



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

**MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA
ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**

Curso académico 2013-2014

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

Diferenciación condrogénica *in vitro* de
biomateriales de fibrina y células madre
mesenquimales inmortalizadas

Lucía Gato Calvo

22 de Junio de 2014

Trabajo de Fin de Mestrado dirixido por:

Dra. Elena Fernández Burguera e Dr. Francisco Javier Blanco García

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
1. RESUMEN.....	1
1.1. RESUMEN.....	1
1.2. RESUMO	2
1.3. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR: COMPOSICIÓN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN..	5
2.2. LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.....	6
2.3. LA ARTROSIS	7
2.4. REPARACIÓN DE LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR: LA NECESIDAD DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS	8
2.5. LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y LA LÍNEA CMMH-3A6.....	10
2.6. EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y SU USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS	13
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
4.1. REACTIVOS.....	18
4.2. CULTIVO EN MONOCAPA DE CÉLULAS DE LA LÍNEA CMMH-3A6	19
4.3. OBTENCIÓN DE PLASMA DE OVEJA	20
4.3.1. <i>Hematología de la sangre de oveja</i>	20
4.3.2. <i>Separación de las fases</i>	20
4.4. PREPARACIÓN DE LOS BIOMATERIALES DE PLASMA COMBINADO CON CÉLULAS.....	21
4.5. CULTIVO DE LOS BIOMATERIALES Y ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN A LINAJE CONDROGÉNICO	22

4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULAR CON ALAMARBLUE®	24
4.7. HISTOLOGÍA DE LOS BIOMATERIALES	24
4.7.1. <i>Fijación, deshidratación e inclusión en parafina</i>	25
4.7.2. <i>Tinciones</i>	25
4.8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LOS BIOMATERIALES Y CONTROLES	26
4.8.1. <i>Aislamiento del ARN</i>	26
4.8.2. <i>Medidas de cantidad y calidad del ARN</i>	28
4.8.3. <i>Síntesis de ADN complementario</i>	28
4.8.4. <i>Experimentos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real</i>	29
5. RESULTADOS	31
5.1. ENRIQUECIMIENTO EN PLAQUETAS TRAS LA SEPARACIÓN DE LAS FASES	31
5.2. CULTIVO Y ANÁLISIS DE ACTIVIDAD CELULAR DE LOS BIOMATERIALES Y CONTROLES	32
5.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS BIOMATERIALES CULTIVADOS	33
5.3.1. <i>Valoración general de la estructura y la morfología celular</i>	33
5.3.2. <i>Valoración de la diferenciación condrogénica</i>	37
5.3.3. <i>Valoración de la diferenciación angiogénica</i>	39
5.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LOS BIOMATERIALES Y CONTROLES	39
5.4.1. <i>Estabilidad de expresión de genes de referencia</i>	39
5.4.2. <i>Expresión génica relativa de genes específicos de condrogénesis</i>	40
6. DISCUSIÓN	47
7. CONCLUSIONES	53
8. AGRADECIMIENTOS	54
9. BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE UNA ARTICULACIÓN DIARTRODIAL Y DETALLE DE LA HISTOLOGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR HIALINO -----	5
FIGURA 2. ESQUEMA DE UN DEFECTO FOCAL (A) Y UNA LESIÓN OSTEOCONDRA (B) -----	7
FIGURA 3. CMM HUMANAS EN CULTIVO-----	11
FIGURA 4. FORMATOS DE PRP Y PRGF DE <i>PRGF®-ENDORET®</i> -----	15
FIGURA 5. ESQUEMA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CENTRIFUGACIÓN --	21
FIGURA 6. MEMBRANA DE PLASMA -----	22
FIGURA 7. ESQUEMA DE LOS BIOMATERIALES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO INICIAL-----	23
FIGURA 8. BIOMATERIAL FIJADO EN FORMALDEHIDO -----	25
FIGURA 9. RECOGIDA DE LOS BIOMATERIALES 3D -----	27
FIGURA 10. PROPORCIONES DE PLAQUETAS Y LEUCOCITOS CON RESPECTO A LA SANGRE FRESCA -----	31
FIGURA 11. CONTROLES DE CONDRÓGENESIS A LOS 7 Y 14 DÍAS DE CULTIVO--	32
FIGURA 12. PORCENTAJE DE <i>ALAMARBLUE®</i> REDUCIDO A LOS 7, 14 Y 21 DÍAS DE CULTIVO -----	33
FIGURA 13. TINCIÓN HE DE LOS BIOMATERIALES 3D A LOS 4 DÍAS DE CULTIVO	34
FIGURA 14. TINCIÓN HE DE LOS BIOMATERIALES 3D A LOS 21 DÍAS DE CULTIVO -----	35
FIGURA 15. TINCIÓN HE DE BIOMATERIALES 3D CONDRÓGENICOS -----	36
FIGURA 16. TINCIÓN HE DE LOS BIOMATERIALES 2D A LOS 21 DÍAS DE CULTIVO -----	37
FIGURA 17. TINCIONES MM (A), AA-PAS (B), AT (C) Y SO (D) DE LOS BIOMATERIALES 3D CULTIVADOS EN MEDIO CONDRÓGENICO A LOS 14 DÍAS DE CULTIVO -----	38
FIGURA 18. ESTABILIDAD DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE REFERENCIA TESTADOS -----	40

FIGURA 19. NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES COLI, COLII, ACAN Y SOX9 EN LOS BIOMATERIALES 3D A LOS 14 DÍAS DE CULTIVO. RESULTADOS EXPRESADOS COMO MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR-----	41
FIGURA 20. NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES COLI, COLII, ACAN Y SOX9 EN LOS BIOMATERIALES 3D A LOS 21 DÍAS DE CULTIVO. RESULTADOS EXPRESADOS COMO MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR-----	42
FIGURA 21. NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES COLI, COLII, ACAN Y SOX9 EN LOS BIOMATERIALES 2D A LOS A. 7, B. 14 Y C. 21 DÍAS DE CULTIVO. RESULTADOS EXPRESADOS COMO MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR---	43
FIGURA 22. NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES COLI, COLII, ACAN Y SOX9 EN LOS BIOMATERIALES 3D DEL SEGUNDO EXPERIMENTO A LOS 7 DÍAS DE CULTIVO. RESULTADOS EXPRESADOS COMO MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR -----	44
FIGURA 23. NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES COLI, COLII, ACAN Y SOX9 EN LOS BIOMATERIALES 3D DEL SEGUNDO EXPERIMENTO A LOS A. 14 Y B. 21 DÍAS DE CULTIVO. RESULTADOS EXPRESADOS COMO MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR-----	45
FIGURA 24. NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES VWF Y CDH5 A LOS A. 14 Y B. 21 DÍAS DE CULTIVO. RESULTADOS EXPRESADOS COMO MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR-----	46

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. CEBADORES Y SONDAS EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE REFERENCIA Y LOS GENES ESPECÍFICOS DE CONDRÓGENESIS Y ANGIOGÉNESIS -----	29
TABLA II. RECUENTO DE PLAQUETAS Y LEUCOCITOS ANTES Y DESPUÉS DE LA CENTRIFUGACIÓN-----	31

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

β -Act	Beta Actina
2D	Bidimensional
CMMh-3A6	Células madre mesenquimales humanas 3A6
3D	Tridimensional
A	Absorbancia
AA	Azul alcian
CA	Cartílago articular
<i>ACT</i>	<i>Autologous Chondrocyte Transplantation</i>
<i>ACAN</i>	<i>Aggrecan</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT	Azul de toluidina
<i>BTI</i>	<i>Biotechnology Institute</i>
<i>CDH5</i>	<i>Cadherin 5 type 2</i>
CMMh	Células madre mesenquimales humanas
CO	Condrocitos
CaCl ₂	Cloruro de calcio
COLI	Colágeno de tipo I
COLII	Colágeno de tipo II
DEPC	Dietilpirocarbonato
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
MEC	Matriz extracelular
<i>EDTA</i>	<i>Ethylendiaminetetraacetic Acid</i>
F1	Fracción 1
F2	Fracción 2
<i>FBS</i>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
g	Constante gravitatoria

<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
FC	Factores de crecimiento
HE	Hematoxilina-Eosina
<i>HGF</i>	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<i>HPRT</i>	<i>Hyponxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase</i>
<i>HPV16 E6/E7</i>	<i>Type 16 Human Papilloma Virus proteins E6/E7</i>
<i>hTERT</i>	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
<i>IGF-1</i>	<i>Insuline-like Growth Factor 1</i>
INIBIC	Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña
<i>ISCT</i>	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
<i>LG-DMEM</i>	<i>Low-Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
CMM	Células madre mesenquimales
MM	Tricómico de Masson Modificado
N.V.	<i>Naamloze Venootschap</i> , sociedad limitada
OA	<i>Osteoarthritis</i>
°C	Grados centígrados
<i>PAS</i>	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PBGD	Porfobilinógeno desaminasa
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>PDGF</i>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PRFC	Plasma rico en factores de crecimiento
PRP	Plasma rico en plaquetas
P/E	Penicilina/estreptomicina
<i>qRT-PCR</i>	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
<i>RPL13A</i>	<i>Ribosomal Protein L13A</i>
rpm	Revoluciones por minuto
S.A.	Sociedad Anónima
S.A.S.	<i>Société par Actions Simplifiée</i>

S.A.U.	Sociedad Anónima Unipersonal
S.L.	Sociedad Limitada
S.L.U.	Sociedad Limitada Unipersonal
SO	Safranina-O
SOX9	<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9</i>
<i>TBP</i>	<i>TATA Box Binding Protein</i>
IT	Ingeniería de Tejidos
<i>TGF-β1</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
<i>UPL</i>	<i>Universal Probe Library</i>
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<i>VWF</i>	<i>Von Willebrand Factor</i>

1. RESUMEN

1.1. Resumen

Objetivos: 1) Obtener distintas formulaciones combinando células CMMh-3A6 con biomateriales procedentes de PRP o PRFC y 2) estudiar el proceso de condrogénesis de las células CMMh-3A6 en dichas formulaciones.

Metodología: las células CMMh-3A6 fueron embebidas o sembradas en biomateriales de PRP o PRFC, que se mantuvieron en cultivo en medio condrogénico o en medio control durante 4, 7, 14 y 21 días. Las tinciones histoquímicas y la expresión relativa de los genes COLI, COLII, SOX9 y ACAN se utilizaron para seleccionar el formato (2D o 3D) y la dosis celular ($5 \cdot 10^4$, 10^5 y $5 \cdot 10^5$) más adecuados. Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para angiogenina, CD34 y CD31 y se analizó la expresión de los genes *VWF* y *CDH5* para valorar la diferenciación angiogénica. Finalmente se comparó la actividad celular y el grado de condrogénesis en el biomaterial seleccionado con respecto a un biomaterial cultivado en medio control, un control de condrogénesis 3D en una matriz inerte de agarosa y un control de condrogénesis en monocapa.

Resultados: la expresión de COLII, SOX9 y ACAN fue más intensa y sostenida en los biomateriales 3D, en los que las tinciones histoquímicas permitieron ver que las células producían activamente MEC cartilaginosa. La positividad de las tinciones para angiogenina y CD34 y la elevada expresión de *VWF* demostraron la existencia de angiogénesis en dichos biomateriales. La actividad celular y la condrogénesis fueron similares en los biomateriales de PRP y PRFC, y superiores a las detectadas en los biomateriales cultivados en medio control, los controles 3D de agarosa y

los controles en monocapa. La degradación por fibrinólisis fue muy intensa.

Conclusiones: los biomateriales 3D de PRP y PRFC son más adecuados que los biomateriales 2D para la diferenciación condrogénica de las células. En ellos se produce una importante fibrinólisis y los FC aportados por el plasma y las plaquetas parecen contribuir a la condrogénesis, aunque también parecen provocar una inducción angiogénica.

1.2. Resumen

Objetivos: 1) Obter distintas formulacións combinando células *CMMh-3A6* con biomateriais procedentes de *PRP* ou *PRFC* e 2) estudar o proceso de condroxénese das células *CMMh-3A6* en ditas formulacións.

Metodoloxía: as células *CMMh-3A6* foron embebidas ou sementadas en biomateriais de *PRP* ou *PRFC*, que se mantiveron en cultivo en medio condroxénico ou en medio control durante 4, 7, 14 e 21 días. As tinguiduras histoquímicas e a expresión relativa dos xenes *COLI*, *COLII*, *SOX9* e *ACAN* utilizáronse para seleccionar o formato (2D ou 3D) e a dose celular ($5 \cdot 10^4$, 10^5 y $5 \cdot 10^5$) máis axeitados. Realizáronse tinguiduras inmunohistoquímicas para anxioxenina, CD34 e CD31 e analizouse a expresión dos xenes *VWR* e *CDH5* para valorar a diferenciación anxioxénica. Finalmente comparouse a actividade celular e o grao de condroxénese no biomaterial seleccionado con respecto a un biomaterial cultivado en medio control, un control de condroxénese 3D nunha matriz inerte de agarosa e un control de condroxénese en monocapa.

Resultados: a expresión de *COLII*, *SOX9* e *ACAN* foi máis intensa e sostida nos biomateriais 3D, nos que as tinguiduras histoquímicas permitiron ver que as células producían activamente MEC cartilaxinosa. A positividade das tinguiduras para anxioxenina e CD34 e a elevada

expresión de *VWF* demostraron a existencia de anxioxénese en ditos biomateriais. A actividade celular e a condroxénese foron similares nos biomateriais de *PRP* e *PRFC*, e superiores ás detectadas nos biomateriais cultivados en medio control, nos controis 3D de agarosa e nos controis en monocapa. A degradación por fibrinólise foi moi intensa.

