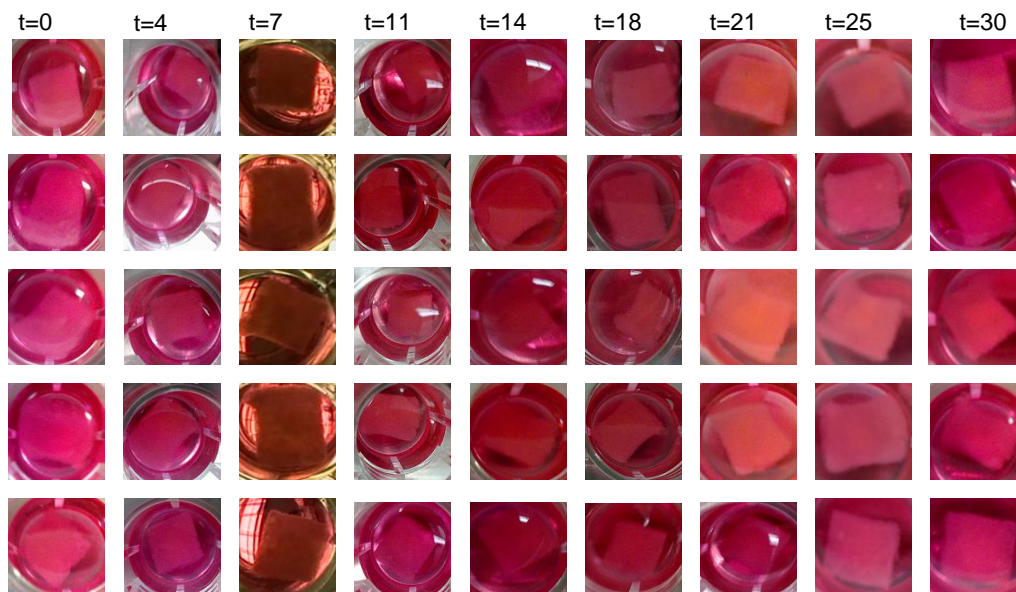


Figura 19: Fotos de las réplicas de C1-OLH3 a diferentes tiempos.

En el biomaterial C1CHS, en un tiempo inicial ( $t=0$ ) se observó el biomaterial entero y cuadrado (Figura 20). Las células sembradas no se observaron hasta  $t=4$  (Figura 20). Durante todo el experimento no se llegó a observar degradación del biomaterial aunque su consistencia disminuía (Figura 20).

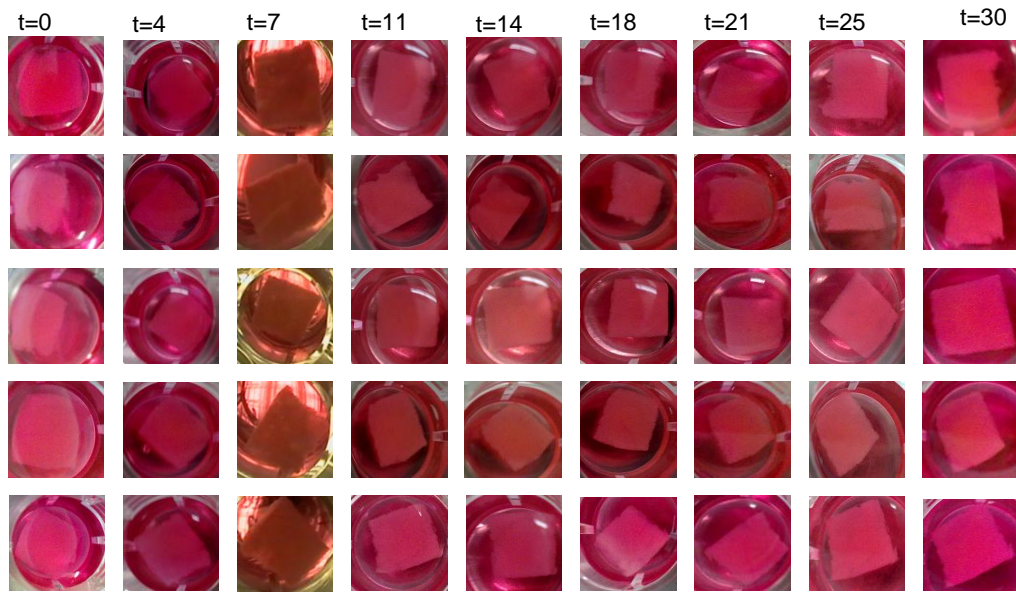


Figura 20: Fotos de las réplicas de C1CHS a diferentes tiempos.

Macroscópicamente se pudo observar degradación en los biomateriales C1C2, C1C2HS y C1C2HS, aunque la degradación ocurrió de forma más temprana en el biomaterial C1C2. En los biomateriales C1-OLH3 y C1CHS la degradación apenas fue patente macroscópicamente. En todos los biomateriales se pudo observar una zona de crecimiento celular. En casi todos los biomateriales se observó la formación de un neot Tejido, con un aumento de la consistencia y el endurecimiento de esa zona. En los biomateriales C1C2 y C1C2HS la formación del tejido se comenzó a hacer patente tras 11 días de cultivo; en el biomaterial C1C2CHS no se hizo patente hasta el 14º día y en el biomaterial C1-OLH3 no lo hizo hasta el día 21. En el biomaterial C1CHS no se llegó a observar el endurecimiento de la zona de crecimiento celular.

2.2. Análisis citológico/histológico y morfométrico de los biomateriales cultivados.

2.2.1. Morfología del biomaterial y disposición celular.

En el biomaterial C1C2 control sin células teñido con H-E (Figura 21A) se observa poca porosidad y en C1C2 sembrados con células se pudo

observar degradación (Figura 21C) del biomaterial, con presencia de pocas fibras. En los biomateriales C1C2 en los que se sembraron células se encontró una alta densidad celular al teñirlos con H-E (Figura 21C) y reveló una gran cantidad de MEC. Se observa en los biomateriales C1C2 controles teñidos con MM (Figura 21B) la presencia de conjuntos de largas fibras gruesas colágenas que se mantienen en los biomateriales con células (Figura 21D). En éstos, además, se puede apreciar una amplia red de fibras colágenas de menor tamaño y grosor, proveniente de las células.

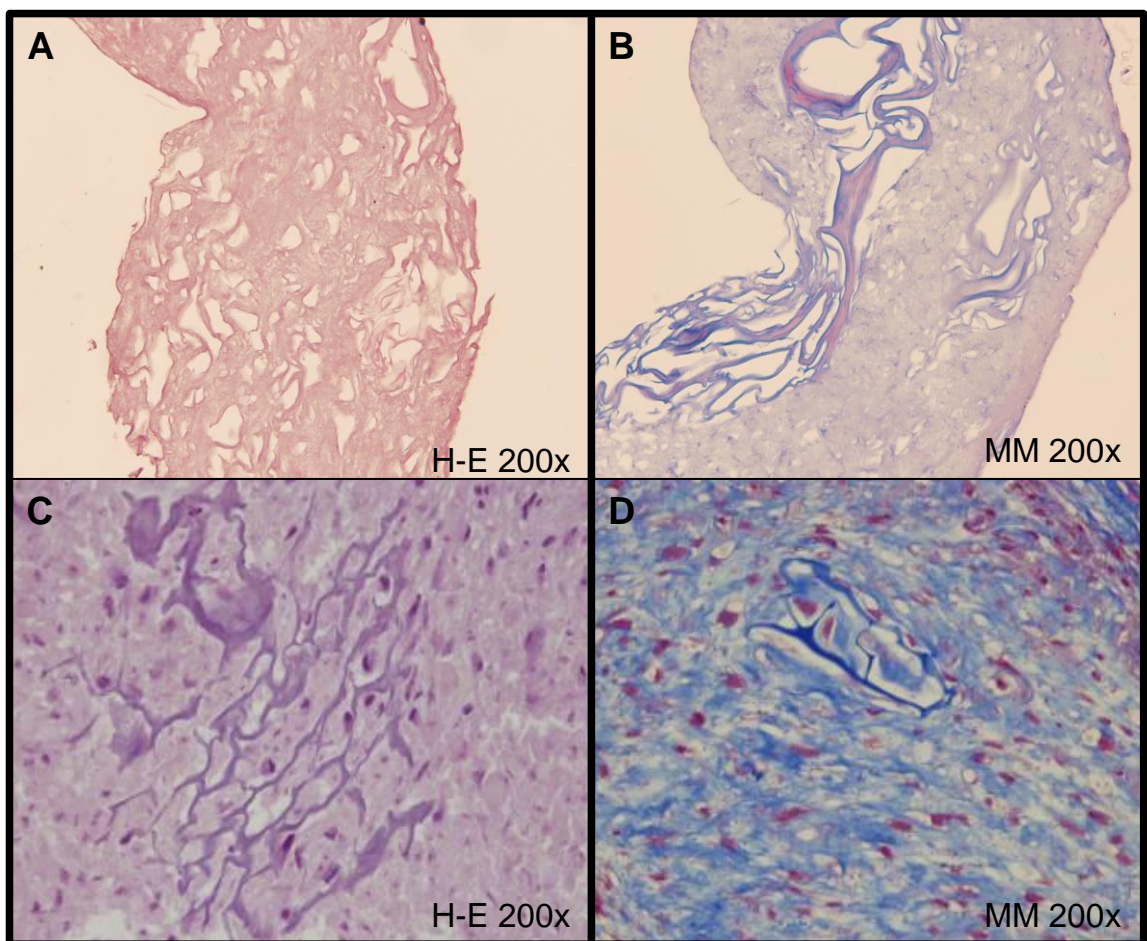


Figura 21: Tinciones de biomaterial C1C2: A) Tinción H-E en biomaterial sin células. B) Tinción MM en biomaterial sin células. C) Tinción H-E en biomaterial con células D) Tinción MM en biomaterial con células.

Con la tinción H-E (Figura 22A) se observó que el biomaterial C1C2HS control presentaba pocos poros y en el biomaterial con células sembradas (Figura 22C) se observó mayor porosidad debida a la degradación. En estas zonas de poro se encontró MEC dispuesta homogéneamente (Figura 22C). La tinción mediante MM (Figura 22B) pone de manifiesto que el colágeno está dispuesto de manera homogénea. En el biomaterial C1C2HS con células sembradas se observan también fibras colágenas en la MEC (Figura 22D).

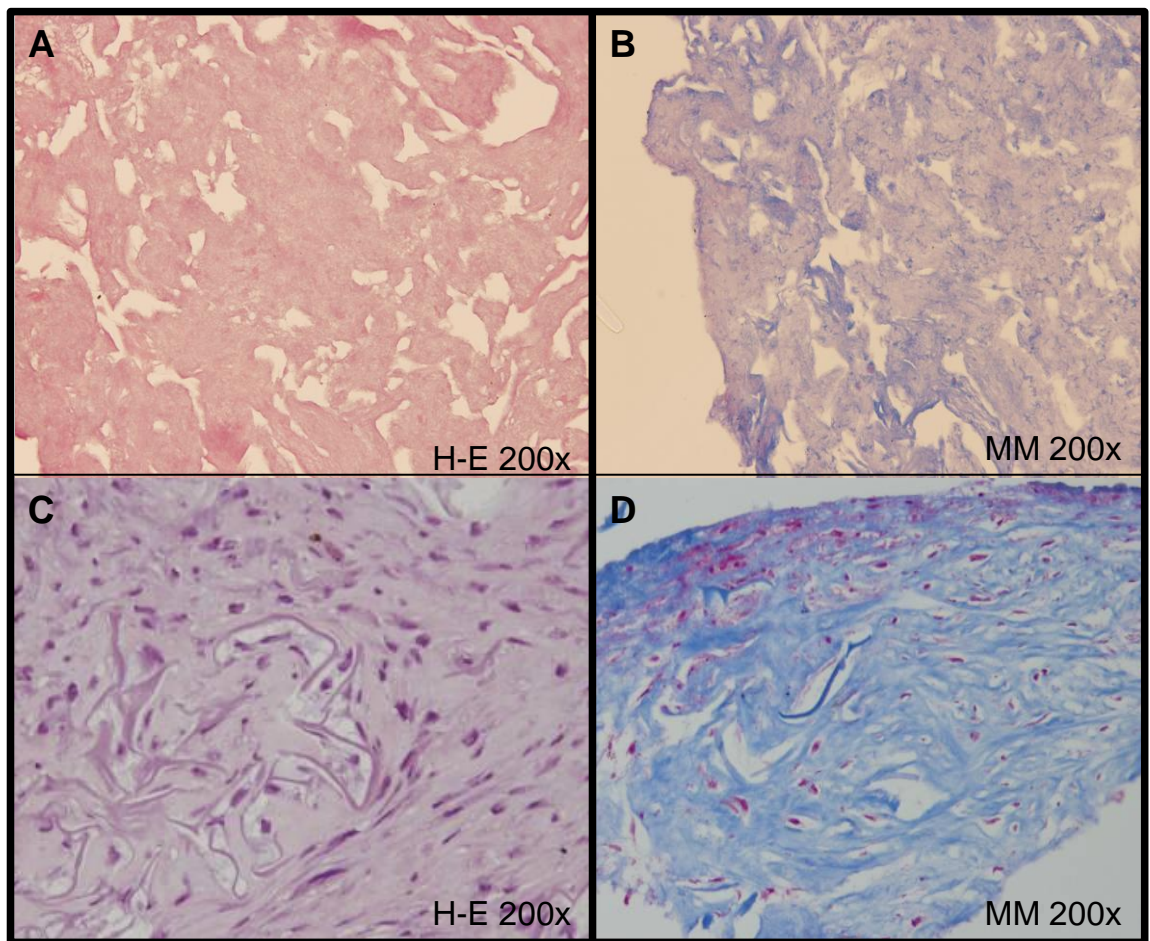


Figura 22: Tinciones del biomaterial C1C2HS: A) Tinción H-E en biomaterial sin células. B) Tinción MM en biomaterial sin células. C) Tinción H-E en biomaterial con células D) Tinción MM en biomaterial con células.

El biomaterial C1C2CHS sin células teñido con H-E (Figura 23A) permitió distinguir 2 tipos de texturas dentro de él: una zona más laxa y una zona

más compacta. En los biomateriales C1C2CHS con células sembradas, con la tinción H-E (Figura 23C) se observaron células dispuestas en grupos, en zonas degradadas del biomaterial. Además, se observó poca presencia de MEC. En la Figura 23B, la tinción con MM del biomaterial C1C2CHS permitió distinguir fibras gruesas de colágeno ubicadas únicamente en las zonas más laxas. Sin embargo, en los biomateriales con células también se observaron fibras más finas en la zona de crecimiento celular, indicando claramente que ese colágeno pertenecía a la MEC (Figura 23D).

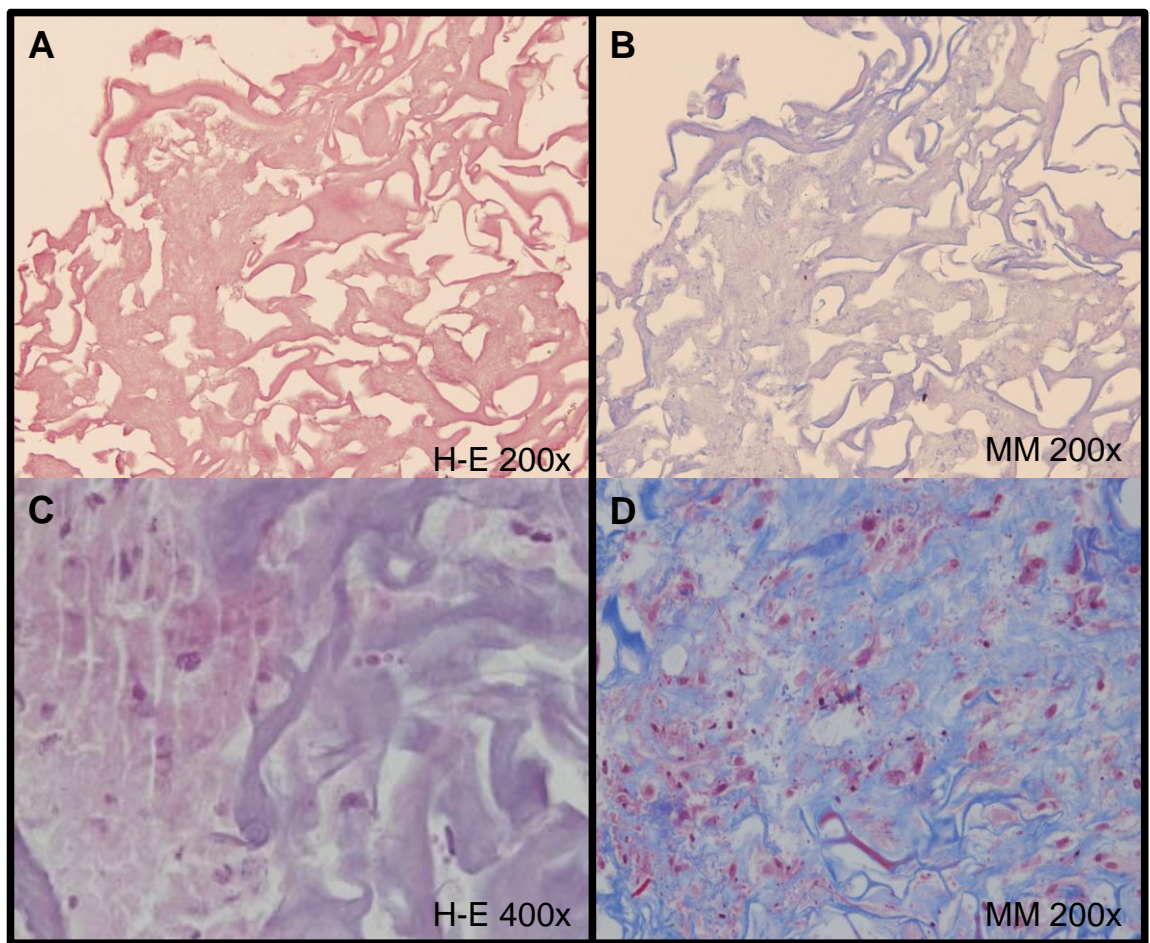


Figura 23: Tinciones del biomaterial C1C2CHS: A) Tinción H-E en biomaterial sin células. B) Tinción MM en biomaterial sin células. C) Tinción H-E en biomaterial con células D) Tinción MM en biomaterial con células.

El biomaterial C1-OLH3 presentó un grado elevado de porosidad (Figura 24A). La tinción H-E de estos biomateriales sembrados ubicó a las células dispersas en las zonas de poro (Figura 24C) y sin MEC secretada. El MM reveló que las células presentaban fibras colágenas (Figura 24D) y se observó menor cantidad de fibras colágenas de biomaterial que en los controles sin células (Figura 24B).

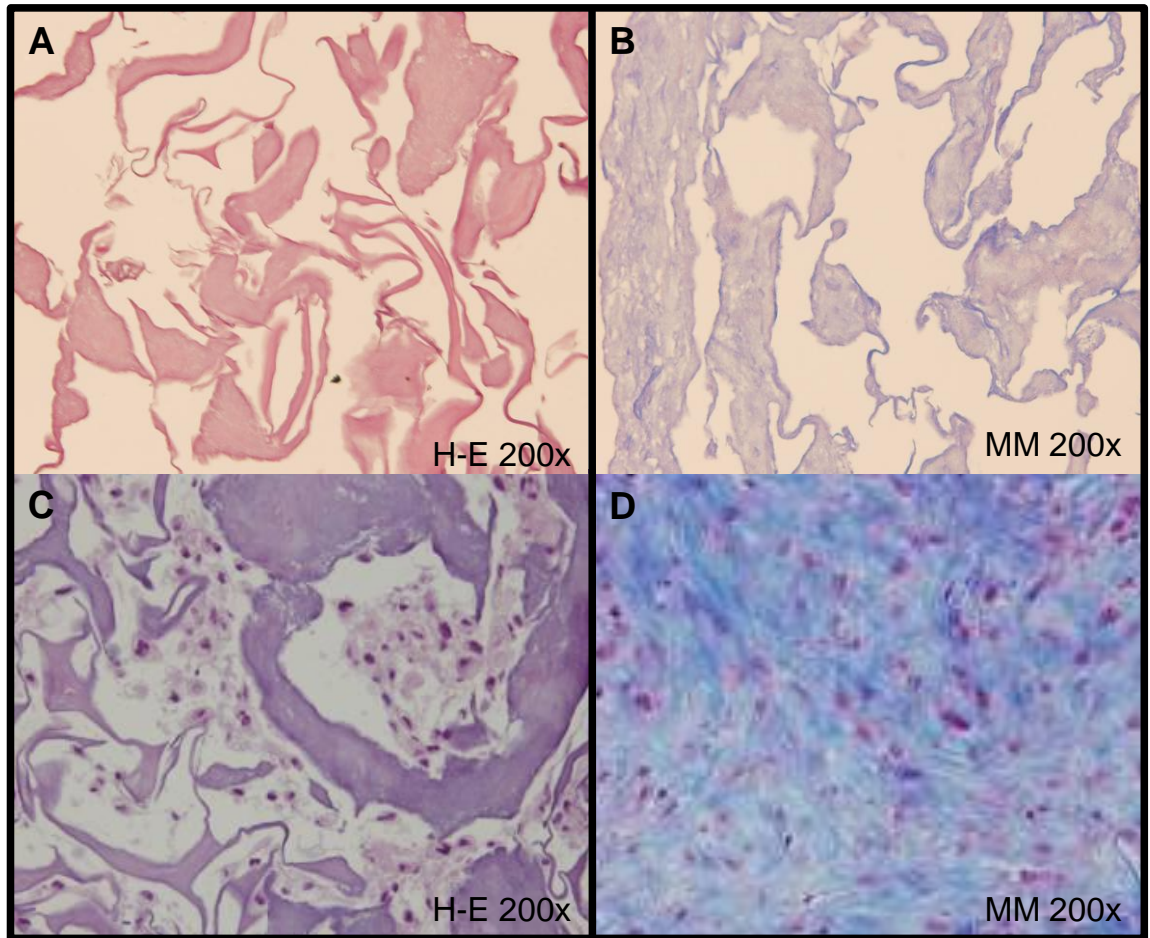


Figura 24: Tinciones del biomaterial C1-OLH3: A) Tinción H-E en biomaterial sin células. B) Tinción MM en biomaterial sin células. C) Tinción H-E en biomaterial con células D) Tinción MM en biomaterial con células.

En la Figura 25A se observa como la tinción con H-E del biomaterial C1CHS, con células sembradas, revela poca densidad celular y un biomaterial muy poroso. En este biomaterial, la tinción MM mostró fibras colágenas pertenecientes al biomaterial en la zona porosa y fibras de las

células en las zonas más externas del soporte (Figura 25B). No se realizaron tinciones H-E y MM para los biomateriales C1CHS controles sin células.

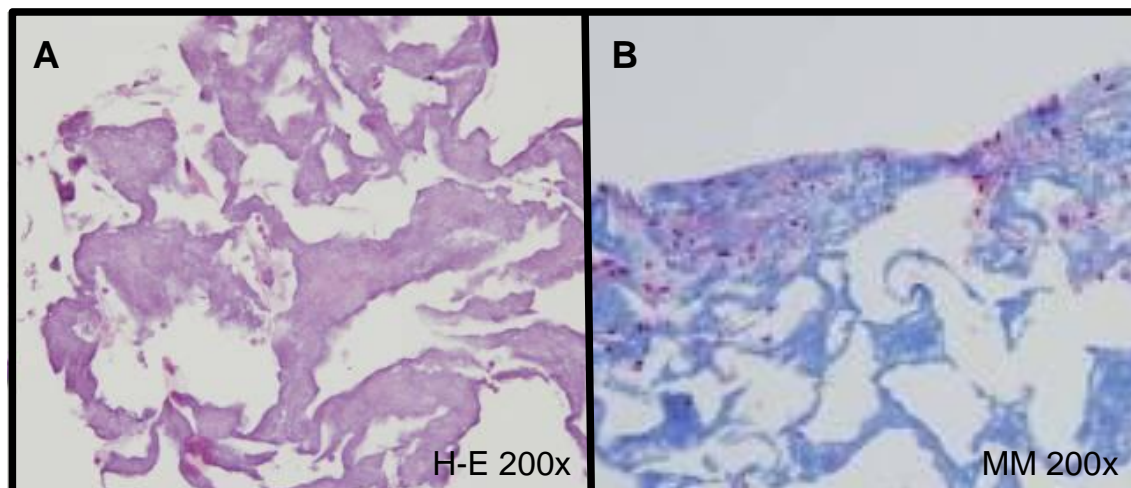


Figura 25: Tinciones del biomaterial C1CHS con células sembradas: A) Tinción H-E  
B) Tinción MM.

Comparando los 5 tipos de biomateriales se observó que C1C2 y C1C2HS fueron los biomateriales menos porosos, C1C2CHS fue intermedio y que C1-OLH3 y C1CHS fueron los más porosos. Los biomateriales C1C2 y C1C2HS sembrados presentaron una gran cantidad de células que han secretado una gran cantidad de MEC, con un alto contenido en fibras colágenas. Los biomateriales C1C2CHS, C1-OLH3 y C1CHS presentaron pocas células, en grupos dispersos. La MEC en estos biomateriales no se detectó, salvo en C1C2CHS. Se detectó poca cantidad de colágeno, excepto en C1C2CHS, que se encontraba en el interior celular y no en MEC.