Conclusións: os biomateriais 3D de *PRP* e *PRFC* son máis adecuados que os biomateriais 2D para a diferenciación condroxénica das células. Neles prodúcese unha importante fibrinólise e os *FC* aportados polo plasma e as plaquetas parecen contribuír á condroxénese, aínda que tamén parecen provocar unha indución anxioxénica.

1.3. Abstract

Objectives: 1) To obtain different formulations combining *CMMh-3A6* cells with *PRP* or *PRFC*-derived biomaterials and 2) to study *CMMh-3A6* cells chondrogenesis in these formulations.

Methods: *CMMh-3A6* cells were embedded in or seeded on *PRP* or *PRFC* biomaterials, which were cultured for 4, 7, 14 and 21 days. Histochemical staining and *COLI*, *COLII*, *SOX9* and *ACAN* genes relative expressions were used to select the more suitable format (2D or 3D) and cell dose ($5 \cdot 10^4$, 10^5 y $5 \cdot 10^5$). Angiogenin, CD34 and CD31 immunohistochemical staining, as well as *VWF* and *CDH5* gene expression analysis were performed in order to assess angiogenic differentiation. Finally, cell activity and chondrogenesis extent in the selected biomaterials were compared with those of a control media-cultured biomaterial, a chondrogenic 3D, inert, agarose matrix and a chondrogenic monolayer control.

Results: 3D biomaterials showed a higher and more sustained *COLII*, *SOX9* and *ACAN* gene expression and their cells actively produced

cartilaginous *MEC*, as seen using histochemical staining. VWF high expression and angiogenin and CD34 positivities also suggest an incipient angiogenesis in these biomaterials. Cell activity and chondrogenesis were similar in both *PRP* and *PRFC* biomaterials, and better than those detected in control-media cultured biomaterials, agarose 3D controls and monolayer controls. Fibrinolysis was very pronounced.

Conclusions: 3D *PRP* and *PRFC* biomaterials are more suitable than 2D biomaterials for chondrogenic *CMMh-3A6* differentiation. They suffer an important fibrinolysis and their plasma and platelet-derived growth factors seem to contribute to chondrogenesis, as well as to induce angiogenesis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El cartílago articular: composición, estructura y función

El cartílago articular (CA), o cartílago hialino, es un tejido conjuntivo especializado que recubre las superficies de los componentes óseos que entran en contacto en una articulación sinovial o diartrodial. Está constituido por un número reducido de condrocitos (CO), el único tipo celular que se puede encontrar en este tejido y que se encarga de la síntesis y mantenimiento de una densa y abundante matriz extracelular (MEC)¹.

Los CO son células redondeadas que se encuentran en el interior de lagunas de la MEC y que suponen un 1-5% del volumen total del CA² (Figura 1). Aunque inicialmente se creía que los CO constituían unidades aisladas e independientes³, recientemente se ha descubierto que los CO vecinos se comunican entre sí a través de proyecciones citoplasmáticas⁴.

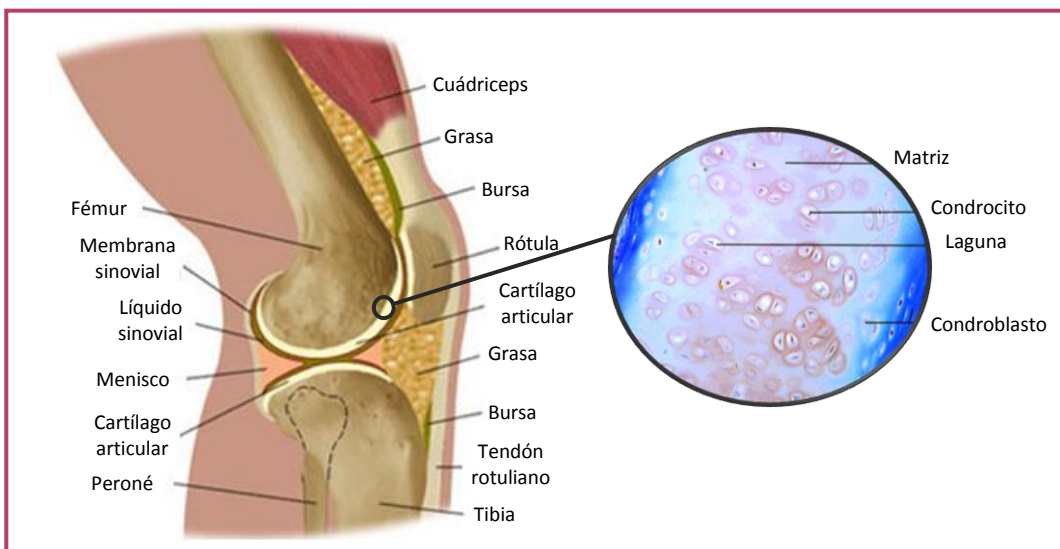


Figura 1. Estructura de una articulación diartrodial y detalle de la histología del cartílago articular hialino. Imágenes tomadas y modificadas de <http://giyabradiology.blogspot.com> y <http://kcfac.kilgore.edu>

La MEC del CA está constituida predominantemente por colágeno de tipo II (COLII), aunque también se puede encontrar colágeno de tipo V, VI, IX y XI. El otro componente principal de la MEC son los proteoglicanos,

unas macromoléculas de carga negativa que retienen grandes cantidades de agua en los poros de la matriz. De esta manera, el agua supone un 80-90% de la MEC cartilaginosa, mientras que el 90% del peso seco de la misma es COLII⁵.

El CA adulto es un tejido avascular, aneural y alinfático que puede presentar un grosor de hasta 7-8 mm, lo que supone que el aporte de nutrientes y la eliminación de desechos metabólicos se efectúan lentamente mediante un proceso de difusión. Este se ve facilitado por las cargas cíclicas que soporta la articulación durante su funcionamiento normal, que actúan a modo de mecanismo de bombeo^{1,5}.

La superficie lisa del cartílago permite reducir el coeficiente de fricción en la articulación, posibilitando el movimiento suave e indoloro de la misma. Además, sus propiedades biomecánicas de viscoelasticidad y resistencia a la compresión, debidas en gran medida al alto contenido en COLII y agua de la MEC, determinan su papel en la absorción y distribución homogénea de las fuerzas mecánicas a las que se ve sometida la articulación¹.

2.2. Lesiones del cartílago articular

Los daños en el CA, generalmente provocados por lesiones deportivas, traumas o el desgaste asociado al envejecimiento, suelen progresar hacia desórdenes articulares de mayor gravedad, como la artrosis (*osteoarthritis*, OA), la necrosis del tejido óseo subcondral o la artritis⁶. El motivo es la limitada capacidad de regeneración de este tejido, hecho conocido desde hace más de 250 años⁷ y debido a sus propiedades intrínsecas (carencia de vascularización e inervación). Otros factores son el reducido potencial de migración y división de los CO, así como las fuerzas repetitivas de deformación que derivan del uso continuo de la articulación⁵.

En general, las lesiones del CA pueden clasificarse en lesiones condrales (también conocidas como defectos focales) y lesiones osteocondrales (Figura 2). Las primeras afectan solo a la capa superficial del cartílago y generalmente no se reparan espontáneamente, mientras que las segundas atraviesan todo el grosor del cartílago y afectan también al hueso subcondral. Las lesiones osteocondrales provocan un sangrado articular que resulta en la reparación del daño mediante la formación de fibrocartílago, un tejido de cicatrización que carece de las propiedades bioquímicas y biomecánicas del cartílago hialino y que suele acabar degenerando debido al estrés mecánico^{2, 8}.

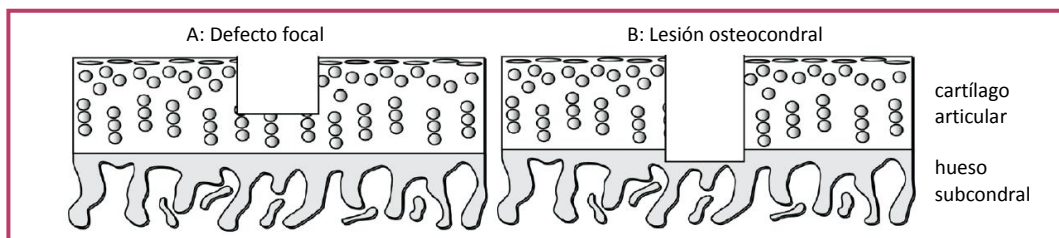


Figura 2. Esquema de un defecto focal (A) y una lesión osteocondral (B) (adaptada de Lubis et al, 2012²)

Un 63% de los pacientes sometidos a artroscopia de rodilla presentan defectos focales³. Aunque históricamente se ha considerado que estas lesiones no suponían un problema debido a su carácter asintomático, en los últimos años se ha visto que, a largo plazo, provocan cambios radiológicos y problemas clínicos⁸. La degeneración de la superficie articular puede progresar lentamente hasta originar OA; de hecho, un estudio prospectivo ha demostrado que los pacientes con lesiones del CA tienen un riesgo cinco veces mayor de desarrollar OA⁹.

2.3. La artrosis

La OA es una patología articular degenerativa en la que el CA sufre una degradación progresiva, generando dolor y una limitación creciente de la movilidad articular que ocasionan una pérdida sustancial de calidad de vida en los pacientes⁶. Su etiología no está clara, pero parece que la destrucción del cartílago se debe al desequilibrio del anabolismo y el

catabolismo de los CO a favor de la actividad catabólica de degradación de la MEC. Los cambios en el cartílago se ven acompañados de inflamación intraarticular (sinovitis, o inflamación de la membrana sinovial) y cambios en el hueso subcondral. En estadios avanzados de la enfermedad, la articulación se encuentra muy deformada y es altamente inestable, lo que finalmente lleva a optar por su reemplazo protésico en una intervención quirúrgica denominada artroplastia¹⁰.

Por lo tanto, actualmente se piensa que el CA debe ser reparado para evitar el desarrollo de patologías degenerativas como la OA⁸. Así mismo, las lesiones provocadas por la OA deben ser reparadas antes de forzar el reemplazo articular mediante artroplastia³.

2.4. Reparación de lesiones del cartílago articular: la necesidad de la Ingeniería de Tejidos

Hoy en día, la práctica clínica todavía no dispone de un tratamiento adecuado para reparar las lesiones del CA. El enfoque tradicional se basa en aliviar los síntomas mediante fármacos antiinflamatorios no esteroideos, suplementos alimenticios de condroitín sulfato y ácido hialurónico, régimen alimenticio combinado con ejercicio regular y/o rehabilitación². También se han implementado diversos procedimientos quirúrgicos para intentar restaurar la función articular, como la abrasión artroscópica (desbridamiento y remodelación de pequeños defectos focales), las técnicas de estimulación de la médula ósea (caracterizadas por la rotura del hueso subcondral para facilitar la reparación del cartílago con células madre de la médula ósea, imitando el proceso natural de reparación de las lesiones osteocondrales), la mosaicoplastia (trasplante de injertos osteocondrales procedentes de regiones articulares sanas) y el trasplante autólogo de CO (*autologous chondrocyte transplantation, ACT*, consistente en la obtención y expansión *in vitro* de CO autólogos del paciente para su posterior inyección en forma de suspensión en el defecto a rellenar, que se sella con una membrana autóloga de periósteo)^{8, 10}. No

obstante, todas estas opciones tienen algún inconveniente, su éxito no está asegurado y, además, su aplicación se limita a la reparación de pequeñas lesiones condrales, no estando recomendada para lesiones extensas ni para pacientes con OA¹⁰.

La Ingeniería de Tejidos (IT) es una disciplina emergente de la Medicina Regenerativa que constituye una alternativa prometedora en el ámbito de la reparación de las lesiones articulares¹¹. La IT intenta reconstruir los tejidos para recuperar su estructura y funcionalidad¹², y para ello utiliza biomateriales constituidos por células, soportes tridimensionales (3D) y factores de crecimiento (FC)^{13, 14}.

En la IT del cartílago, las células empleadas pueden ser CO o células madre mesenquimales (CMM). Se ha demostrado que las CMM presentan una serie de ventajas frente a los CO, como son su obtención y cultivo, por lo que actualmente se tiende a usar CMM para la regeneración del cartílago¹³.

En cuanto a los soportes 3D, la IT busca materiales biocompatibles, estructural y mecánicamente estables, que puedan encapsular las células a trasplantar y que permitan la integración con el tejido del receptor¹⁰. Estos materiales pueden ser polímeros artificiales (como ácido poliglicólico, ácido poliláctico o polietilén glicol) o polímeros naturales (como alginato, gelatina o fibrina)¹⁵. No obstante, la encapsulación de las CMM en soportes sintéticos tiene dos grandes limitaciones: las células tienden a sufrir anoikis (apoptosis debida a la carencia de interacciones con la MEC, que resultan fundamentales para la proliferación, movimiento y diferenciación celulares) y la tasa de degradación de los polímeros sintéticos es constante y no puede adaptarse a las necesidades celulares locales¹⁶. De esta manera, los soportes naturales se prefieren frente a los sintéticos para favorecer la viabilidad celular e intentar asegurar el éxito de la terapia de regeneración.