#### 2.2.2. Composición bioquímica del biomaterial y del tejido neosintetizado.

Los biomateriales C1C2 sin células presentaron mayor contenido en Col I (Figura 26A) que en Col II (Figura 26B), aunque el Col II se pudo apreciar ligeramente hacia los bordes. En estos biomateriales con células

sembradas se constató la presencia de Col I (Figura 26C) en la MEC y de Col II (Figura 26D) en el interior celular.

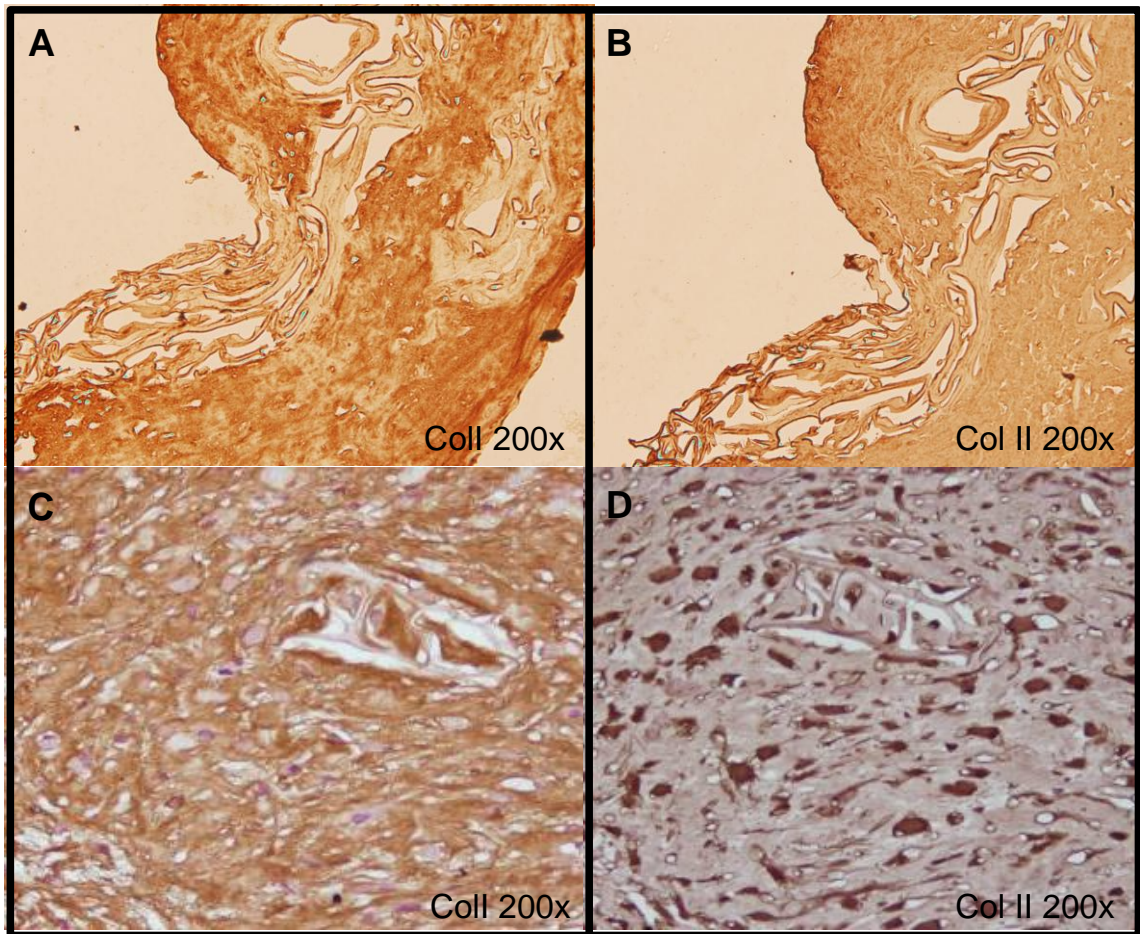


Figura 26: Inmunohistoquímica directa en biomaterial C1C2: A) Col I en biomaterial sin células. B) Col II en biomaterial sin células. C) Col I en biomaterial con células D) Col II en biomaterial con células.

Los biomateriales C1C2HS sin células presentaron menor contenido en Col I (Figura 27A) que en Col II (Figura 27B). En estos biomateriales con células el Col II del soporte pareció estar más degradado hacia el interior (Figura 27D) y el Col I más degradado hacia el exterior (Figura 27C). El Col II (Figura 27D) apareció dentro de las células, salvo en la zona periférica en la que aparece en la MEC. En la zona central del biomaterial apareció Col I dentro de la MEC (Figura 27C).



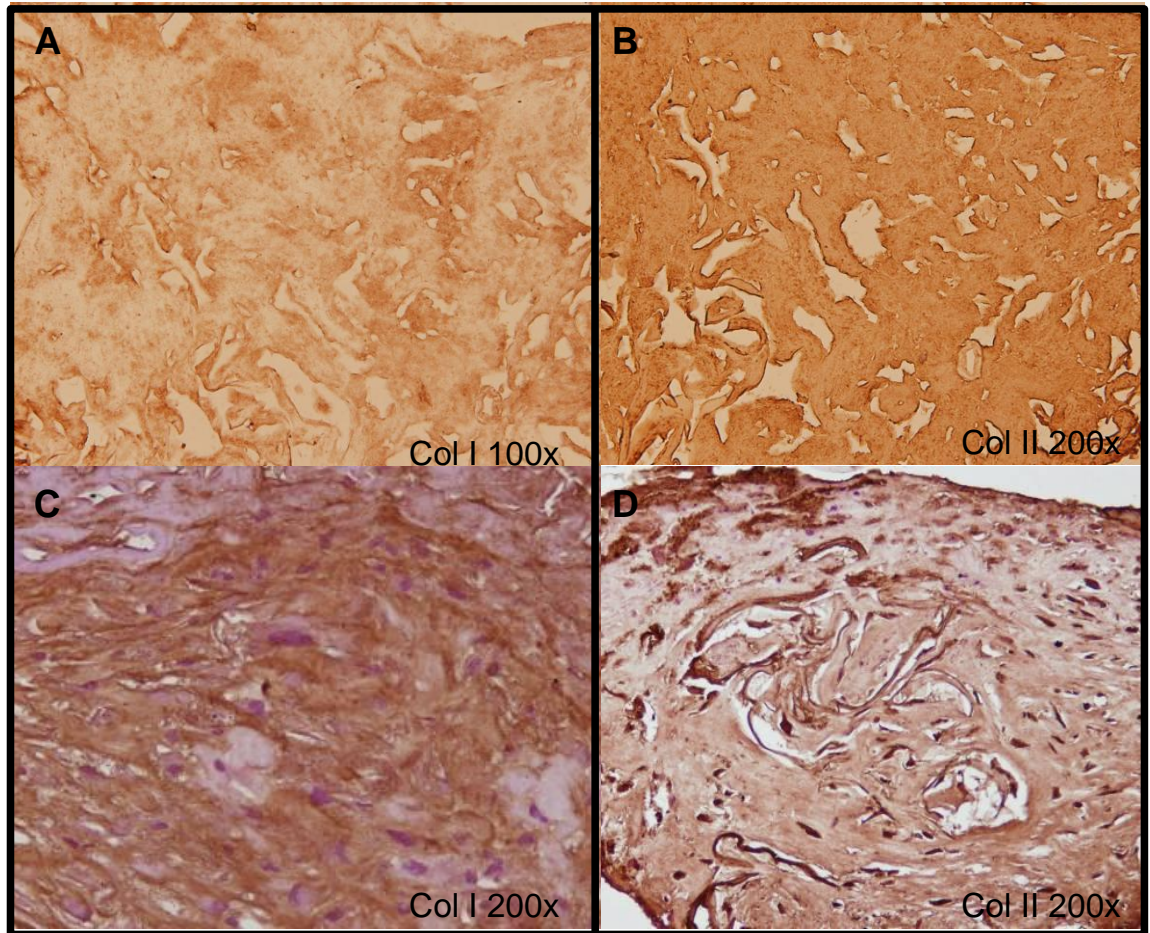


Figura 27: Inmunohistoquímica directa en biomaterial C1C2HS: A) Col I en biomaterial sin células. B) Col II en biomaterial sin células. C) Col I en biomaterial con células D) Col II en biomaterial con células.

En los biomateriales C1C2CHS sin células Col I tuvo una presencia leve (Figura 28A) y Col II tuvo mayor presencia (Figura 28B). Con células sembradas, tanto el Col I como el Col II del biomaterial se habían degradado en gran medida (Figura 28 C y D). En la Figura 28D se puede observar una gran cantidad de Col II procedente de la MEC. El Col II se encontró principalmente en el interior de las células (Figura 28D).

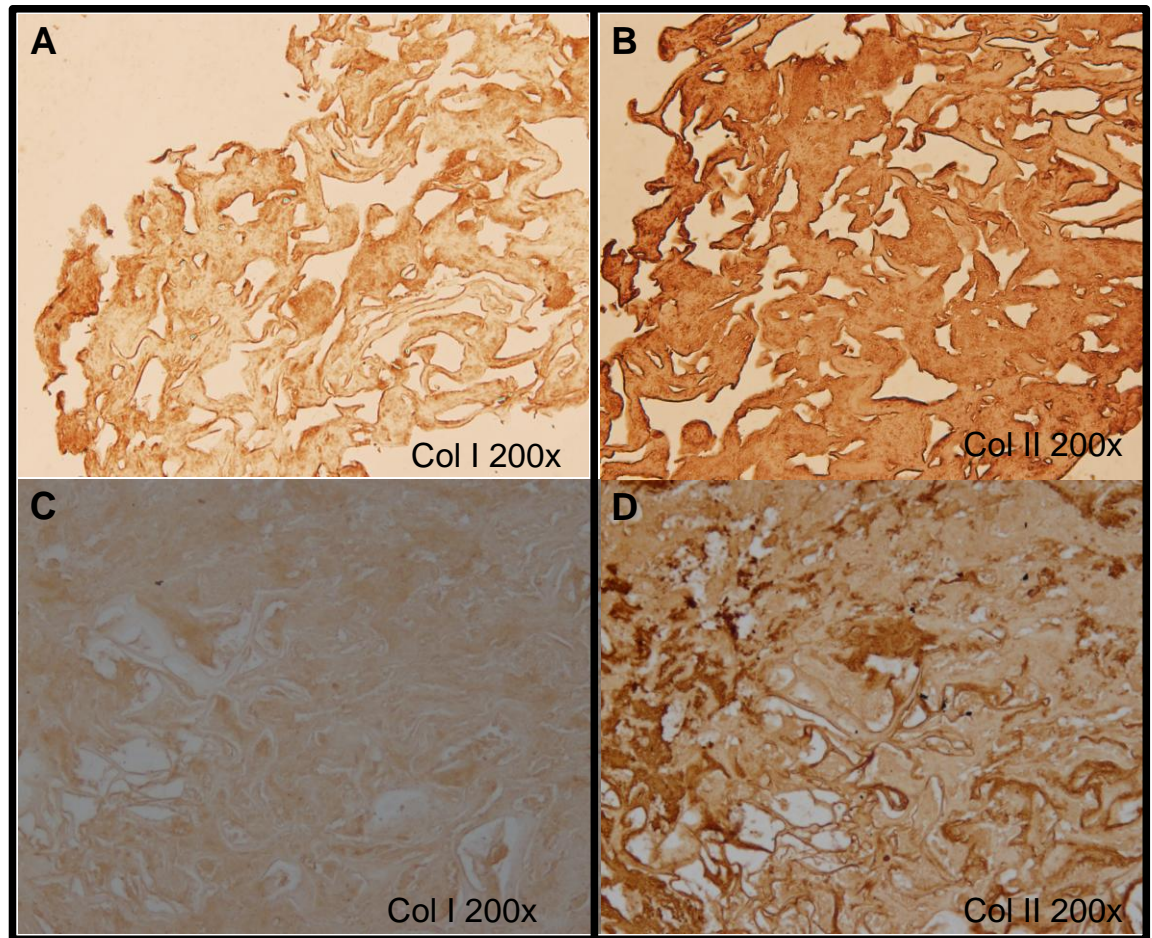


Figura 28: Inmunohistoquímica directa en biomaterial C1C2CHS: A) Col I en biomaterial sin células. B) Col II en biomaterial sin células. C) Col I en biomaterial con células D) Col II en biomaterial con células.