Finalmente, los FC que dirigen la diferenciación hacia el tipo celular de interés pueden administrarse durante el período de cultivo *in vitro* y/o ser incorporados en la estructura del biomaterial. Esta última opción es la más adecuada en IT ya que hace posible la liberación controlada de FC en el espacio y el tiempo, allí donde las células los necesitan y durante un período más o menos prolongado para mejorar la diferenciación celular¹⁷.

2.5. Las células madre mesenquimales y la línea CMMh-3A6

Las células madre son células no especializadas que se auto-renuevan mediante división celular y que, bajo ciertas condiciones, pueden diferenciarse en tipos celulares especializados. Las células madre pueden encontrarse en el embrión, el feto y el individuo adulto. No obstante, el uso de las células madre que se encuentran en los tejidos de los individuos adultos, como son las CMM, tiene dos grandes ventajas frente a las células madre de las fuentes prenatales: no plantean problemas éticos y además, al ser obtenidas de forma autóloga, se evita la inducción de una posible respuesta inmune (altamente probable en los trasplantes alogénos)¹⁰.

El uso de las CMM en IT para la regeneración del CA se basa en el hecho de que, durante la ontogenia, la morfogénesis de las extremidades se produce mediante la condensación de CMM y su diferenciación hacia tejido cartilaginoso. Se cree que la elevada celularidad del cartílago durante el período embrionario es necesaria para la deposición de las enormes cantidades de MEC que caracterizan a este tejido, que posteriormente ve reducida en gran medida su densidad celular para simplemente mantener la homeostasis tisular. La IT intenta recapitular este aspecto del desarrollo embrionario para la reparación de las lesiones del CA adulto^{3, 10}.

Las CMM (Figura 3) fueron aisladas inicialmente a partir de aspirados de médula ósea, pero desde entonces han podido obtenerse a partir de numerosos tejidos, incluyendo el periósteo, el músculo, la membrana sinovial y el tejido adiposo, entre otros¹⁸. Las distintas poblaciones de CMM no son homogéneas, sino que presentan una considerable variabilidad fenotípica. Este hecho, junto a la carencia de marcadores específicos que permitan identificar las CMM humanas, hace que las CMM se aíslen típicamente en base a tres criterios¹⁶:

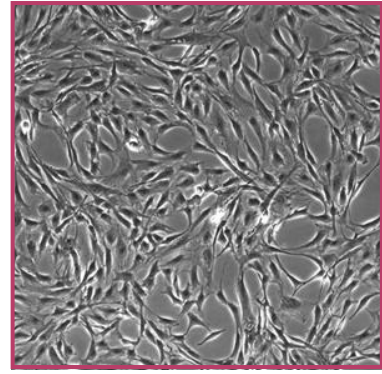


Figura 3. CMM humanas en cultivo. Imagen tomada y modificada de <http://jbx.sagepub.com>

- Capacidad de adherencia al plástico de los recipientes de cultivo.
- Expresión de ciertos marcadores de superficie definidos por la *International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. Concretamente, más de un 95% de la población celular debe expresar CD105, CD73 y CD90, mientras que más de un 98% de la población no debe expresar CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ni HLA-DR.
- Capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos (aunque todos ellos son linajes mesodérmicos, diversos estudios han demostrado que las CMM también son capaces de transdiferenciarse hacia linajes ectodérmicos, como neurocitos¹⁹, y linajes endodérmicos, como hepatocitos²⁰).

Por otra parte, diversos estudios han mostrado que las CMM procedentes de distintas fuentes tisulares, lejos de presentar características homogéneas, parecen diferir significativamente en cuanto a su funcionalidad. Concretamente, las CMM de médula ósea parecen aportar una mejor diferenciación condrogénica que las CMM de músculo o de grasa, pero estudios recientes parecen apuntar a que su potencial

condrogénico es inferior al de las CMM derivadas de la membrana sinovial¹⁸.

Una de las principales desventajas de las CMM es que su esperanza de vida al ser cultivadas *in vitro* suele ser finita, llegando un punto en el que las células dejan de dividirse y pierden su característica morfológica fibroblástica. Además, el potencial de diferenciación condrogénica va disminuyendo en los subcultivos sucesivos y las células tienden a sufrir diferenciación espontánea (aparición de marcadores específicos de linaje sin que haya habido una diferenciación dirigida), lo que limita su aplicabilidad clínica a largo plazo. Por lo tanto, la inmortalización de una línea de CMM humanas (CMMh) resulta útil para los modelos *in vitro*, dado que las líneas celulares mantienen sus características inalteradas²¹.

Para este estudio preliminar se seleccionó la línea mesenquimal humana CMMh-3A6, obtenida por un equipo de investigación taiwanés en el año 2010²². Esta línea celular fue obtenida mediante la transfección de CMM de médula ósea un donante humano con el vector retroviral del virus del papiloma humano de tipo 16 expresivo para las proteínas E6 y E7 (*type 16 human papilloma virus proteins E6/E7, HPV16 E6/E7*), que permite evitar la senescencia celular. Además, para evitar la pérdida de potencial de diferenciación, las células fueron transducidas a continuación con el gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (*human telomerase reverse transcriptase, hTERT*). Finalmente, la selección de clones derivados de una única célula permitió obtener la línea CMMh-3A6, expresiva para las proteínas E6, E7 y hTERT, y capaz de diferenciarse hacia los linajes trofoectodérmico, germinal, mesenquimal (osteogénico, adipogénico y condrogénico) y no mesenquimal (neurogénico)²². Desde entonces, esta línea celular se ha empleado con éxito en diversos estudios^{23, 24}.

2.6. El plasma rico en plaquetas y su uso en Ingeniería de Tejidos

La condrogénesis de las CMM se consiguió inicialmente en micromasas en cultivo²⁵, pero la limitación en cuanto al tamaño no permitía la aplicación clínica de las estructuras obtenidas. Posteriormente, el desarrollo de métodos de encapsulación de CMM en soportes de IT permitió conseguir una condrogénesis a mayor escala, y desde entonces los tipos y diseños de los soportes han experimentado un notable desarrollo²⁶.

La fibrina es una proteína formada por la polimerización del fibrinógeno plasmático durante el proceso natural de cicatrización de las heridas. El fibrinógeno tiene tres tipos de cadenas polipeptídicas (α , β y γ) que se unen a través de cinco puentes disulfuro en el dominio E, que se encuentra en el extremo amino-terminal. La polimerización del fibrinógeno es iniciada por la rotura proteolítica de la secuencia del fibrinopéptido A del extremo amino-terminal de las cadenas α , que es mediada por la trombina²⁷. Además de su papel en la coagulación sanguínea y la cicatrización de las heridas, el fibrinógeno y la fibrina participan en la respuesta inflamatoria, las interacciones célula-MEC y la neoplasia¹⁴.

La fibrina es un producto biocompatible y biodegradable que se aplica desde hace décadas en diversos ámbitos de la investigación básica y clínica^{28, 29, 30}. Inicialmente, la aplicación de la fibrina en IT implicaba su aislamiento químico a partir de una muestra de sangre, pero en 1997 se describió por primera vez su uso combinado con plaquetas para aprovechar el fibrinógeno y los FC contenidos en las mismas³¹. A partir de 1998, este tipo de producto pasó a conocerse como plasma rico en plaquetas (PRP)³². Desde entonces se han desarrollado numerosos sistemas destinados a la concentración de las plaquetas y la eliminación de eritrocitos y, en ocasiones, también leucocitos³³. Básicamente, se pueden emplear tres metodologías diferentes para obtener PRP:

centrifugación simple, centrifugación doble y filtración selectiva de la sangre. Además, el PRP obtenido puede activarse mediante disrupción mecánica con ciclos de congelación-descongelación, químicamente añadiendo iones de calcio (activación lenta) o una solución de trombina (activación rápida), o bien puede aplicarse directamente sin activar para que sean los propios factores tisulares los que inicien el proceso de coagulación. En función del método de activación, se conseguirá una liberación gradual o en masa de FC y citoquinas^{11, 34}.

Los distintos métodos de obtención y activación del PRP determinan la existencia de una gran variabilidad en cuanto al contenido en leucocitos (ausentes o presentes en concentraciones equivalentes o superiores a la de la sangre periférica), el recuento plaquetario (desde preparados sin plaquetas hasta concentrados con recuentos más de cinco veces superiores al de la sangre periférica, pasando por concentraciones moderadas con recuentos de dos a tres veces superiores al de la sangre periférica) y la concentración de los distintos FC. Estas variables influyen en la respuesta biológica del tejido y, por lo tanto, en la eficacia del tratamiento, lo que hace necesaria una estandarización de estos procedimientos³⁵.

El sistema *PRGF®-Endoret®* es una tecnología pionera desarrollada en España para la obtención de PRP (con un recuento plaquetario de dos a tres veces superior al de la sangre periférica) y plasma rico en factores de crecimiento (PRFC, con un recuento plaquetario similar o superior al de la sangre)^{36, 37}. Su aplicación en distintos formatos (Figura 4) ha sido validada en cirugía oral y maxilofacial, implantología oral, tratamiento de úlceras crónicas, regeneración facial y patologías y lesiones asociadas al tendón, ligamento, músculo, cartílago y hueso, entre otras³⁸.

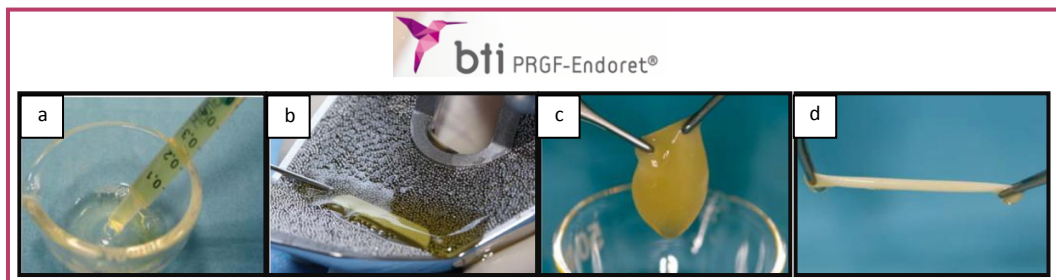


Figura 4. Formatos de PRP y PRGF de PRGF®-Endoret® (a. líquido filtrado para colirio, b. líquido inyectable para infiltraciones, c. coágulo de fibrina para soporte y relleno, d. fibrina para sellado). Imagen tomada y modificada de <https://www.utbproject.org/galeria/Libro%20Publi%20Trauma.pdf>

PRGF®-Endoret® imita los mecanismos naturales de curación de las heridas, acelerando y mejorando la regeneración tisular mediante la provisión de un soporte temporal y la liberación local de moléculas bioactivas³⁵. La regulación de la técnica de procesado y de los parámetros de centrifugación, entre otras variables, permite controlar la concentración final de plaquetas y, por lo tanto, la dosis de FC derivados de las mismas¹⁷. En concreto, el recuento plaquetario obtenido con este sistema es dos veces superior al de la sangre periférica, que ha sido relacionado con un beneficio biológico óptimo¹⁵. Además, la eliminación de los leucocitos evita los efectos proinflamatorios de sus proteasas e hidrolasas ácidas¹⁷, mejorando al mismo tiempo la estabilidad de la fibrina al evitar la liberación de elastasas³⁴. El uso del cloruro de calcio (CaCl_2) como activador de la coagulación promueve la formación de trombina nativa, imitando el proceso fisiológico de coagulación y permitiendo una liberación más sostenida de FC. Esto puede ser la clave para una adecuada regeneración del tejido y al mismo tiempo se evita el uso de trombina bovina, que ha sido asociado con coagulopatías en las que se desarrollan anticuerpos para los factores de coagulación V y XI¹⁷.

Los productos derivados del plasma sanguíneo contienen diversos FC de vital importancia para la reparación tisular, tanto plasmáticos como contenidos en los gránulos α de las plaquetas, como pueden ser el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1*), el factor de crecimiento transformante beta 1 (*Transforming Growth Factor*

Beta 1, *TGF-β1*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*, *PDGF*), el factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte Growth Factor*, *HGF*), el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, *VEGF*) y el factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*, *FGF*), entre otros. Estos mediadores son capaces de estimular la proliferación, migración y diferenciación celular y la angiogénesis³⁵, por lo que se está investigando la posibilidad de utilizar suplementos de PRP como sustitutos del suero bovino fetal en los medios de cultivo por motivos de bioseguridad (transmisión potencial de priones y virus)³⁹. Además, se ha demostrado que los productos obtenidos mediante la tecnología *PRGF®-Endoret®* tienen un efecto antiinflamatorio^{40, 41} y bacteriostático⁴², dos propiedades de gran interés para la Medicina Regenerativa.

Varios estudios han combinado la tecnología *PRGF®-Endoret®* con CMM de tejido adiposo⁴³ y de médula ósea^{44, 45} con resultados prometedores. A pesar de que ya se han realizado algunos ensayos preclínicos^{46, 47} y clínicos⁴⁸⁻⁵³ con *PRGF®-Endoret®* para testar su potencial terapéutico en la OA, todavía no existen evidencias experimentales de que este sistema pueda ayudar a la reparación de los defectos focales o de la degradación producida por la OA. Este estudio preliminar propone explorar el potencial condrogénico de biomateriales de PRP y PRFC combinados con células de la línea CMMh-3A6.