En los biomateriales C1-OLH3 sin células apenas se apreció Col I (Figura 29A) y Col II tuvo mayor presencia (Figura 29B). En los biomateriales con células sembradas, Col I y Col II estaban totalmente degradados (Figura 29C y D). Se detectó una leve presencia de Col II de la MEC en los biomateriales C1-OLH3 con células sembradas (Figura 29D).

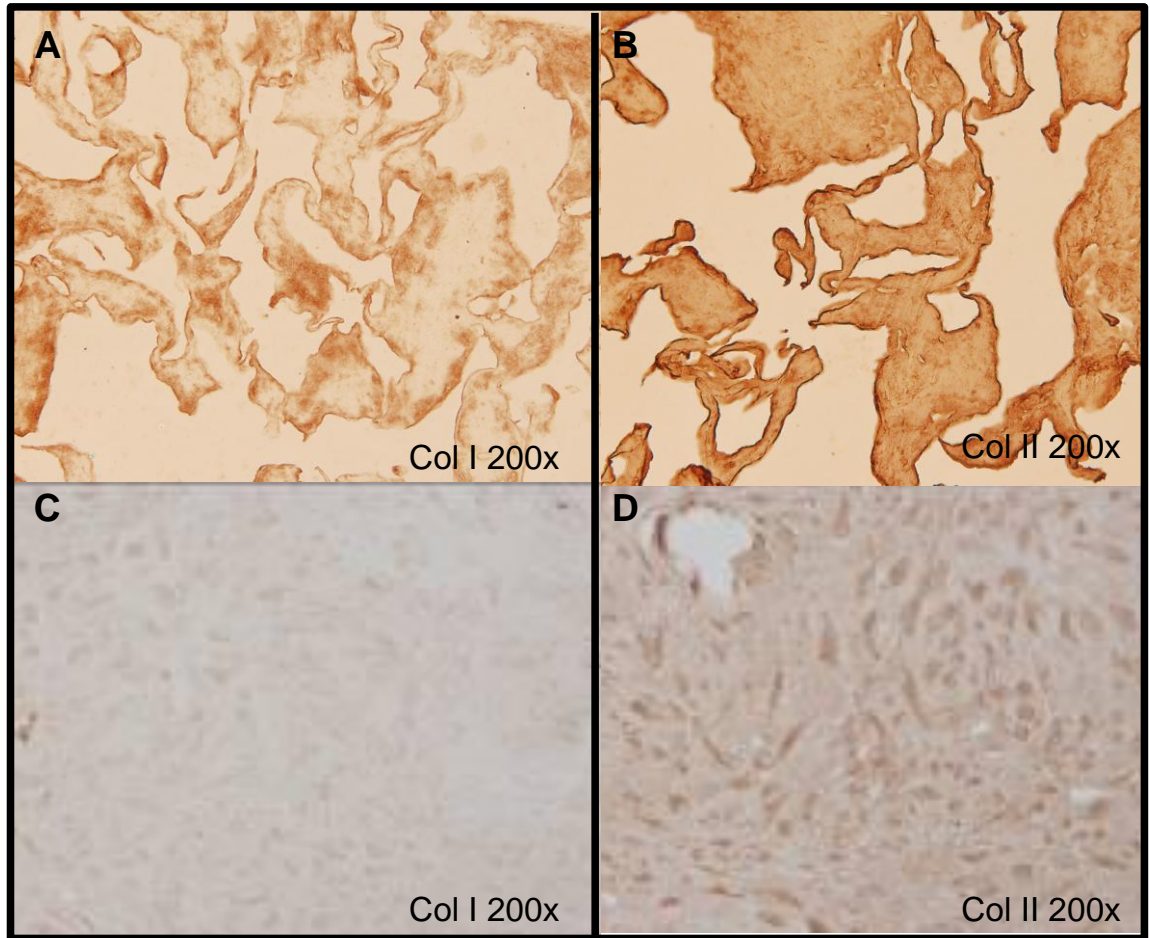


Figura 29: Inmunohistoquímica directa en biomaterial C1-OLH3: A) Col I en biomaterial sin células. B) Col II en biomaterial sin células. C) Col I en biomaterial con células D) Col II en biomaterial con células.

No se realizó inmunohistoquímica para los biomateriales C1CHS controles sin células. Los biomateriales C1CHS en los que se sembraron células presentaron ausencia de Col I (Figura 30A) y un alto contenido en Col II (Figura 30B), sin embargo, no se detectó Col II en las células ni en la MEC.

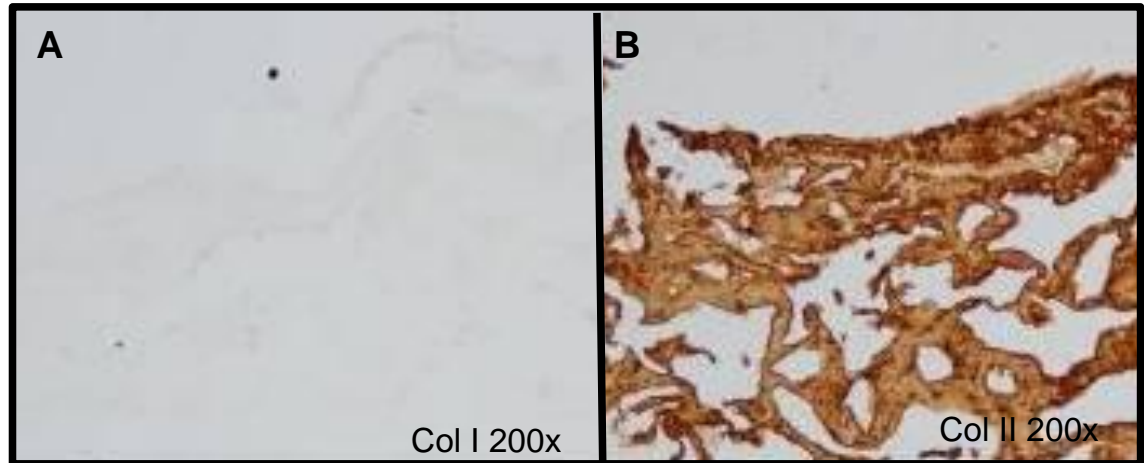


Figura 30: Inmunohistoquímica directa en biomaterial C1CHS con células sembradas:  
A) Col I. B) Col II.

Comparando los 5 tipos de biomateriales, se observa que en todos los biomateriales con células sembradas hubo una degradación del soporte.

Se detectó Col II en los biomateriales C1C2, C1C2HS y C1C2CHS con células sembradas pero en el interior celular, no en la MEC; en el biomaterial C1-OLH3 se detectó Col II levemente y en C1CHS no se llegó a detectar.

### 2.2.3. Proliferación celular.

Se ha observado proliferación celular en todos los biomateriales (Figura 31 A, B, C, D, E). La mayor proliferación celular se obtuvo en el biomaterial C1C2HS (Figura 31B), seguida del biomaterial C1C2 (Figura 31A). En el biomaterial C1CHS (Figura 31E) apenas se observó proliferación celular.

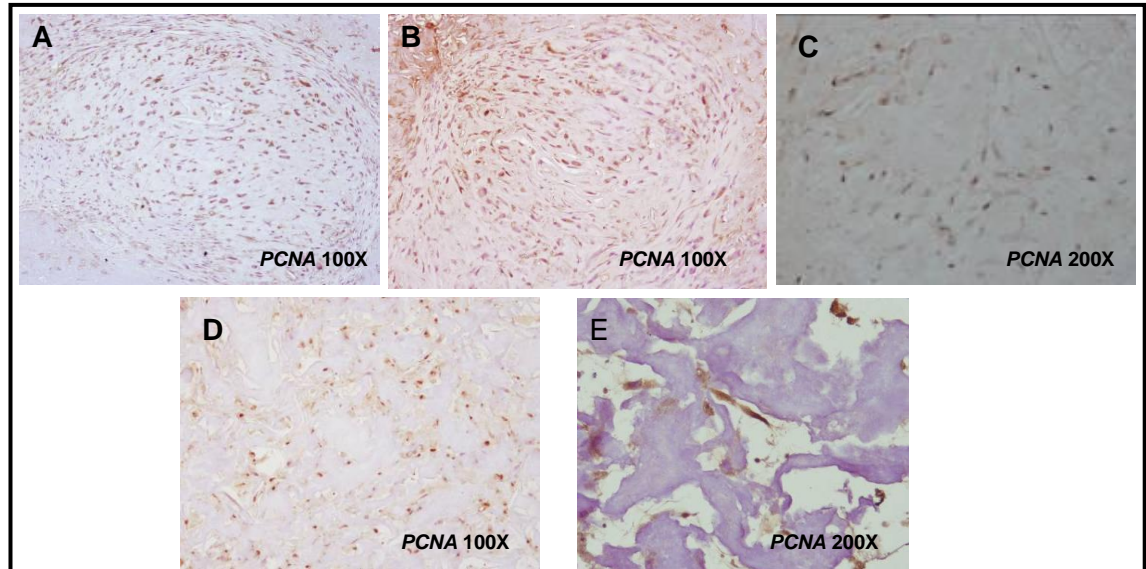


Figura 31: Tinción *PCNA* sobre los biomateriales con células sembradas: A) C1C2 B) C1C2HS C) C1C2CHS D) C1-OLH3 E) C1CHS.

### 2.3. Expresión génica

2.3.1. Niveles de expresión relativa de genes típicos de la adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis, de las células cultivadas en monocapa:

La expresión relativa de los genes típicos de la adipogénesis resultó ser mucho mayor en la muestra control que en la muestra estimulada (Figura 32A). Por tanto, no se detectó un incremento en los niveles de expresión de genes típicos de adipocito en las células estimuladas.

En cuanto a los NRE de los genes típicos del osteogénesis, la expresión del gen *ALP* resultó ser mayor en la muestra estimulada que en control (Figura 32B). El gen *OP* presentó una expresión relativa 1000 veces superior en la muestra estimulada que en la muestra control (Figura 32B). Por tanto, se detectó un incremento en los niveles de expresión de genes típicos de osteoblasto en las células estimuladas. Estos resultados indican una clara diferenciación osteogénica por parte de las células estimuladas.

La expresión relativa del gen *COL II* resultó ser mayor en la muestra estimulada que en control (Figura 32C). La expresión de *SOX9* todavía

es mucho mayor en la muestra estimulada que en la control (Figura 32C). Por tanto, se detectó un incremento en los niveles de expresión de genes típicos de condrocitos en las células estimuladas. Estos resultados indican una clara diferenciación condrogénica por parte de las células estimuladas.

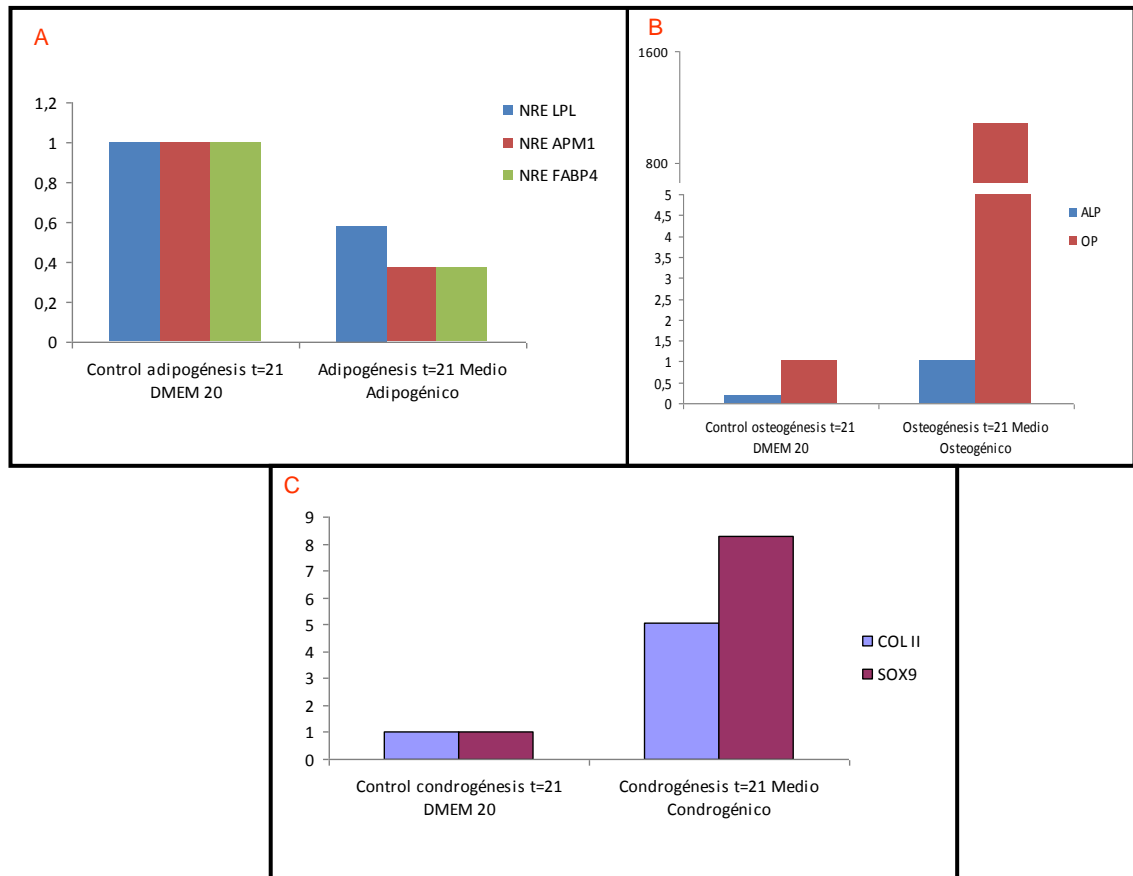


Figura 32: Gráfico de la cuantificación de la expresión génica. En la parte izquierda del gráfico se representan los NRE de la muestra control y en la parte derecha los NRE de las muestras estimuladas para su diferenciación. A) Adipogénesis: NRE de genes típicos de adipocito. B) Osteogénesis: NRE de genes típicos de osteoblasto. C) Condrogénesis: NRE de genes típicos de condrocito.

2.3.2. Niveles de expresión relativa de genes típicos de la condrogénesis, en las células sembradas sobre biomateriales:

La expresión de *COL II* se detectó en todos los biomateriales, siendo en el biomaterial C1-OLH3 el que mayor NRE presentó (Figura 33). En cuanto al gen *SOX9*, también se detectó su expresión en todos los biomateriales pero fue en C1C2HS donde los NRE fueron mayores (Figura 33).

Estos resultados indican que hubo una clara diferenciación condrogénica por parte de las células cultivadas sobre todos los biomateriales.

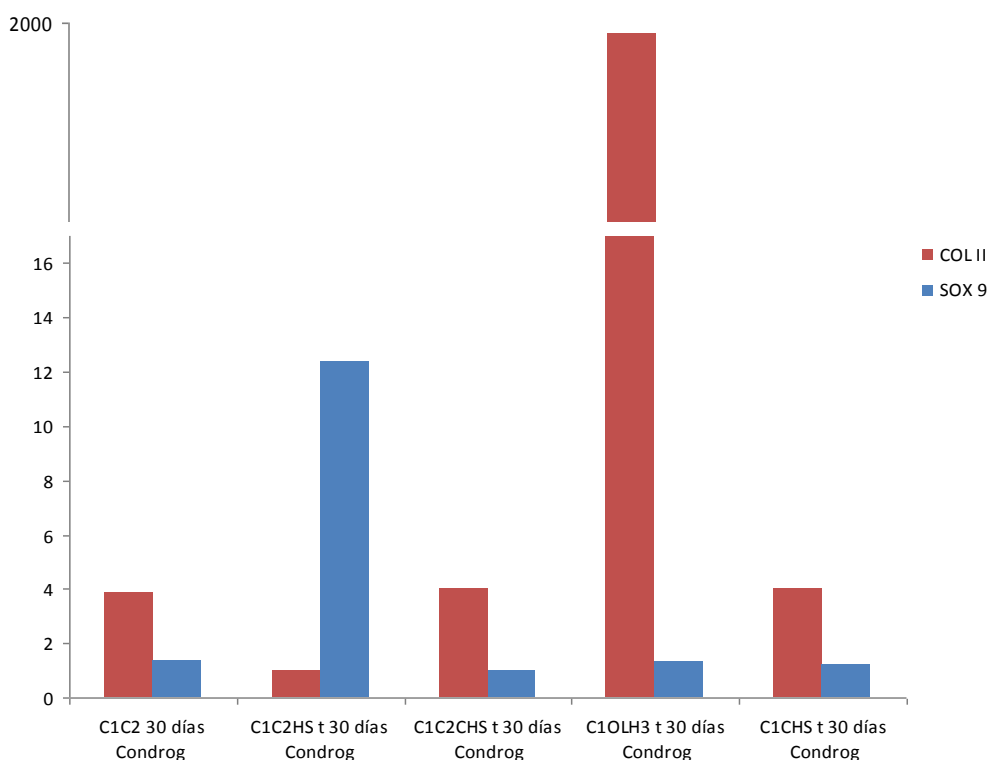


Figura 33: Gráfico de la cuantificación de la expresión génica en condrogénesis. Se representan los NRE de genes típicos de condrocito (*COL II* y *SOX9*) en los diferentes biomateriales.

2.3.3. Análisis cualitativo de la expresión de genes típicos de condrocito, en células sembradas sobre biomateriales.

En el gel electroforético se observó una única banda de amplificación para *TBP* (Figura 34A), *COL II* (Figura 34B) y *SOX9* (Figura 34C), en todos

los biomateriales. Estos resultados indican que en todos los biomateriales las células muestran diferenciación condrogénica.

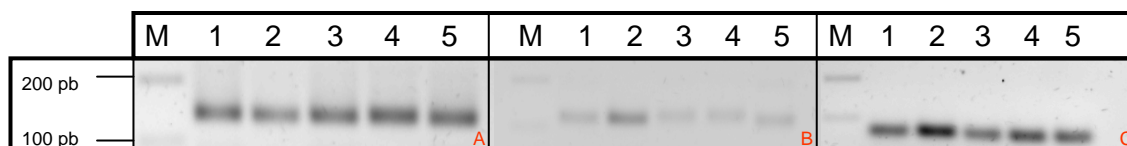


Figura 34: Análisis electroforético de los mARNs de genes que codifican para proteínas típicas de la MEC del cartílago expresados en las células sembradas sobre los soportes y sometidas a estimulación condrogénica. M: marcador molecular. Biomateriales numerados del 1 al 5 en el siguiente orden: C1C2, C1C2HS, C1C2CHS, C1-OLH3 y C1CHS. A) *TBP* B) *COL II* C) *SOX9*.

## 2.4. Microscopía electrónica.

### 2.4.1. Microscopía Electrónica de Transmisión.

En el biomaterial C1C2, la textura del biomaterial sin células fue más electrodensa (Figura 35A) que la del biomaterial con células sembradas (Figura 35B). Se observaron células de morfología irregular. En la Figura 35B se aprecia una célula con un núcleo aparente y material extracelular adyacente, en la MEC.

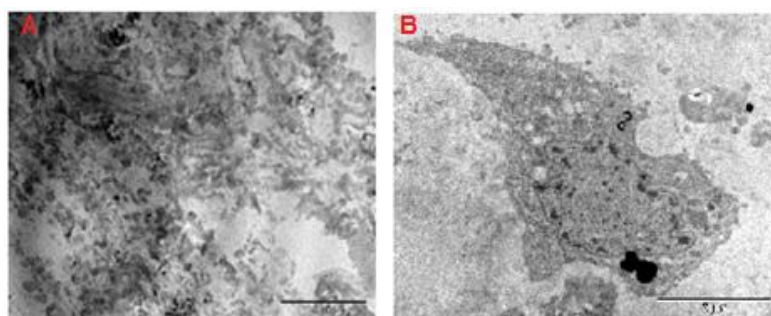


Figura 35: MET para el biomaterial C1C2: A) Biomaterial sin células B) Biomaterial con células.

En el biomaterial C1C2HS, la muestra sin células presentó una zona de fibras electrodensas y zonas de poro (Figura 36A). El biomaterial circundante a la célula (Figura 36B) difirió en aspecto al del biomaterial



sin células. Se observaron células con el contorno poco definido (Figura 36B) pero con el núcleo y nucleolo muy bien definidos; también aparecieron inmersos en el citoplasma gránulos electrodensos, vacuolas lipídicas.

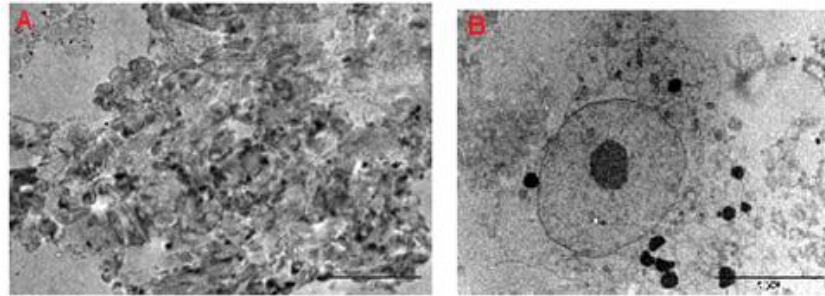


Figura 36: MET para el biomaterial C1C2HS: A) Biomaterial sin células B) Biomaterial con células.

En el biomaterial C1C2CHS, la muestra sin células mostró un entramado de fibras electrodensas (Figura 37A) que no se observaron con tanta intensidad en el biomaterial con células (Figura 37B). Las células presentaron morfología variable y una gran cantidad de vacuolas lipídicas en el interior, así como alguna dispersa en la MEC (Figura 37B).

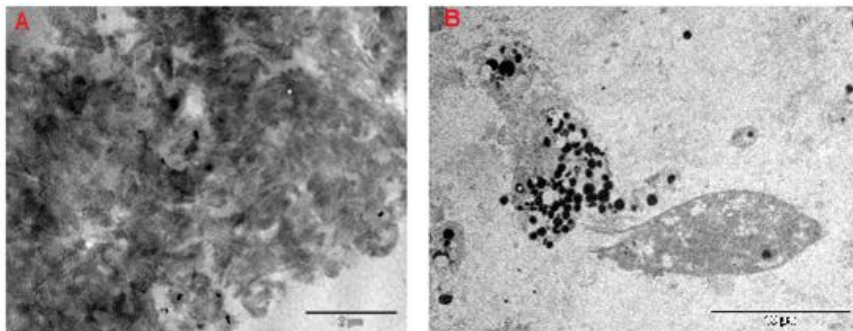


Figura 37: MET para el biomaterial C1C2CHS: A) Biomaterial sin células B) Biomaterial con células.

En el biomaterial C1-OLH3, la muestra sin células mostró un entramado de fibras electrodensas (Figura 38A) que parecen haber sido totalmente degradadas en la muestra con células (Figura 38B). Las células

presentaron una morfología irregular, con prolongaciones, y un citoplasma vacuolizado (Figura 38B).

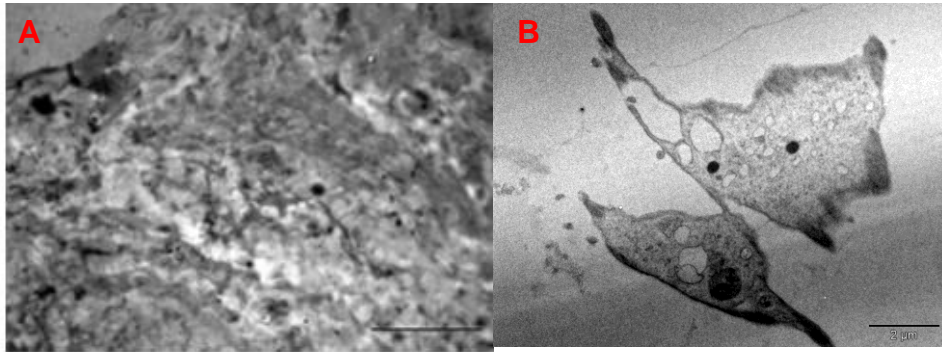


Figura 38: MET para el biomaterial C1-OLH3: A) Biomaterial sin células B) Biomaterial con células.

En el biomaterial C1CHS no se pudieron obtener imágenes de MET. Esto fue debido a que la muestra no se incluyó homogéneamente en el Spurr y esto dificultó la obtención de cortes en el ultramicrotomo, y por tanto, dificultó su observación en el microscopio.

#### 2.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido.

En el biomaterial C1C2, en las muestras sin células se observó una superficie granulosa (Figura 39A) que se vio modificada en el biomaterial con células (Figura 39B). En el biomaterial con células se encontraron depósitos celulares fusionados en acúmulos y restos desprendidos de biomaterial (Figura 39B y D). Se observaron células con aspecto redondeado (Figura 39 B y D) y células estiradas con una gran cantidad de prolongaciones.