3. OBJETIVOS

1. Formular distintos biomateriales de fibrina y células de la línea CMMh-3A6 a partir de plasma rico en plaquetas y plasma rico en factores de crecimiento obtenidos mediante el sistema *PRGR®-Endorel®*.
2. Valorar el potencial condrogénico de las distintas formulaciones mediante el análisis de:
 - a) Viabilidad y proliferación de las células en los distintos biomateriales utilizando el reactivo *AlamarBlue®*.
 - b) Capacidad de diferenciación de las células al linaje condrogénico en las distintas formulaciones empleando métodos histológicos y moleculares.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

Para los cultivos de células y biomateriales se utilizó el medio de cultivo *Low-Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (LG-DMEM)* (*Life TechnologiesTM*, *ThermoFisher Scientific*, Madrid, España) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum, FBS*) (*Labclinics*, Barcelona, España), un 1% de penicilina y estreptomicina (P/E) (*Gibco®*, *Life TechnologiesTM*) y un 1% *GlutaMAXTM* (*Life TechnologiesTM*), y también el medio de diferenciación condrogénica *hMSC Chondrogenic SingleQuots®* (*Lonza Ibérica S.A.U.*, Barcelona, España). En el proceso de cultivo se utilizó también suero fisiológico (*Fresenius Kabi España S.A.U.*, Barcelona, España), tripsina-ácido etilendiaminetetraacético (*ethylendiaminetetraacetic acid, EDTA*), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)* (ambos de *Sigma-Aldrich Química S.L.*, Madrid, España) al 5% en *FBS* y al 1% en P/E, frascos de cultivo de 162 cm² (*Corning Optical Communications S.L.U.*, Madrid, España), una cámara de *Neubauer (Marienfeld Superior*, Lauda-Königshofen, Alemania) y un microscopio invertido *Nikon Eclipse TS100* (*Finicon S.A.*, Barcelona, España).

Para la obtención de sangre de oveja y la síntesis de los biomateriales de plasma se utilizó el sistema de aspiración de plasma *BTI Plasma Transfer Device (PTD)*, el analizador automático para hematología *BC-5300Vet* (*Mindray Medical España S.L.*, Madrid, España), la centrífuga *BTI System IV*, palomillas de extracción segura de *Vacurette*, la solución de *CaCl₂ PRGF® Activator*, jeringas estériles *BD Micro-Fine* (todo ello de *B.T.I. Biotechnology Institute S.L.*, Álava, España), placas de cultivo de 28 cm² (*NunclonTM Delta*, *ThermoFisher ScientificTM*), sacabocados de dermatología de 6 cm de diámetro (*Kai Europe GmbH*, Solingen, Alemania), placas de cultivo de 48 y 96 pocillos (*Corning Optical Communications S.L.U.*) y agarosa (*Sigma-Aldrich Química S.L.*).

Para las pruebas de viabilidad celular se empleó el reactivo *alamarBlue*® (*Invitrogen S.A.*, Barcelona, España) y un espectrofotómetro para placas *NanoQuant Infinite*® *M200* (*Tecan Ibérica Instrumentación S.L.*, Barcelona, España), mientras que para los análisis histológicos se necesitó formaldehído, xileno (ambos de *Panreac Química S.A.U.*, Barcelona, España), parafina (*Merck*, Madrid, España) y un microtomo de rotación *Leica RM 2155* (*Leica Microsystems S.L.U.*, Barcelona, España).

Por último, para los análisis de biología molecular se usó tampón fosfato salino estéril (*phosphate buffered saline, PBS*) (*MP Biomedicals S.A.S.*, Illkirch-Graffenstaden, Francia), tubos *Protein LoBind* de 2.0 mL, tubos *DNA LoBind* de 1.5 mL (ambos de *Eppendorf Ibérica*, Madrid, España), *TRizol*® (*Life Technologies*™), un homogenizador *IKA T10 basic Ultra-Turrax*® (*IKA*®-*Werke GmbH & Co. KG*, Staufen, Alemania), cloroformo, glicógeno, isopropanol (todos ellos de *Sigma-Aldrich Química S.L.*), un espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (*ThermoFisher Scientific*, Madrid, España), un bioanalizador *Agilent 2100* (*Agilent Technologies Spain S.L.*, Madrid, España), *DNasa I*, tampón con cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (ambos de *Fermentas Inc.*, *ThermoFisher Scientific*), *SuperScript*® *VILO*™ *cDNA Synthesis Kit and Master Mix* (*Life Technologies*™), sondas *TaqMan*® *Universal ProbeLibrary (UPL)*, *LightCycler*® *480 Probes Master* y un termociclador *LightCycler*® *480 Instrument II* (todo ello de *Roche Diagnostics*, Barcelona, España). La síntesis de los cebadores fue solicitada a la casa comercial *R. Costoya S.L.*, A Coruña, España.

4.2. Cultivo en monocapa de células de la línea CMMh-3A6

La línea celular CMMh-3A6 fue cedida por el doctor Chih-Chien Tsai (*Stem Cell Laboratory, Department of Medical Research & Education and Orthopaedics & Traumatology, Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan*). Las células se expandieron en frascos de 162 cm² en LG-

DMEM, en un incubador con condiciones estándar de cultivo (37°C y atmósfera húmeda con un 5% de CO₂).

El cultivo se mantuvo hasta el inicio de los experimentos y se realizaron subcultivos siempre que fue necesario (1-2 veces por semana), no permitiendo en ningún caso que las células alcanzasen un 100% de confluencia. En ese momento, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con suero fisiológico y se incubaron con tripsina-*EDTA* a 37°C durante 2-3 min. Se comprobó que las células no continuaban adheridas al frasco de cultivo en un microscopio invertido, se inactivó la tripsina con *DMEM* al 5% en *FBS*, se recogió la suspensión celular y se centrifugó 10 min a 1500 revoluciones por minuto (rpm). El precipitado se resuspendió en *LG-DMEM* y se sembró en uno o varios frascos de cultivo a razón de $6 \cdot 10^3$ células/cm² para su mantenimiento.

4.3. Obtención de plasma de oveja

4.3.1. Hematología de la sangre de oveja

Las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de ovejas de raza Churra de entre uno y tres años de edad mediante venopunción carotídea y se recogieron con el sistema de aspiración de plasma *PTD* en tubos de extracción *BTI* estériles de 9 mL con una solución anticoagulante de citrato al 3,8%. Se realizó un recuento de leucocitos y plaquetas en un contador hematológico para conocer las condiciones de partida del experimento.

4.3.2. Separación de las fases

Los tubos de sangre de oveja fueron centrifugados en la hora siguiente a su obtención. En condiciones de esterilidad, se recogieron por separado las fracciones F1 (PRFC) y F2 (PRP) (Figura 5), evitando remover la serie blanca y la serie roja y transfiriendo las fracciones de interés a dos tubos estériles de fraccionamiento debidamente etiquetados. Se tomó una

muestra de cada fracción para realizar un recuento de leucocitos y plaquetas en un contador hematológico y así valorar la eficacia de la centrifugación y el enriquecimiento en plaquetas conseguido.

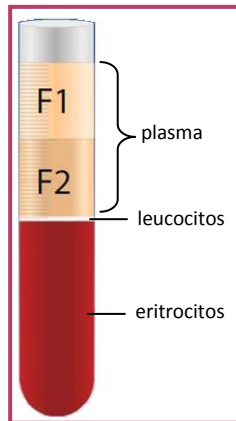


Figura 5. Esquema de las fracciones obtenidas por centrifugación. Imagen modificada de http://bti-biotechnologyinstitute.com/web/uploads/ck/files/MA091_eu_kit_prgf_endoret_trauma_Ed3Rev1.pdf

4.4. Preparación de los biomateriales de plasma combinado con células

Una vez obtenidas las fracciones de plasma F1 y F2, se les retiró el medio de cultivo a las células CMMh-3A6 y se lavaron con suero fisiológico para levantar la monocapa celular con tripsina-EDTA tal y como previamente se ha explicado. El precipitado celular resultante de la centrifugación se resuspendió en un volumen conocido de *LG-DMEM* y se estimó el número total de células con una cámara de *Neubauer*. Se recogieron 10^6 células para su uso como condición basal en los experimentos de expresión génica.

Inicialmente se sintetizaron dos tipos de biomateriales distintos, unos consistentes en membranas bidimensionales (2D) de fibrina con células sembradas sobre su superficie y otros en coágulos 3D con células embebidas. En el primer caso se sembraron 10^5 células sobre cada membrana, mientras que en el segundo se testaron tres dosis celulares diferentes para determinar la más adecuada: $5 \cdot 10^4$, 10^5 y $5 \cdot 10^5$ células.

Los biomateriales 2D se obtuvieron induciendo la coagulación de 4 mL de plasma F1 o F2 en placas de 28 cm² con CaCl₂. La gran membrana obtenida fue despegada de la placa con ayuda de un bisturí desechable (Figura 6) y se dividió en pequeñas membranas de 6 cm de diámetro empleando un sacabocados de dermatología.

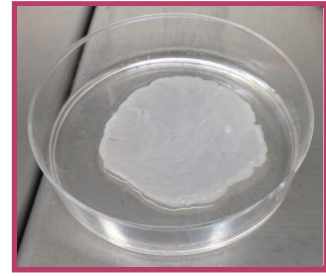


Figura 6. Membrana de plasma. Imagen propia

Estas membranas fueron introducidas individualmente en los pocillos de una placa de 48 pocillos y sobre cada una de ellas se sembraron 10⁵ células. Tras esperar el tiempo necesario para que se produjese la adhesión celular a la superficie del biomaterial, se añadieron 250 µL del medio de cultivo requerido para cada condición.

Los biomateriales 3D se formaron en placas de 48 pocillos a partir de tres preparaciones distintas, que se correspondían con las tres densidades celulares mencionadas. Estas preparaciones se obtuvieron mezclando 2.5 mL de plasma F1 o F2 con el volumen de suspensión celular requerido para aportar el número total de células de cada condición. En primer lugar se activó el plasma con CaCl₂, para lo que se añadieron 50 µL de *PRGF® Activator* por cada mililitro de plasma con ayuda de una jeringa estéril *BD Micro-Fine*, de manera que la concentración final de CaCl₂ fue del 5%. A continuación se añadió la suspensión celular, se mezcló bien el conjunto y se repartió en los pocillos a razón de 250 µL por pocillo. Una vez formados los biomateriales, se añadieron 250 µL del medio de cultivo requerido para cada condición.

4.5. Cultivo de los biomateriales y estudio de diferenciación a linaje condrogénico

Los biomateriales 3D y 2D fueron cultivados en medio de diferenciación condrogénica o en medio *LG-DMEM*. Se incluyeron dos réplicas de cada biomaterial o control para cada condición de cultivo, de

manera que el experimento para cada tiempo de cultivo respondía al esquema representado en la Figura 7.

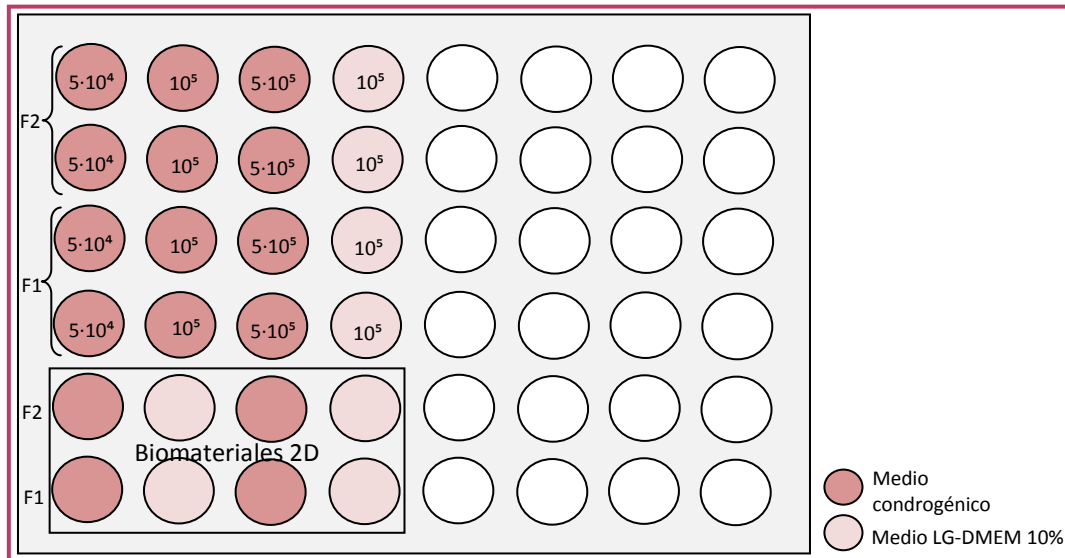


Figura 7. Esquema de los biomateriales y controles incluidos en el estudio inicial

El cultivo se mantuvo por un período total de veintiún días, durante los que se renovó el medio de cultivo cada dos días. A los 4, 7, 14 y 21 días se recogieron biomateriales para realizar análisis histológicos y de expresión génica con los que valorar la diferenciación condrogénica experimentada bajo cada condición.

En base a las observaciones derivadas de este primer experimento, se seleccionó la dosis celular media (10^5 células) para formar los biomateriales 3D de plasma F1 y F2 de un segundo experimento, que se cultivaron igualmente en medio condrogénico o en medio *LG-DMEM*. No obstante, debido a un problema técnico relacionado con la limitación en el número de células CMMh-3A6 disponibles, fue necesario escalar el experimento a una placa de 96 pocillos. La reducción a la mitad de la superficie a sembrar implicó la reducción a la mitad del tamaño del biomaterial y, consecuentemente, de la dosis celular, por lo que cada biomaterial contuvo $5 \cdot 10^4$ células. En este segundo experimento se utilizaron también controles 3D de agarosa con $5 \cdot 10^4$ células CMMh-3A6

embebidas y controles 2D de $5 \cdot 10^4$ células CMMh-3A6 en monocapa para el estudio de la condrogénesis; ambos fueron cultivados en medio de diferenciación condrogénica. Se recogieron 10^6 células para su uso como condición basal en los análisis de expresión génica, al igual que en el primer experimento.

El cultivo se mantuvo nuevamente por un período total de veintidós días y a los 7, 14 y 21 días se recogieron biomateriales para realizar análisis histológicos y de expresión génica.

4.6. Determinación de la actividad celular con *AlamarBlue*®

A los 7, 14 y 21 días de cultivo se cuantificó el metabolismo celular en los biomateriales del segundo experimento. Para ello se determinó la actividad respiratoria mediante un test fluorimétrico basado en el reactivo *AlamarBlue*®. En condiciones de oscuridad, se añadió un 10% de *AlamarBlue*® al medio de cada biomaterial y control en cada condición de cultivo, así como a cada tipo de medio de cultivo sin biomaterial, y se realizó una incubación de 3 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se recogieron dos réplicas de sobrenadante de cada condición en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm y 600 nm en un espectrofotómetro para placas. Los controles utilizados para la normalización de los resultados fueron dos réplicas de cada medio de cultivo sin *AlamarBlue*® y de agua destilada.

4.7. Histología de los biomateriales

El análisis histológico de los biomateriales se realizó en los Servicios Centrales de Histomorfología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), siguiendo los protocolos establecidos.

4.7.1. *Fijación, deshidratación e inclusión en parafina*

Los biomateriales cultivados durante 4, 7, 14 y 21 días fueron fijados en formaldehído al 3.7-4% (Figura 8) durante 20-24 horas y deshidratados en alcoholes de graduación creciente (70°, 96° y 100°). A continuación, las muestras fueron impregnadas en xileno e incluidas en parafina para la posterior formación del bloque de parafina y la realización de cortes de 4 μm con el microtomo de rotación a los que aplicar las tinciones que se detallan en el siguiente apartado.

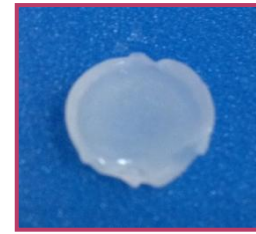


Figura 8. Biomaterial fijado en formaldehído. Imagen propia

4.7.2. *Tinciones*

Para teñir los cortes seriados de los biomateriales, estos fueron desparafinados mediante calor en una estufa a 60°C y posterior inmersión en xileno. Luego se rehidrataron con alcoholes de graduación decreciente (100°, 96° y 70°), agua destilada y agua corriente para proceder a su tinción.

4.7.2.1. *Hematoxilina-Eosina*

La hematoxilina de Harris es un colorante básico que tiñe los núcleos celulares de color azul/negro, mientras que la eosina es un colorante ácido que tiñe las estructuras citoplasmáticas de un tono rosado. La tinción hematoxilina-eosina (HE) aporta un buen contraste que permite valorar de forma general la estructura del biomaterial y la morfología de las células que forman parte del mismo.

4.7.2.2. *Tricrómico de Masson modificado*

La hematoxilina férrica de Weigert tiñe los núcleos de color azul/negro, los colorantes ácidos (alumbre férrico, ácido pícrico y fucsina Ponceau) tiñen el citoplasma de color rosado y el azul de anilina tiñe las

fibras colágenas de color azul. El tricrómico de Masson (MM) se utiliza para detectar fibras de colágeno, además de valorar de forma general la estructura del biomaterial y la morfología de las células.

4.7.2.3. Azul alcian-ácido peryódico de Schiff

El azul alcian (AA) permite identificar mucopolisacáridos ácidos (color azul) y la tinción de ácido peryódico de Schiff (*periodic acid-Schiff, PAS*) colorea los proteoglicanos de un tono rojo fucsia. La hematoxilina de Harris se emplea como tinción de contraste para colorear los núcleos de celulares de un tono azul/negro.

4.7.2.4. Azul de toluidina

El azul de toluidina (AT) es un colorante básico metacromático que tiñe los proteoglicanos de la MEC cartilaginosa de color rojizo-violeta.

4.7.2.5. Safranina-O

La safranina-O (SO) es un colorante básico que permite detectar proteoglicanos, los cuales presentan una tinción de color rojo anaranjado.

4.7.2.6. Tinciones inmunohistoquímicas indirectas

Dadas las observaciones derivadas del primer experimento realizado, se decidió valorar la diferenciación angiogénica experimentada por los biomateriales mediante tinciones inmunohistoquímicas indirectas para los marcadores específicos angiogenina, CD34 y CD31.

4.8. Análisis de expresión génica en los biomateriales y controles

4.8.1. Aislamiento del ARN

A los 4, 7, 14 y 21 días de cultivo se les retiró el medio de cultivo a los biomateriales y se lavaron con un volumen equivalente de *PBS*. Cada biomaterial se despegó con suavidad de los bordes del pocillo de cultivo

con ayuda de unas pinzas (Figura 9) y se introdujo en un tubo *Protein LoBind* de 2.0 mL. Se añadió inmediatamente 1 mL de *TRIzol*® y se conservó en hielo hasta proseguir el procesado para evitar la degradación del ARN. También se recogieron individualmente los exudados resultantes de la retracción de los biomateriales 3D, provocada por su manipulación, y se congelaron a -80°C para análisis posteriores.

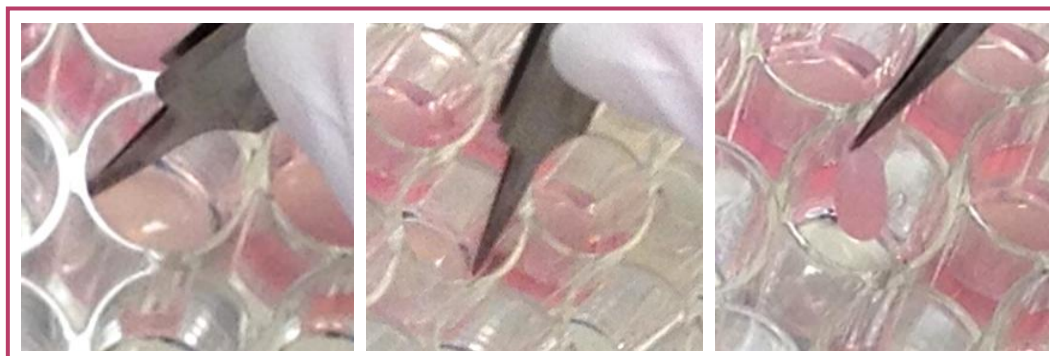


Figura 9. Recogida de los biomateriales 3D. Imágenes propias

Los biomateriales fueron digeridos mecánicamente con el homogenizador *IKA T10 basic Ultra-Turrax*® hasta su completa disgregación y manteniéndolos siempre en hielo. A continuación, los homogenizados se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se les añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitaron a mano vigorosamente. Tras un reposo de 3 min a temperatura ambiente, se centrifugaron 15 min a 12000 x g y a 4°C y se recuperó la fase acuosa superior, que se transfirió a un tubo *DNA LoBind* de 1.5 mL. Posteriormente, a cada tubo se le añadió 1 μ L de glicógeno y 500 μ L de isopropanol, se mezcló bien y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente antes de centrifugar 10 min a 12000 x g y a 4°C. Se decantaron los sobrenadantes y se lavaron los precipitados de ARN con la misma cantidad de etanol al 75% que volumen de *TRIzol*® usado en la extracción. Se centrifugaron 5 min a 7500 x g y a 4°C, se decantaron los sobrenadantes y se realizó un nuevo lavado con etanol al 100% de la misma forma. Tras decantar nuevamente los sobrenadantes, los precipitados se dejaron secar al aire completamente y se resuspendieron en 10 μ L de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Para asegurar la total resuspensión, los

tubos se incubaron a 60°C durante 10 min. Finalmente, se introdujeron en hielo y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Por otra parte, los controles 2D del segundo experimento fueron procesados de manera similar. A los 7, 14 y 21 días de cultivo se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con un volumen equivalente de *PBS*. Se añadió 1 mL de *TRIZO*® para lisar las células y extraer el ARN total, y el resto del procesado se realizó como se acaba de describir para los biomateriales.

4.8.2. Medidas de cantidad y calidad del ARN

La cantidad y calidad del ARN obtenido en cada caso fueron determinadas mediante el espectrofotómetro *NanoDrop* 1000 y el bioanalizador *Agilent* 2100. Con *NanoDrop* 1000 se midieron las absorbancias (A) a 280 nm, 260 nm y 230 nm para valorar la concentración de ARN (A_{260}), la contaminación con proteínas (razón A_{260}/A_{280}) y la contaminación con sales y/o alcoholes (razón A_{260}/A_{230}). Con el bioanalizador se valoró la integridad del ARN obtenido y se confirmó su concentración, en base a la definición de las bandas electroforéticas correspondientes a las subunidades ribosomales 5S, 18S y 28S, y a la intensidad de la fluorescencia emitida, respectivamente.

4.8.3. Síntesis de ADN complementario

Una vez obtenido y analizado el ARN total, se realizó la retrotranscripción del ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc). Para ello, 500 ng de ARN total fueron tratados previamente con 0.5 unidades (U) de *DNasa I* y 0.5 µL de tampón con $MgCl_2$ en un volumen final de 8 µL, que se alcanzó añadiendo el volumen necesario de agua tratada con DEPC. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C y luego se inactivó el enzima añadiendo 0.5 µL de una solución de *EDTA*, incubando el conjunto a 65°C durante 10 min.

Finalizado el tratamiento con *DNasa I*, se añadieron 1.5 µL de *SuperScript® VILO™* a cada tubo para realizar la transcripción reversa del ARNm. La mezcla se incubó 10 min a 25°C y 90 min a 42°C, forzando la terminación con una incubación de 5 min a 85°C. Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de realización de los análisis de expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (*quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR*).

4.8.4. Experimentos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

El análisis de expresión génica mediante *qRT-PCR* se realizó cargando el ADNc en una placa de 96 pocillos junto con los cebadores y las sondas *TaqMan®* específicos que se muestran en la Tabla I. Cada reacción contenía 2 µL de ADNc, 5 µL de *LightCycler® 480 Probes Master*, 0.35 µL de cebadores *forward* y *reverse* y sonda en una concentración de 200 nM. En el termociclador se utilizó un programa de amplificación consistente en un ciclo de preincubación de 10 min a 95°C; hasta cincuenta ciclos de amplificación de 10 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1 s a 72°C; y un ciclo de atemperación de 20 s a 40°C.

Tabla I. Cebadores y sondas empleados para la amplificación de los genes de referencia y los genes específicos de condrogénesis y angiogénesis

Nombre	Cebador <i>forward</i> (5'-3')	Cebador <i>reverse</i> (3'-5')	Sonda
HPRT	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	CAAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTG	UPL 022
RPL13A	CAAGCGGATGAACACCAAC	TGTGGGGCAGCATACCTC	UPL 028
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	UPL 060
TBP	GCCCATAGTGATCTTTGCAGT	CGCTGGAACCTCGTCTCACTA	UPL 067
β-Act	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	GGATGCCACAGGACTCCA	UPL 011
PBGD	AGCTATGAAGGATGGGCAAC	TTGTATGCTATCTGAGCCGTCTA	UPL 025
COLII	TGGTGCTAATGGCGAGAAG	CCCAGTCTCTCCACGTTAC	UPL 004
COLI	CTGGCCCCATTGGTAATGT	ACCAGGGAAACCAGTAGCAC	UPL 001
ACAN	CGGTCTACCTCTACCCTAACCA	GAGAAGGAACCGCTGAAATG	UPL 038
SOX9	GTACCCGCACTTGACAAAC	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC	UPL 061
VWF	GAAATGTGTCAGGAGCGATG	ATCCAGGAGCTGTCCCTCA	UPL 046
CDH5	GCAGTCCAACGGAACAGAA	CATGAGCCTCTGCATCTTCC	UPL 030

4.8.4.1. Estabilidad de expresión de genes de referencia

En primer lugar se realizó un análisis de estabilidad de expresión de una batería de 6 genes de referencia en la línea celular CMMh-3A6. Los genes valorados fueron hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, *HPRT*), proteína ribosomal L13A (*ribosomal protein L13A*, *RPL13A*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*), proteína de unión a la caja TATA (*TATA box binding protein*, *TBP*), beta-actina (β -Act) y porfobilinógeno desaminasa (PBGD). Para determinar los genes de expresiones más estables se utilizó el algoritmo *geNORM*⁵⁴.

4.8.4.2. Análisis de expresión génica de la condrogénesis

Para valorar la diferenciación condrogénica de las células CMMh-3A6 en los biomateriales de fibrina se analizó el grado de expresión de tres genes específicos de condrogénesis: COLII, agregcano (*aggrecan*, *ACAN*) y región determinante del sexo del cromosoma Y-caja 9 [*SRY (sex determining region Y)-box 9*, *SOX9*]. También se analizó la expresión de colágeno tipo I (COLI), un marcador que indica la formación de fibrocartílago debido a una condrogénesis inadecuada. Los niveles de expresión de dichos genes se normalizaron con respecto a los genes de referencia previamente seleccionados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁵⁵ utilizando el programa *qBase+* (*Biogazelle N.V.*, Gent, Bélgica).