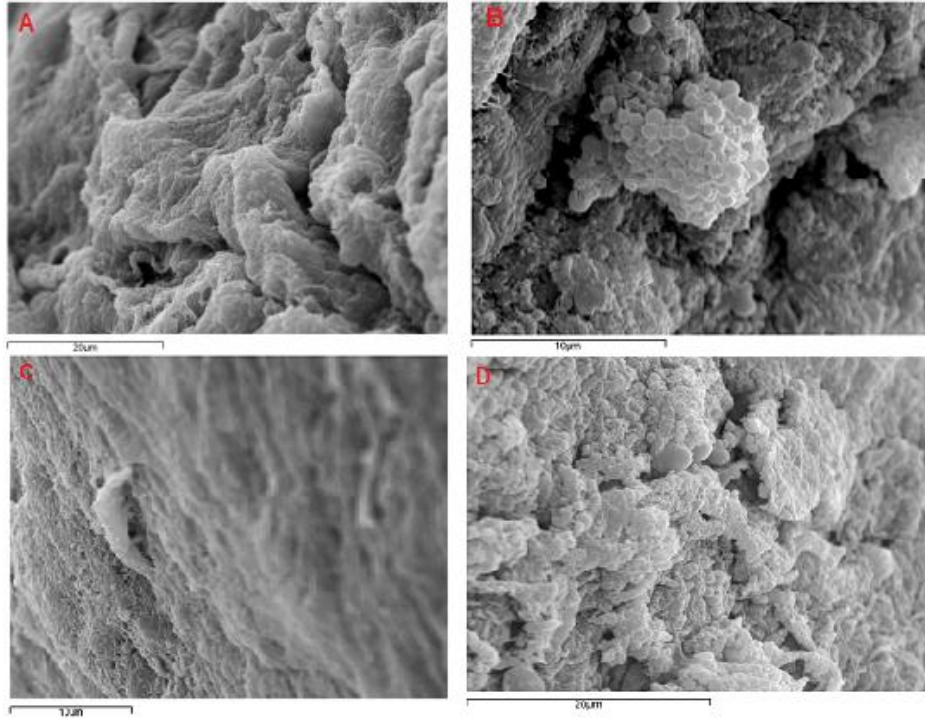


Figura 39: MEB para el biomaterial C1C2: A) Biomaterial sin células B, C, D) Biomaterial con células.

En el biomaterial C1C2HS, en las muestras sin células se observó una superficie irregular (Figura 40A). En el biomaterial con células se encontraron zonas degradadas del soporte (Figura 40C). Se observaron células con aspecto redondeado (Figura 40 B y C) y con prolongaciones (Figura 40D).

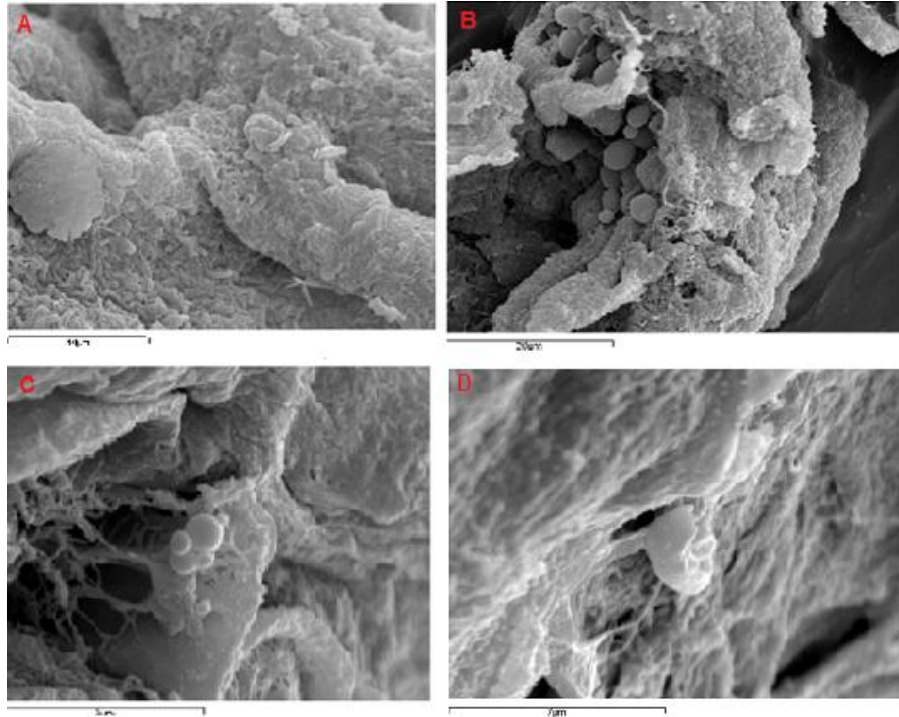


Figura 40: MEB para el biomaterial C1C2HS: A) Biomaterial sin células B, C, D) Biomaterial con células.

En el biomaterial C1C2CHS, en las muestras sin células se observó una superficie granulosa (Figura 41A). En el biomaterial con células se encontraron depósitos celulares fusionados en acúmulos (Figura 41C). Se observaron células con aspecto alargado y con gran cantidad de prolongaciones (Figura 41 B y C). En la Figura 41B se observa una célula adherida al biomaterial por múltiples prolongaciones y material con forma redondeada que simula desprenderse de la célula.

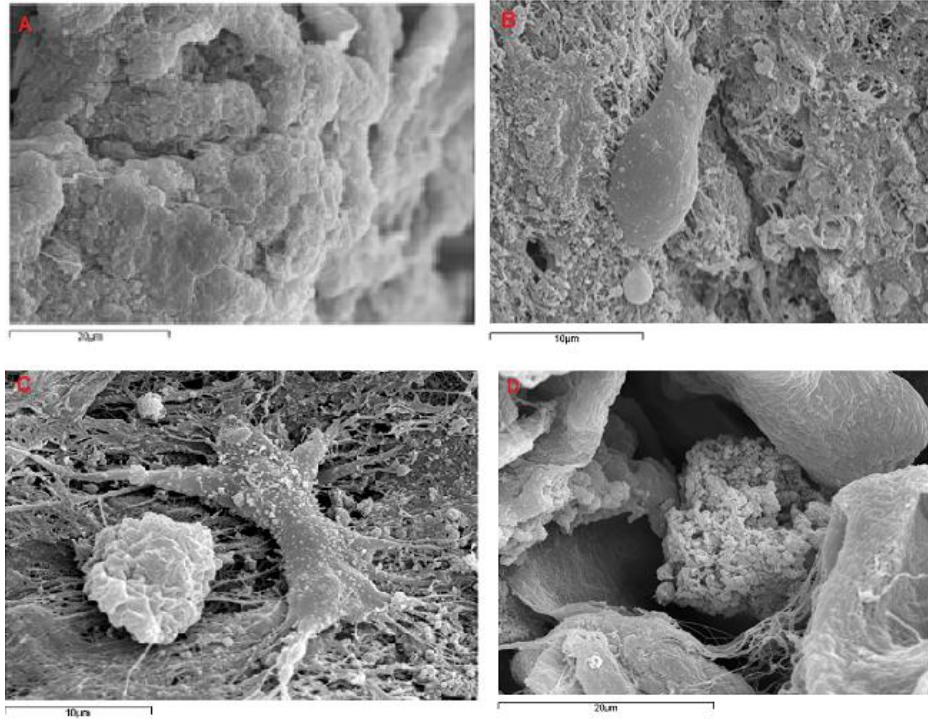


Figura 41: MEB para el biomaterial C1C2CHS: A) Biomaterial sin células B, C, D) Biomaterial con células.

En el biomaterial C1-OLH3, en las muestras sin células se observó una superficie lisa fibrosa (Figura 42A) que en el biomaterial con células se vio degradada, en mayor o menor medida (Figura 42 B, C y D). En el biomaterial con células se encontraron células con aspecto redondeado y con pocas prolongaciones (Figura 42 B y C), aunque largas. También se encontraron células con una secreción activa de materia extracelular (Figura 42D).

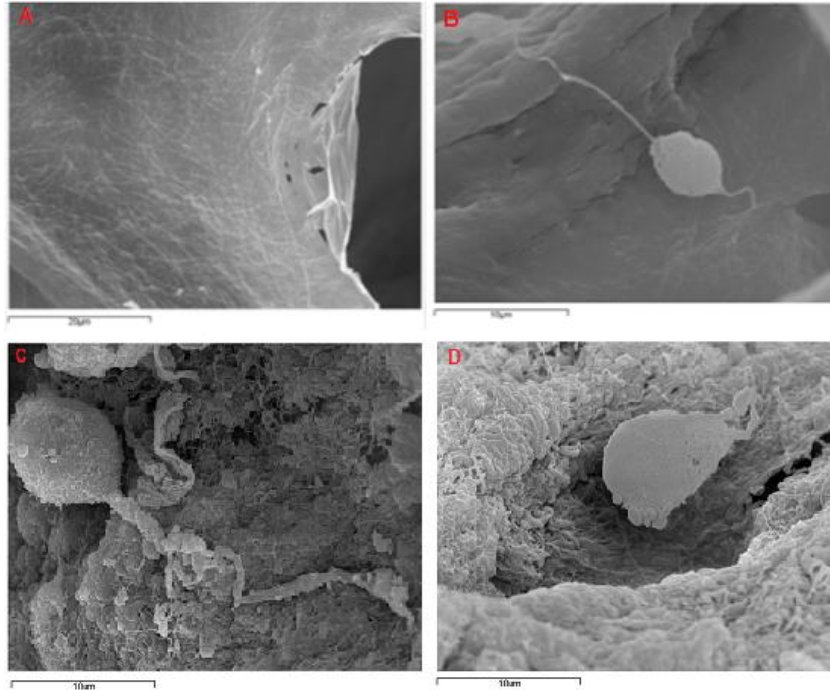


Figura 42: MEB para el biomaterial C1-OLH3: A) Biomaterial sin células B, C, D) Biomaterial con células.

En el biomaterial C1CHS, en las muestras sin células se observó una superficie fibrosa irregular (Figura 43A) que en el biomaterial con células se vio degradada (Figura 43 B, C y D). En el biomaterial con células se encontraron depósitos celulares fusionados en acúmulos (Figura 43 B, C y D) y células con aspecto redondeado, sin prolongaciones aparentes (Figura 43B). En la Figura 43C se observa la MEC, una red de fibras, depósitos y vacuolas.

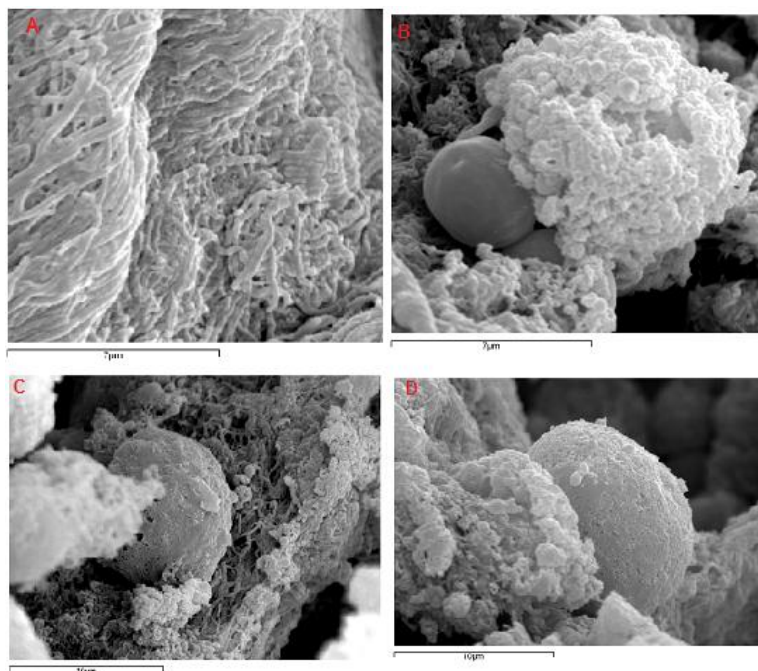


Figura 43: MEB para el biomaterial C1CHS: A) Biomaterial sin células B, C, D) Biomaterial con células.

El análisis morfológico realizado en MEB mostró células con morfologías variables desde redondeadas (Figura 40, Figura 42 y Figura 43) a totalmente aplanadas (Figura 39 y Figura 41) y con presencia (Figura 39, Figura 41 y Figura 42) o no (Figura 40 y Figura 43) de prolongaciones visibles. En todos los biomateriales aparecen acúmulos de materiales esféricos más o menos fusionados y también suelen aparecer esferas de poco tamaño en las cercanías de las células. Como se puede observar en la Figura 41, estas esferas parecen surgir de la célula. Estas estructuras esféricas parecen tener su correspondiente en MET, los acúmulos electrodensos que no sólo se encuentran fuera de las células (Figura 37) si no parecen estar también en su interior (Figura 35, Figura 36 y Figura 38). Estos acúmulos son tan electrodensos debido a su alta afinidad al tetróxido de osmio, lo que indica su alto contenido en lípidos. Esto puede indicar que se tratan de vesículas y que, por tanto, la célula está secretando activamente material al exterior y que este material se agrega. Estos agregados que se observan en MEB pero no en MET,

parecen estar recubriendo a las propias células que los secretan. Una característica que apoya esta hipótesis es que el tamaño de los acúmulos es igual al tamaño de una célula (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ).

## 2.5. Ensayos de Elisa.

### 2.5.1. Para la detección de colágeno.

Teniendo en cuenta el propio colágeno detectado en los biomateriales sin células, se ha detectado colágeno procedente de las células en todos los biomateriales sembrados. En C1C2 (Figura 44A), C1C2HS (Figura 44B) y C1-OLH3 (Figura 44D) se detectó un patrón similar de liberación de colágeno, cuyo máximo pico se encontró en torno al 11<sup>o</sup> día ( $t=11$ ). En C1C2CHS se detectó mayor concentración de colágeno a  $t=4$  y  $t=21$  (Figura 44C) y el patrón de liberación fue totalmente inverso a C1C2, C1C2HS y C1-OLH3. En C1CHS el mayor pico de liberación se registró al inicio ( $t=4$ ), tras el cual descendió bruscamente; hubo un ligero repunte hacia el día 14 y no se detectó más colágeno en el resto de días que duró el experimento (Figura 44E).



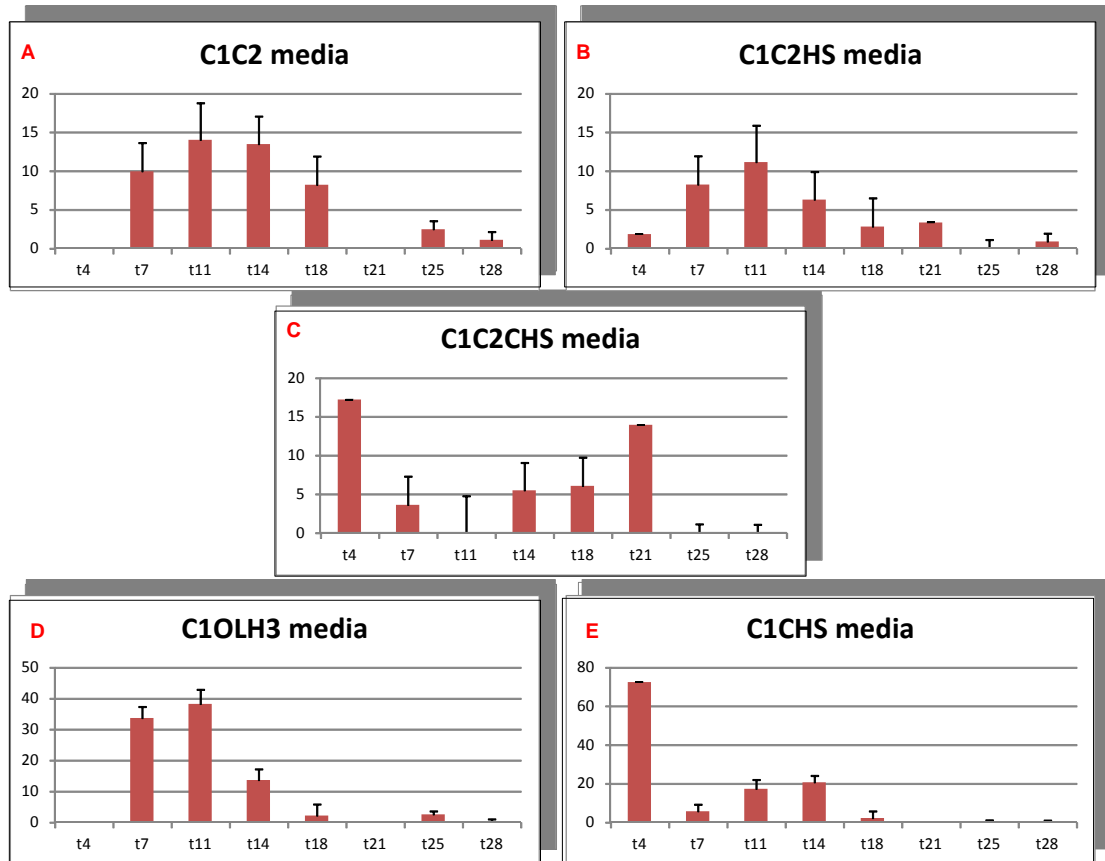


Figura 44: Gráficas en las que se representa la concentración media de colágeno ( $\mu\text{g}/250\mu\text{l}$  de sobrenadante, eje Y) a diferentes tiempos (t, eje X), junto con su E.E.  
 A) Biomaterial C1C2. B) Biomaterial C1C2HS. C) Biomaterial C1C2CHS. D) Biomaterial C1-OLH3. E) Biomaterial C1CHS.

No hay evidencia estadística de que la haya diferencias en la liberación media de colágeno por parte de las células sembradas sobre los biomateriales C1C2, C1C2HS, C1C2CHS y C1CHS ( $p$ -valores  $> 0,05$ ). Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la liberación media de colágeno por parte de las células sembradas sobre el biomaterial C1-OLH3 y C1CHS ( $p$ -valor = 0,056), y entre C1-OLH3 y los demás biomateriales ( $p$ -valor = 0,032).

2.5.2. Para la detección de glucosaminoglucanos y proteoglucanos sulfatados.

Los ensayos de Elisa para la detección para GAGs y proteoglucanos sulfatados se realizaron en 20 sobrenadantes, recogidos de los pocillos

en los que los biomateriales con células presentaban mayor proliferación celular. Los resultados han sido negativos y por ello no se continuó ensayando con las demás muestras.

## DISCUSIÓN

Las células obtenidas de la médula ósea humana efectivamente resultaron ser CMMs. Estas células mostraron adherencia al plástico y una morfología fibroblástica, características propias de CMMs-MOh [20]. Los resultados de citometría mostraron que la población celular presentaba positividad para marcadores típicos de CMMs-MOh [26] como son CD90, CD44, CD73, CD166, CD105 y CD29 y no la presentan para marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45). A pesar de la baja positividad de marcadores de membrana como CD271 y CD105, que se demostró que favorecen la condrogénesis [27, 28], tanto los análisis citológico/histológico y morfométricos como los análisis moleculares muestran que existe diferenciación de las CMMs-MOh hacia células similares a condrocitos.

El fenotipo de estas CMM-MOh se corrobora con los resultados obtenidos en el análisis histológico, en el que se aprecia la diferenciación hacia múltiples linajes celulares mesenquimales. Sin embargo, en el análisis de expresión génica no se detectó la expresión de genes típicos de la adipogénesis, aunque sí para la osteogénesis y la condrogénesis. Esto se debe a que las células madre presentan distinciones biológicas dependiendo de la fuente tisular de la que se obtiene y, en el caso de médula ósea, las CMMs presentan mayor potencial para la diferenciación osteogénica [29].

Para que un biomaterial se considere idóneo para la ingeniería tisular, éste debe ser poroso, permitir la proliferación celular, ser degradable y permitir la nueva formación de tejido [19].

En los 5 biomateriales se observó porosidad, en mayor o menor grado. Los biomateriales con menor porosidad (C1C2 y C1C2HS) fueron en los que se obtuvo, de forma más clara, tejido de nueva formación. En diferentes estudios de diferenciación condrogénica sobre biomateriales, observaron que el neotejido se formaba únicamente en la periferia [30, 31]

pero tanto en el biomaterial C1C2 como el C1C2HS se observó una distribución homogénea de células y de MEC. En microscopía electrónica también se pudo observar esta distribución uniforme. Esto indica que el tamaño de poro permite de forma adecuada la difusión de nutrientes y la eliminación de residuos del biomaterial [30]. Se observó degradación en todos los biomateriales y se pudo observar en los 5 biomateriales proliferación celular, siendo el biomaterial C1C2HS el que permitió una proliferación mayor. Aunque algunos autores señalan que la degradación de los biomateriales puede dar lugar a productos que resulten tóxicos para las células [8], estos biomateriales están formados de compuestos naturales que se encuentran de forma habitual en la MEC. Tanto en MET cómo en MEB, se pudo observar la integridad celular.

Cuando las células madre mesenquimales se diferencian hacia condrocitos, las células adquieren una morfología esférica y expresan el factor esencial de transcripción para la condrogénesis, *SOX 9* [32]. La expresión de otros genes específicos del cartílago son *COL II* y agregano [1]. En MET se observaron células con morfología esférica en C1C2HS y en C1-OLH3. Los NRE de *SOX 9* y *COL II* estuvieron presentes en todos los biomateriales, pero fue en C1C2HS donde se expresó más *SOX 9* y en C1-OLH3 donde se expresó más *COL II*. Los ensayos de Elisa mostraron liberación de colágeno en todos los biomateriales pero no mostraron liberación de GAGs y proteoglucanos. La mayor liberación de colágeno en los 5 biomateriales tuvo lugar principalmente a los 11 días del inicio del experimento, a los 14 días y a los 21, indicando el momento de la condrogénesis. En otros trabajos de diferenciación condrogénica sobre biomateriales detectaron condrogénesis a los 14 días [9] y a los 21 días [31]. El que no se detecten GAGs ni proteoglucanos puede ser debido a que la técnica de Elisa no es una técnica con gran sensibilidad. En este sentido, en diferentes estudios de diferenciación condrogénica sobre biomateriales se ha comprobado que las concentraciones de GAGs y proteoglucanos son despreciables hasta, al menos, la 5ª semana de

cultivo [30, 32, 9]. Algunos autores sugieren que el agrecano no debería ser seleccionado como marcador de diferenciación condrogénica debido a que su expresión es altamente dependiente de la variabilidad del paciente [33]. Otros autores encontraron que el agrecano sólo es fácilmente detectable en muestras cuyo medio de diferenciación condrogénico se suplementó con 20 ng de TGF $\beta$  [9].

Una cuestión crucial en la ingeniería tisular de cartílago y osteocondral es la definición del nivel de madurez que debe tener un constructo, a la hora de poder implantarse, para permitir una reparación óptima [30]. Teniendo esto en cuenta, creemos que estos resultados pueden ser mejorados. En un futuro se tratará de realizar experimentos con los biomateriales que mostraron mejores resultados, C1C2 y C1C2HS, que incluyan más pacientes. Se tratará de realizar un estudio histológico más amplio de los constructos y se tratará de comprobar mediante otro tipo de técnicas la presencia de GAGs y proteoglucanos.

## CONCLUSIONES

1. Se consiguieron aislar CMMs de la MO humana.
2. Se demostró que las células aisladas eran CMMs porque presentaban el fenotipo característico de estas células y, además, eran multipotentes.
3. Todos los biomateriales permitieron el crecimiento de CMMs-MOh.
4. Las CMMs-MOh se diferenciaron, en mayor o en menor medida, sobre todos los biomateriales. Sólo en el biomaterial C1C2HS se formó un neot Tejido de propiedades similares a las del cartílago.
5. Tras la valoración de los constructos, se considera que el biomaterial C1C2HS es el más adecuado para la formación de constructos útiles en la ingeniería tisular del cartílago. En un futuro, es necesario el desarrollo de un modelo de reparación de cartílago articular, *in vitro* e *in vivo*, con el biomaterial C1C2HS para evaluar su posible aplicación clínica. Así mismo, es necesario realizar más experimentos que definitivamente confirmen que los demás biomateriales no son válidos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Grigolo B, Roseti L, Neri S, Gobbi P, Jensen P, Major EO, et al. Human articular chondrocytes immortalized by HPV-16 E6 and E7 genes: Maintenance of differentiated phenotype under defined culture conditions. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10:879-889.
- [2] Suárez Aliaga B. Tejidos esqueléticos. En: Wheeler. *Histología funcional. Texto y Atlas en color*. 3ª Ed. Madrid: Churchill Livingstone; 1993.
- [3] Blanco García FJ, Cañete Crespillo JD, Pablos Álvarez JL, directores. *Monografías SER. Técnicas de Investigación Básica en Reumatología*. Madrid: Sociedad Española de Reumatología; 2007.
- [4] Sociedad Española de Reumatología. *Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. Madrid: Sociedad Española de Reumatología; 2010.
- [5] Jarmey C. *Libro conciso del cuerpo en movimiento*. Badalona: Paidotribo; 2009.
- [6] Lareu RR, Zeugolis DI, Abu-Rub M, Pandit A, Raghunath M. Essential modification of the Sircol collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions. *Acta Biomater*. 2010;6:3146-3151.
- [7] Negri S, Fila C, Farinato S, Bellomi A, Pagliaro PP. Tissue engineering: chondrocyte cultures on type I collagen support. *Cytohystological and immunohistochemical study*. 2007; 1:158-159.
- [8] Elder SH, Cooley AJ Jr, Borazjani A, Sowell BL, To H, Tran SC. Production of Hyaline-like Cartilage by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Self-Assembly Model. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15: 3025-3036.