4.8.4.3. Análisis de expresión génica de la angiogénesis

Por último, para valorar la importancia de la diferenciación angiogénica de las células CMMh-3A6 se examinaron los niveles de expresión de dos genes específicos de angiogénesis: factor de von Willebrand (*von Willebrand factor*, *VWF*) y cadherina 5 de tipo 2 (*cadherin 5 type 2*, *CDH5*).

5. RESULTADOS

5.1. Enriquecimiento en plaquetas tras la separación de las fases

Los contenidos en plaquetas y leucocitos de la sangre fresca de oveja y de las fracciones F1 y F2 obtenidas tras la centrifugación se presentan en la Tabla II.

Tabla II. Recuento de plaquetas y leucocitos antes y después de la centrifugación

Muestra	Plaquetas ($10^9/L$)	Leucocitos ($10^9/L$)
Sangre fresca	395 ± 14	8 ± 3
F1	305	0.01
F2	639	0.02

Como se puede apreciar, la fracción de PRFC (F1) tenía un recuento de plaquetas similar al de la sangre fresca, mientras que la fracción de PRP (F2) se había enriquecido en plaquetas hasta casi duplicar la cantidad inicial. Así mismo, el contenido en leucocitos se redujo drásticamente, como se puede ver en la Figura 10.

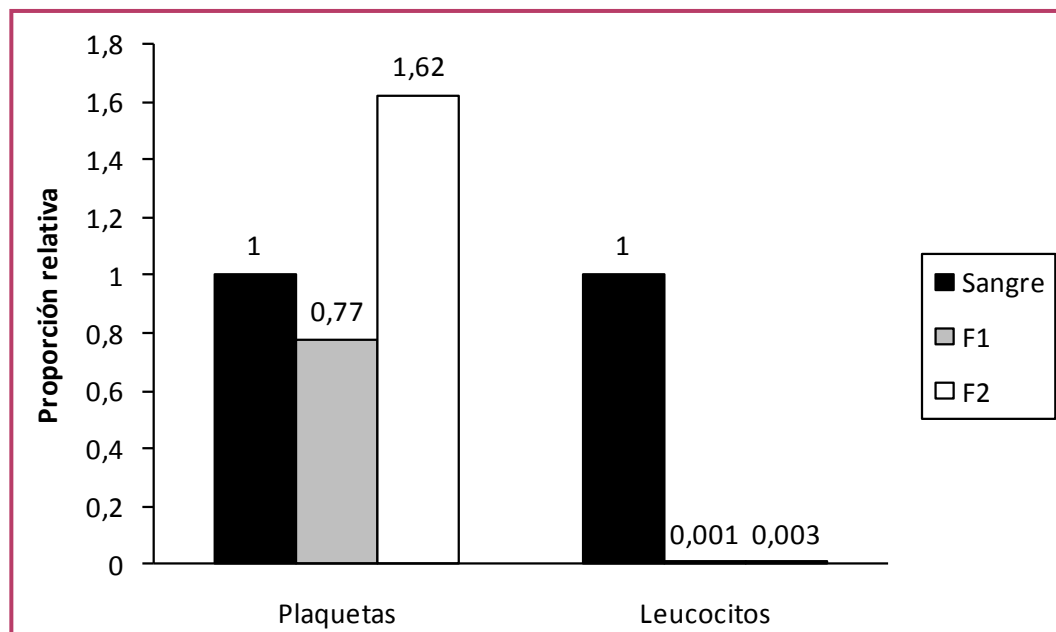


Figura 10. Proporciones de plaquetas y leucocitos con respecto a la sangre fresca

5.2. Cultivo y análisis de actividad celular de los biomateriales y controles

Los biomateriales y controles se mantuvieron en cultivo durante un período total de veintiún días. Se observó que la estructura de los biomateriales 3D cultivados en medio condrogénico, tanto si habían sido sintetizados con plasma F1 como con plasma F2, empezaba a volverse inestable a partir de los siete días de cultivo, habiendo sufrido una fibrinólisis patente en el día catorce de cultivo. Esta degradación fue todavía más evidente a los veintiún días de cultivo, pero no se produjo en los biomateriales 3D cultivados en medio *LG-DMEM* ni en ninguno de los biomateriales 2D (resultados no mostrados).

En los controles 3D de agarosa se observó una densidad celular reducida con respecto a los biomateriales, y numerosas células de morfología redondeada y apariencia ligeramente refringente (flechas). Por otra parte, en los controles 2D se fue formando un gran esferoide con el transcurso del período de cultivo (Figura 11).

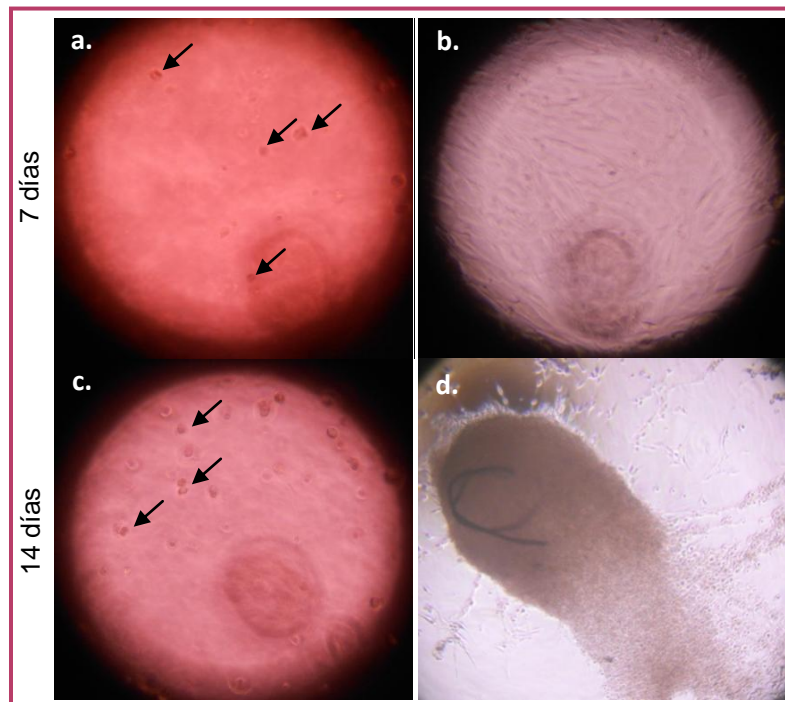


Figura 11. Controles de condrogénesis a los 7 y 14 días de cultivo (a, c. control 3D; b, d. control 2D).
Imágenes propias

El test de actividad celular se realizó en un segundo experimento consistente en biomateriales 3D de F1 y F2 cultivados en medio condrogénico o en *LG-DMEM* (controles F1 y F2), controles 3D de agarosa y controles de condrogénesis en 2D. Los resultados, expresados como porcentaje de *AlamarBlue*® reducido, se muestran en la Figura 12.

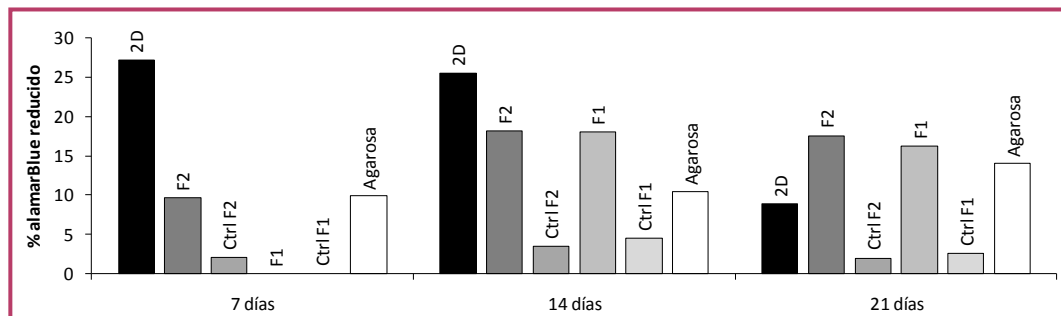


Figura 12. Porcentaje de *AlamarBlue*® reducido a los 7, 14 y 21 días de cultivo

Debido a un fallo técnico, no se dispone de las mediciones de actividad celular en los biomateriales F1 a los 7 días de cultivo. El metabolismo celular fue más intenso en los controles de condrogénesis en 2D que en cualquiera de los biomateriales 3D, excepto a los 21 días de cultivo, cuando se detectó una reducción a la mitad en el mismo. Además, la actividad metabólica fue notablemente mayor en los biomateriales en condrogénesis que en los biomateriales en *LG-DMEM* durante todo el experimento. No se detectaron grandes diferencias en el metabolismo celular entre los soportes 3D bioactivos (F1 y F2) y el soporte inerte (agarosa) en condrogénesis, salvo a los 14 días de cultivo, cuando la actividad fue mayor en los biomateriales de plasma. La actividad metabólica en F1 y F2 aumentó entre los 7 y los 14 días, manteniéndose más o menos estable a los 21 días de cultivo.

5.3. Análisis histológico de los biomateriales cultivados

5.3.1. Valoración general de la estructura y la morfología celular

En el experimento inicial, en los biomateriales 3D teñidos con HE se observó una matriz fibrilar con células homogéneamente distribuidas.

Para un mismo tiempo de cultivo, la densidad celular aumentaba de acuerdo con la dosis celular sembrada inicialmente ($5 \cdot 10^4$, 10^5 y $5 \cdot 10^5$ células) (resultados no mostrados). Por limitación de espacio se muestran, a modo representativo, las imágenes correspondientes a la dosis celular intermedia (10^5).

A los 4 días de cultivo (Figura 13), los biomateriales F2 presentaban unas formaciones celulares redondeadas (Figura 13a y b) que estaban ausentes en los biomateriales F1 (Figura 13c y d). Estas formaciones aparecían tanto en los biomateriales F2 cultivados en medio condrogénico (Figura 13a) como en los biomateriales F2 cultivados en medio control (Figura 13b).

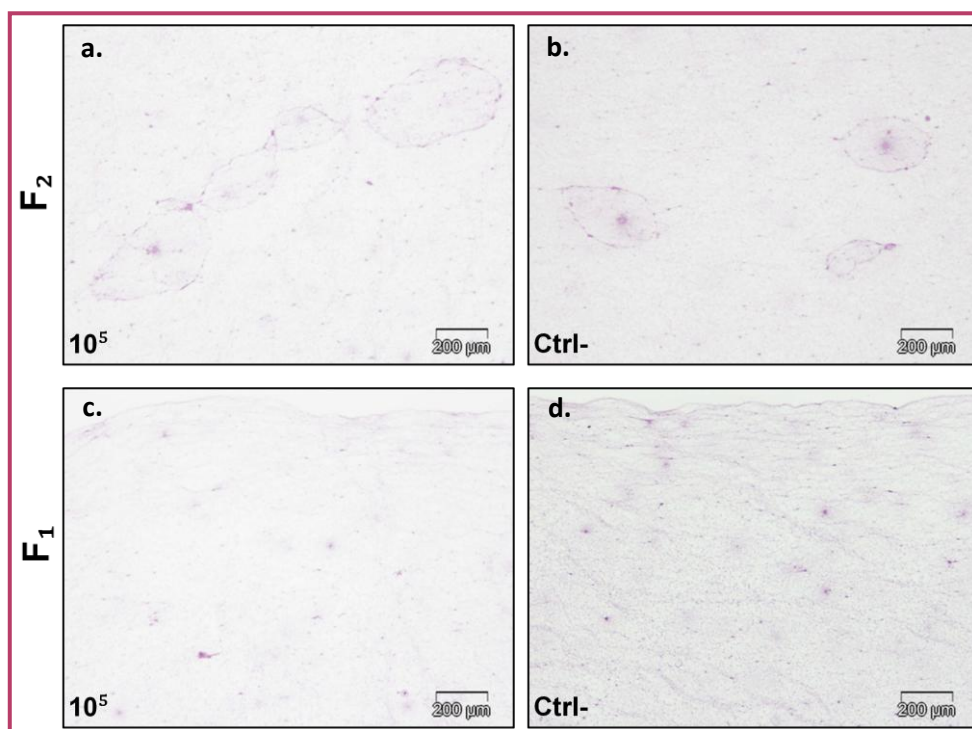


Figura 13. Tinción HE de los biomateriales 3D a los 4 días de cultivo (a. 10^5 F2, b.Ctrl- F2, c. 10^5 F1, d.Ctrl- F1)

Las formaciones celulares se observaron también a los 7, 14 y 21 días de cultivo. No obstante, a los 14 días estas estructuras se detectaron también en los biomateriales F1 y las correspondientes a los biomateriales sembrados con $5 \cdot 10^5$ células aparecieron vacías, tanto en

los biomateriales F2 como en los biomateriales F1, mostrando una morfología similar a un vaso sanguíneo con paredes endoteliales. Al mismo tiempo, los biomateriales cultivados en medio condrogénico mostraban una degradación incipiente que no aparecía en los biomateriales cultivados en medio control.

Estas observaciones fueron más evidentes a los 21 días de cultivo (Figura 14), cuando las estructuras endoteliales pudieron observarse sin excepción en todos los biomateriales y la degradación era especialmente llamativa en aquellos sembrados con $5 \cdot 10^5$ células. Los biomateriales cultivados en medio control mostraron también una pequeña degradación, pero muy inferior a la que presentaban los biomateriales en condrogénesis.