- [9] Lisignoli G, Cristino S, Piacentini A, Toneguzzi S, Grassi F, Cavallo C, et al. Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. *Biomaterials*. 2005; 26:5677-5686.
- [10] Ishiguro N, Kojima T, Poole R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci*. 2002; 65:73–84.
- [11] Ross MH, Pawlina W. *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 5ªEd. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- [12] Brooks PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol*. 2002; 14:573–577.
- [13] Haq SA, Davatchi F. Osteoarthritis of the knees in the COPCORD world. *Int J Rheum Dis*. 2011; 14:122–129.
- [14] Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9:213.
- [15] Díaz-Prado S, Rendal-Vázquez ME, Muñíos-López E, Hermida-Gómez T, Rodríguez-Cabarcos M, Fuentes-Boquete I, et al. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank*. 2009; 11:183–195.
- [16] Fuentes-Boquete IM, Arufe Gonda MC, Díaz Prado SM, Hermida Gómez T, de Toro Santos FJ, Blanco García FJ. Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular. *Reumatol Clin*. 2007; 3 Supl 3:S63-69.
- [17] Habib NA, Gordon MY, Levičar N, Jiao L, Thomas-Black G, editors. *Stem Cell Repair and Regeneration*. 3ª Ed. London: Imperial College Press; 2005.



- [18] Tritz-Schiavi J, Charif N, Henrionnet C, de Isla N, Bensoussan D, Magdalou J, et al. Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng.* 2010; 20:167-174.
- [19] Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 2008; 17: S467-S479.
- [20] Díaz-Prado S, Muñíos-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17:49-59
- [21] Hermida Gómez T. Estudio descriptivo de las células madre mesenquimales en la articulación artrósica y su aplicación en terapia celular para reparar cartílago articular humano. [Tesis doctoral]. Universidade da Coruña: 2010.
- [22] Facchini A, Lisignoli G, Cristino S, Roseti L, De Franceschi L, Marconi E, et al. Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology.* 2006; 43:471-480.
- [23] Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br.* 1997; 79:831-836.
- [24] Mouw JK, Case ND, Guldberg RE, Plaas AH, Levenston ME. Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005; 13:828-836.
- [25] Livak RJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. 2001; 25:402-408.

- [26] Muñíos López E. La membrana amniótica humana: caracterización de las células madre y su aplicación en terapia celular para reparar lesiones de cartílago articular humano. [Tesis doctoral]. Universidade da Coruña: 2010
- [27] Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Gimeno-Longas MJ, Muñíos-López E, Díaz-Prado S, de Toro FJ, Blanco FJ. Bone marrow cells immunomagnetically selected for CD271+ antigen promote in vitro the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:1169-1179.
- [28] Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes-Boquete I, De Toro FJ, Blanco FJ. Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J Cell Biochem*. 2009;108:145-155.
- [29] Fuentes Boquete IM, Arufe Gonda MC, Díaz Prado SM, Hermida Gómez T, de Toro Santos FJ, Blanco FJ. Cell and Tissue Transplant Strategies for Joint Lesions. *The Open Transplantation Journal*. 2008;2:21-28.
- [30] Scotti C, Mangiavini L, Boschetti F, Vitari F, Domeneghini C, Fraschini G, et al. Effect of in vitro culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010; 18:1400-1406.
- [31] Ragetly GR, Griffon DJ, Lee H-B, Fredericks LP, Gordon-Evans W, Chung YS. Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Acta Biomater*. 2010; 6:1430-1436.
- [32] Hu J, Feng K, Liu X, Ma PX. Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network. *Biomaterials*. 2009; 30:5061-5067.

[33] Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, et al. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials*. 2002; 23:1187-1195.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio pudo llevarse a cabo gracias al apoyo de subvenciones por parte de:

- *Servizo Galego de Saúde.*
- *Xunta de Galicia (PS07/84)*
- Cátedra Bioibérica de la *Universidade da Coruña.*
- Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. *Universidade da Coruña.*
- Instituto de Salud Carlos III CIBER BBN CB06-01-0040
- Ministerio de Ciencia e Innovación PLE2009-0144
- Fondo de Investigación Sanitaria-PI 08/2028 con la participación de fondos del FEDER (Comunidad Europea).
- Opocrin, S.P.A.
- Universidad Alcalá de Henares. Dpto. de Especialidades Médicas.
- Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Quisiera agradecer a mi tutora de proyecto la Dra. Silvia Díaz Prado por apoyarme, enseñarme y guiarme a lo largo de todo el trabajo. Agradecer al Dr. Francisco J. Blanco por la oportunidad de realizar este trabajo de investigación. Agradezco al Dr. Isaac Fuentes Boquete su apoyo para realizar este máster. Gracias a todo el grupo de Terapia Celular e Ingeniería Tisular, al grupo CIBER y, en general, a todo el grupo de Reumatología del INIBIC. En especial quisiera agradecer a la Dra. Emma Muñíos López, a María José Sánchez Dopico y a la Dra. Tamara Hermida Gómez, por dedicarme su ayuda, tiempo y paciencia.

Tampoco podrían faltar mis agradecimientos al personal de Servicios Centrales de Histomorfología del INIBIC, Purificación Filgueira Fernández y Noa Goyanes Rey. Gracias también a las Dras. Ada Castro Couceiro y Catalina Sueiro López, del SAI.

Por último, gracias a mis padres, mis amigos y a mi pareja, por apoyarme. En especial agradecer a Oly por estar siempre ahí, a Helvia por soportar tantas horas de trabajo codo con codo y a Pablo por ser tan especial.

## ANEXO 1



### INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

**D. / Dña.:**

#### **INTRODUCCIÓN.-**

Se le propone participar en un proyecto de investigación sobre enfermedades del aparato locomotor que será realizado por el Servicio de Reumatología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, bajo la dirección del **Dr. Blanco.**

Este proyecto será realizado en la Unidad de Investigación del C.H.U. A Coruña.

#### **OBJETIVO DEL PROYECTO.-**

El objetivo de este estudio se centra en estudiar los mecanismos que participan en la patogénesis de las enfermedades del aparato locomotor.

#### **DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.-**

Usted ha sido sometido a una intervención quirúrgica en la que se le han extraído tejidos articulares los cuales, siguiendo la normativa de eliminación de residuos biológicos, serán incinerados. Si usted decide participar en este estudio, sus tejidos, en lugar de ser eliminados, serán enviados a la Unidad de Investigación del C.H.U. A Coruña para que se almacenen en el Banco de Muestras de dicho Hospital para, posteriormente, realizar los estudios de investigación encaminados a conocer mejor por qué se producen algunas enfermedades del aparato locomotor.

Así mismo se le solicita autorización para la extracción de saliva o 10ml de sangre, siendo extraída esta última siguiendo el procedimiento rutinario para efectuar análisis estándar de sangre.

### **RIESGOS.-**

Usted no va a sufrir ningún tipo de inconveniente o riesgo físico adicional al de la propia intervención quirúrgica a la que se le ha sometido, por consentir la utilización de las muestras que se le han extraído durante la misma.

### **COMPENSACIÓN.-**

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación, independientemente de que los resultados de los estudios que se van a realizar puedan dar lugar a patentes con fines médicos.

### **CONFIDENCIALIDAD.-**

Toda la información que se obtenga de analizar su muestra, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en las investigaciones futuras, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra de sangre no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde el mismo momento de la extracción con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en las bases de datos donde figure la información clínica o genética referida a usted. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado del equipo investigador, adoptándose las medidas necesarias para que tal información no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto. De

esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de su muestra de sangre permanezca confidencial.

Es importante que entienda que existe la posibilidad de que sus datos y parte de su muestra sean transferidos a otros equipos de investigación que trabajen en el mismo campo. En tal caso, se asegurará que estos datos sean tratados con la misma confidencialidad descrita anteriormente. Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en el proyecto, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

#### **NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS.-**

Como ya se ha descrito, se adoptarán estrictas medidas de seguridad para garantizar la confidencialidad de los resultados de los estudios realizados.

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se hayan completado los proyectos de investigación.

Usted debe saber que, en cumplimiento de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.



En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, se podrá informar a los afectados o a sus representantes legales.

#### **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA.-**

Su participación en el proyecto de investigación es totalmente voluntaria.

Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar.

Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos.

Si decide retirar su consentimiento, su muestra será destruida y sólo se guardará la información obtenida hasta ese momento.

Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su asistencia médica presente o futura.

#### **OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL.-**

Usted puede contactar con cualquier miembro del Servicio de Reumatología del C.H.U. A Coruña si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente, en el teléfono 981176399.

En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre del paciente),

He leído la información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el proyecto.

He recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado de ello con \_\_\_\_\_

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

---

**FIRMA DEL PACIENTE**                      **Nombre**                      **Fecha**

He explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al donante y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

---

**FIRMA**

**Nombre**

**Fecha**

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ACOMPAÑANTE

Yo, \_\_\_\_\_(nombre del acompañante del paciente), con DNI:\_\_\_\_\_ y en calidad de \_\_\_\_\_(parentesco con el donante) certifico que a \_\_\_\_\_(nombre del paciente)

Se le ha leído la información establecida en este escrito

Se le ha entregado copia de esta información.

Ha podido hacer preguntas sobre el proyecto.

Ha recibido suficiente información sobre el mismo.

Hemos hablado de ello con\_\_\_\_\_

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirar su consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presta libremente su conformidad para participar en el proyecto

---



## ANEXO 2

Ac	DILUCIÓN Ac 1 <sup>ARIO</sup>	ESPECIFICIDAD	CLON	CASA COMERCIAL
Isotipo FITC	1:50	Inmunoglobulina (Ig) G1 kappa ( $\kappa$ ) FITC-ratón. Isotipo control	MOPC-21	BD Pharmingen™
Isotipo PE	1:50	IgG1 $\kappa$ PE-ratón. Isotipo control	MOPC-21	BD Pharmingen™
Isotipo PECy5	4:50	IgG1 $\kappa$ ratón. Isotipo control PECy5	1F8	Abcam
Isotipo APC	4:50	IgG1 $\kappa$ ratón. Isotipo control APC	MOPC-21	BD
$\alpha$ -mouse	1:50	Conejo anti-ratón. Ig-FITC	F0313	Dako (PALEX MEDICAL, S.A.)
R-PE-CD29	3:50	Inmunoglobulina (Ig)G, IgA, IgM murinas	MAR4	BD Pharmingen™
R-PE-CD34	4:50	Integrina $\beta$ 1 Receptor Antígeno de Activación Tardío (VLA) del leucocito	581	BD Pharmingen™
FITC-CD44	1:50	Antígeno de Células Progenitoras Hematopoyéticas 1 (HPCA-1)	IM7	BD Pharmingen™
FITC-CD45	3:50	Molécula de Adhesión Asociada al Anidamiento (HCAM)	HI30	BD Pharmingen™
CD69 (NM*)	3:50	Antígeno Leucocitario Común (LCA)	FN50	BD Pharmingen™
PE-CD73	3:50	Antígeno de Activación Temprano (VEA) del linfocito	AD2	BD Pharmingen™
PE-Cy5-CD90	1:50	Ecto-5'-nucleotidasa y la Glicoproteína de anclaje a la Glicosil fosfatidilinositol (GPI)	5E10	BD Pharmingen™
FITC-CD105	1:50	Thy-1	SN6	AbD Serotec
PE-CD106	6:50	Endoglina	51-10C9	BD Pharmingen™
APC-CD117	2:50	Molécula de Adhesión Vascular de la Célula 1 (VCAM-1)	YB5.B8	AbD Serotec
R-PE-CD166	3:50	c-kit, Receptor del Factor de Células Madre (SCFR)	3A6	BD Pharmingen™
CD271	1,5:1000	Molécula de Adhesión Celular del Leucocito Activado (ALCAM)	ME20.4	Sigma Aldrich Química
SSEA-4 (NM*)	2:50	Receptor del Factor de Crecimiento Neuronal (NGFR) de baja afinidad humano p75	MC-813-70	R & D Systems
STRO-1 (NM*)	0.45 $\mu$ g	Antígeno Específico de Estado Embrionario 4	NS1-Ag4-1	GRUPO 3
ANTIFIB (NM*)	1:1000	Ratón anti-fibroblasto	1B10	Sigma Aldrich Química

Tabla 1: Listado de Ac. Ac conjugados con Ficoeritrina (*phycoerythrin*, PE), Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*, FITC) o Aloficocianina (*Allophycocyanin*, APC) específicos para marcadores humanos asociados con linajes hematopoyéticos y mesenquimales. NM\*, Ac 1<sup>OS</sup> no marcados que necesitan la adición de un Ac 2<sup>O</sup>.