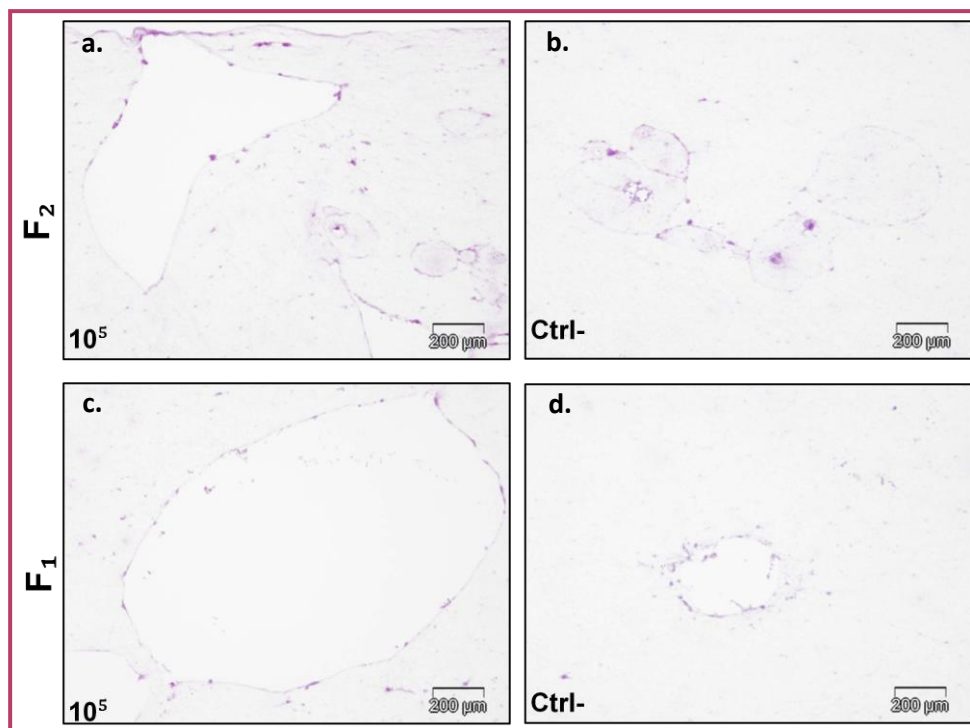


Figura 14. Tinción HE de los biomateriales 3D a los 21 días de cultivo

Además, a partir de los 7 días de cultivo se encontraron en los distintos biomateriales cultivados en condrogénesis algunas células que recordaban a condrocitos inmersos en una laguna (Figura 15, flechas).

Estas células estaban ausentes en los biomateriales cultivados en medio control.

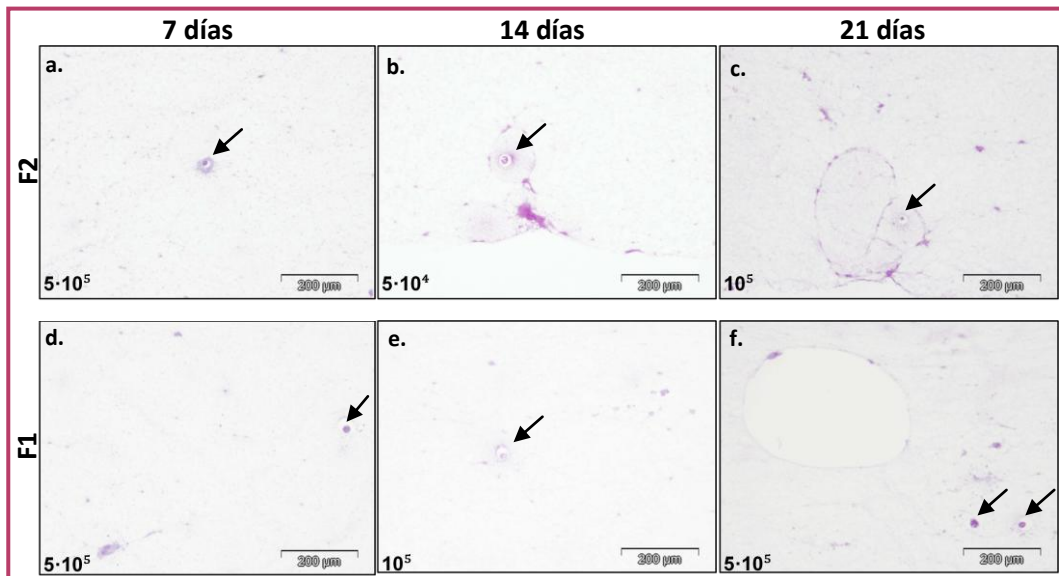


Figura 15. Tinción HE de biomateriales 3D condrogénicos (flechas: estructuras tipo laguna condrocitaria)

Por otra parte, en los biomateriales 2D teñidos con HE se observó una monocapa celular superficial a los 7 días de cultivo. Las células proliferaron excesivamente en todos los biomateriales F2 y en los biomateriales F1 cultivados en medio control, de manera que a los 21 días (Figura 16) se había formado una capa celular pluriestratificada y se había perdido la orientación de la membrana, pudiendo encontrarse células en ambas caras de la misma (Figura 16a, b y d). En cambio, en los biomateriales F1 cultivados en medio condrogénico las células no parecieron proliferar adecuadamente y a los 21 días de cultivo apenas se podían encontrar células en ellos (Figura 16c).

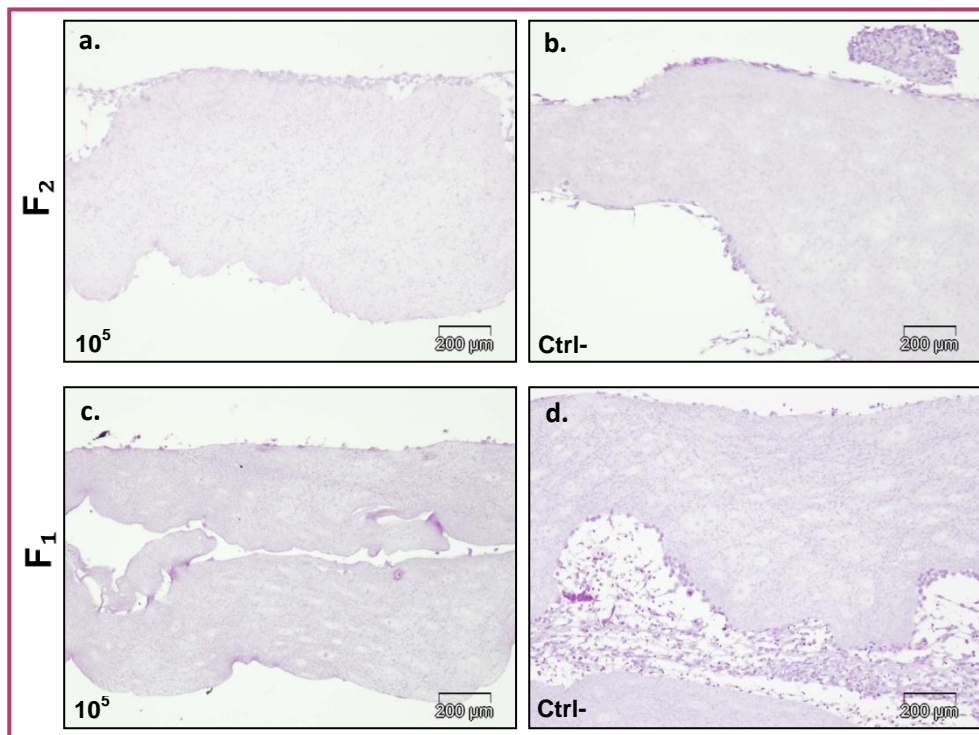


Figura 16. Tinción HE de los biomateriales 2D a los 21 días de cultivo

La degradación de los biomateriales fue más intensa en el segundo experimento, de manera que a los 14 días los biomateriales cultivados en medio condrogénico habían degenerado casi por completo. Las observaciones relativas a las formaciones celulares redondeadas y las células tipo condrocito fueron similares a las ya comentadas para el primer experimento (resultados no mostrados). No se dispone de las tinciones de los controles 3D de agarosa, dado que estos se disgregaron durante su manejo debido a su gran fragilidad.

5.3.2. Valoración de la diferenciación condrogénica

Las tinciones MM, AA-PAS, AT y SO mostraron que, aunque la estructura general del biomaterial no contenía las moléculas típicas de la MEC cartilaginosa, las células sí producían activamente fibras de colágeno (Figura 17a), proteoglicanos (Figura 17b, c y d) y algunos mucopolisacáridos ácidos (Figura 17b, azul pálido) a los 14 días de cultivo (Figura 17). La producción de mucopolisacáridos ácidos se confirmó

posteriormente con una tinción simple de azul alcian (resultados no mostrados).

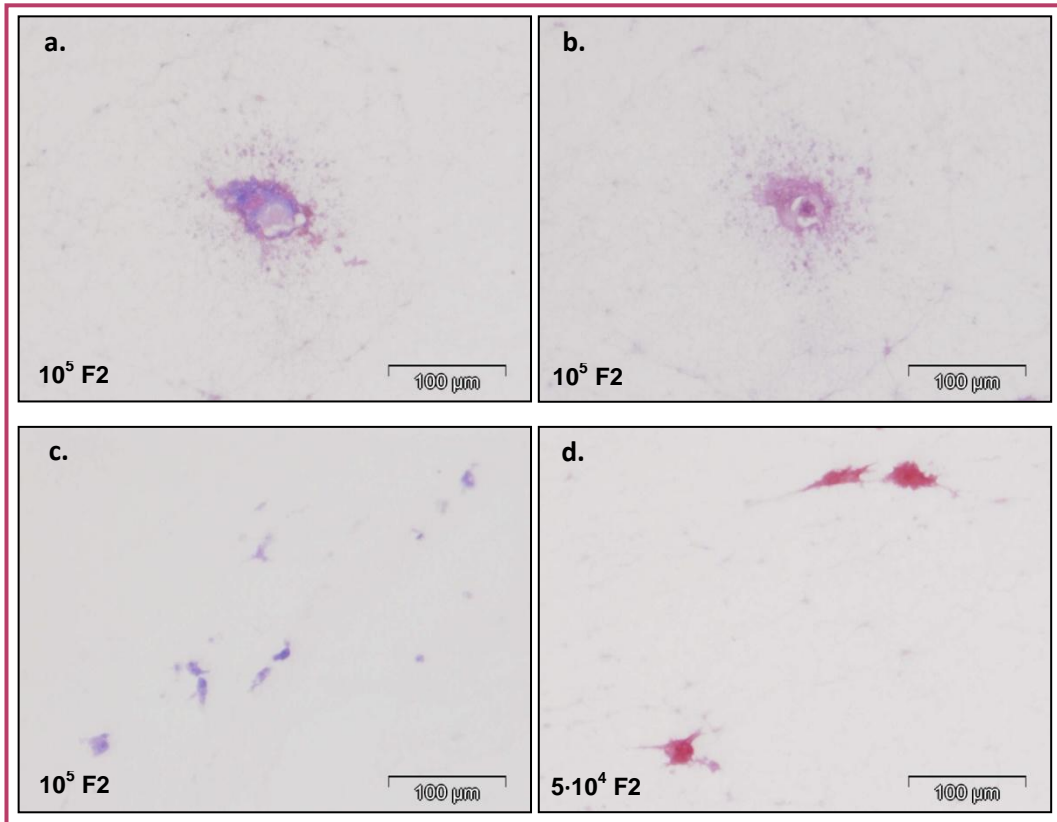


Figura 17. Tinciones MM (a), AA-PAS (b), AT (c) y SO (d) de los biomateriales 3D cultivados en medio condrogénico a los 14 días de cultivo

Debido a limitaciones de espacio, en la Figura 17 se muestran solamente fotografías representativas de las tinciones histoquímicas correspondientes a algunos biomateriales de F2 cultivados en medio condrogénico. Los biomateriales de F1 cultivados en medio condrogénico presentaron tinciones similares, pero de menor intensidad. Todos los biomateriales cultivados en medio control resultaron también levemente positivos para MM, AA-PAS, AT y SO, aunque los controles de F2 se tiñeron más que los controles de F1. En cualquier caso, la intensidad de la tinción aumentó con la dosis celular sembrada (resultados no mostrados).

A los 21 días de cultivo, la positividad fue mayor en todos los casos, tanto en los biomateriales cultivados en medio condrogénico como en aquellos cultivados en medio control (resultados no mostrados).

5.3.3. Valoración de la diferenciación angiogénica

Las tinciones inmunohistoquímicas para angiogenina, CD34 y CD31 se realizaron en biomateriales seleccionados a los 14 y 21 días de cultivo. Los biomateriales de F1 y F2 cultivados tanto en medio condrogénico como en medio control mostraron positividad para angiogenina y CD34 a los 14 y 21 días, localizada en las células que formaban las paredes de las estructuras tipo vaso sanguíneo. Esta positividad era mucho más intensa en los biomateriales cultivados en medio control y a los 21 días de cultivo (resultados no mostrados).

También se encontró una ligera positividad para CD31 a los 14 y 21 días de cultivo en todos los biomateriales, en las mismas células que angiogenina y CD34. Al igual que en el caso de los otros dos antígenos, esta positividad fue mayor en los biomateriales cultivados en medio control y a los 21 días de cultivo (resultados no mostrados).

5.4. Análisis de expresión génica en los biomateriales y controles

5.4.1. Estabilidad de expresión de genes de referencia

El análisis de estabilidad de expresión mediante el algoritmo *geNORM* resultó en la selección de un número óptimo de dos genes de referencia: *RPL13A* y *PBGD* (Figura 18).

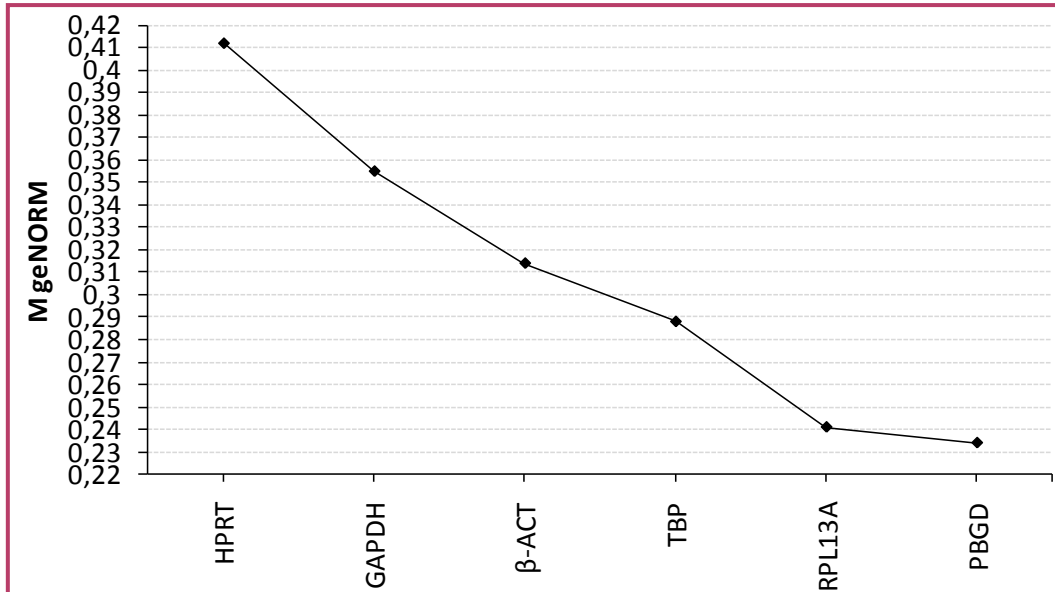


Figura 18. Estabilidad de expresión de los genes de referencia testados

5.4.2. Expresión génica relativa de genes específicos de condrogénesis

Los niveles de expresión génica se normalizaron con los genes de referencia seleccionados y se escalaron con respecto a la condición basal.

En el primer experimento, los biomateriales 3D mostraron una expresión incrementada del gen *ACAN* a los 4 días de cultivo, llegando a ser hasta 59.4 y 105.24 veces superior a los niveles de expresión basal en los biomateriales de F2 con $5 \cdot 10^4$ y 10^5 células embebidas, respectivamente. La expresión de este mismo gen apareció también notablemente incrementada en los biomateriales F1 y F2 cultivados en medio control, en los que fue 9.29 y 9.37 veces superior a los niveles basales de expresión. La expresión de *COLII* y *SOX9* no pareció verse incrementada, salvo en los biomateriales F2 con 10^5 y $5 \cdot 10^4$ células embebidas, respectivamente. La expresión relativa de *COLI* fue inferior a los niveles basales en todos los casos (resultados no mostrados).

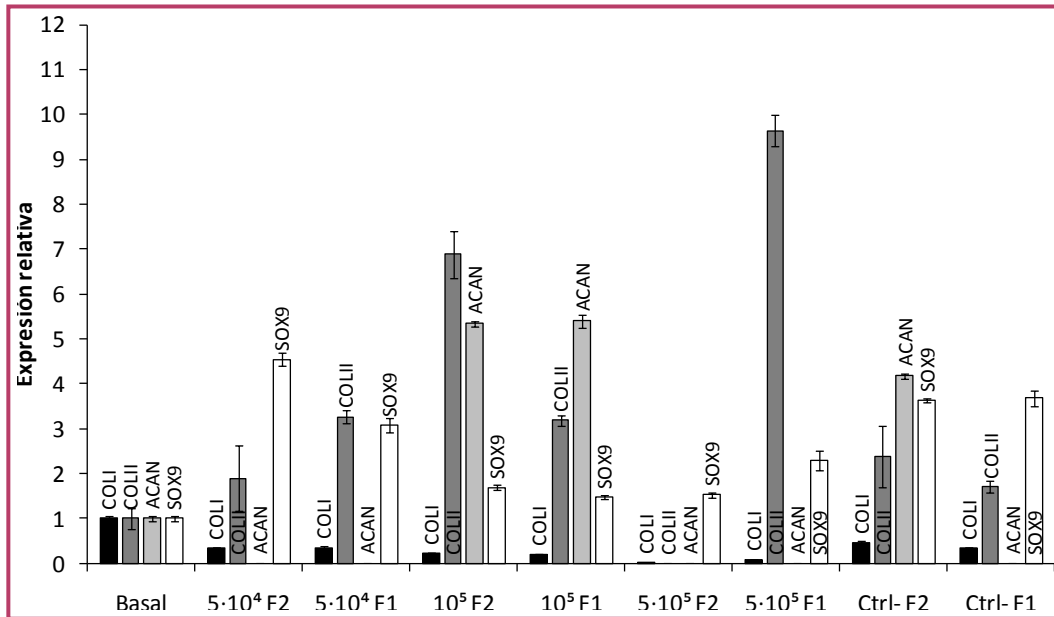


Figura 19. Niveles relativos de expresión de los genes COLI, COLII, ACAN y SOX9 en los biomateriales 3D a los 14 días de cultivo. Resultados expresados como media \pm error estándar

Los niveles relativos de expresión de COLI se mantuvieron por debajo del nivel basal durante todo el tiempo de cultivo. En cambio, la expresión de ACAN se vio muy reducida con respecto a la que se detectó inicialmente, desapareciendo por completo en algunos biomateriales ($5 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^5$ F2, $5 \cdot 10^5$ F1) y manteniéndose por encima de los niveles de expresión basal en otros (10^5 F2, 10^5 F1, Ctrl- F2). La expresión relativa de SOX9 aumentó a los 7, 14 y 21 días de cultivo, aunque con independencia del tiempo y la dosis celular sembrada (resultados a los 7 días no mostrados, Figura 19, Figura 20). Por último, los niveles de expresión de COLII se vieron notablemente incrementados a los 14 días de cultivo, especialmente en los biomateriales 10^5 F2 y $5 \cdot 10^5$ F1 (Figura 19), pero a los 21 días de cultivo solo se mantuvieron relativamente estables en 10^5 F2 (Figura 20).

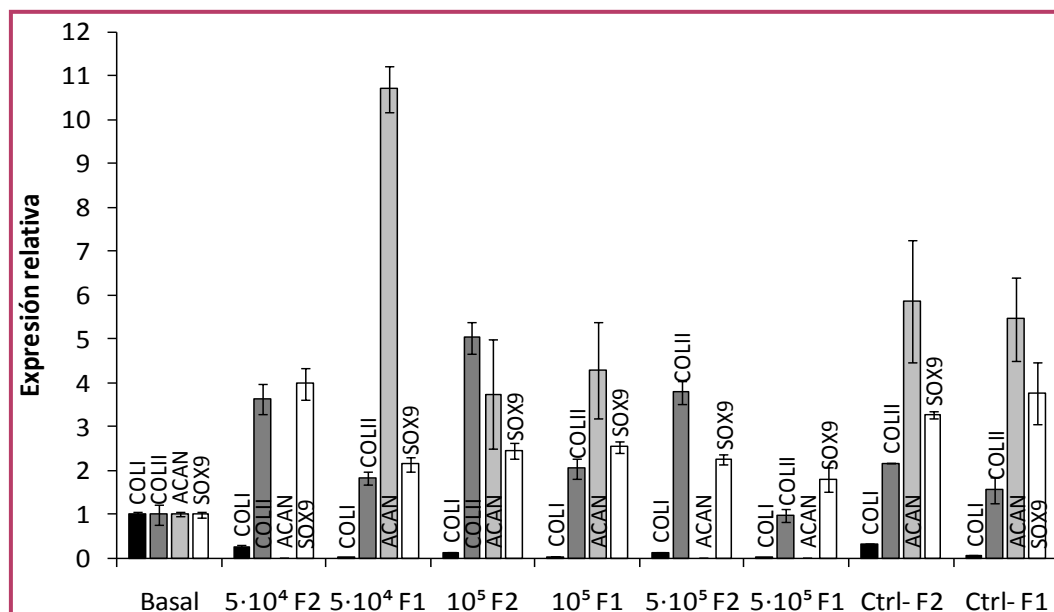


Figura 20. Niveles relativos de expresión de los genes COLI, COLII, ACAN y SOX9 en los biomateriales 3D a los 21 días de cultivo. Resultados expresados como media \pm error estándar

En general, los niveles de expresión de los genes típicos de condrogénesis fueron más estables a lo largo del período de cultivo en los biomateriales 3D de F1 y F2 con 10^5 células embebidas y en los biomateriales de F1 y F2 cultivados en medio control.

Por otra parte, en los biomateriales 2D de este experimento inicial los niveles de expresión de COLI se vieron reducidos con respecto a los basales en todo el período de cultivo. Así mismo, se detectó una expresión moderadamente incrementada de SOX9 a los 7, 14 y 21 días de cultivo (Figura 21). En cambio, la expresión relativa de COLII y ACAN se vio reducida a los 7 y 14 días de cultivo (Figura 21a y b). A los 21 días de cultivo (Figura 21c), los niveles de COLII fueron 4 veces superiores a los basales en el biomaterial 10^5 F2 y la expresión de ACAN fue de 7.11 a 18.32 veces superior a la basal, excepto en el biomaterial control de F1, que no expresó este gen.

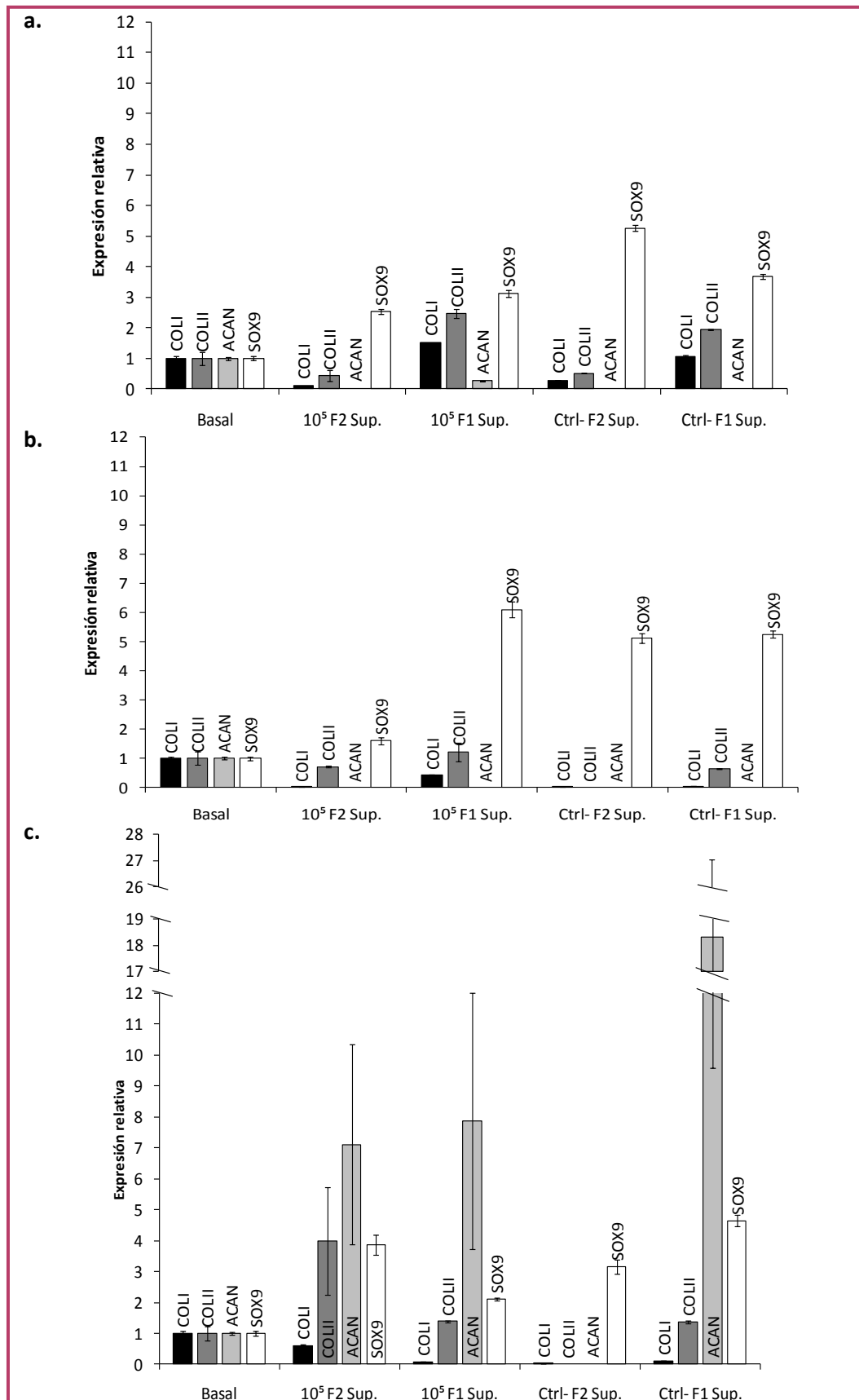


Figura 21. Niveles relativos de expresión de los genes COLI, COLII, ACAN y SOX9 en los biomateriales 2D a los a. 7, b. 14 y c. 21 días de cultivo. Resultados expresados como media \pm error estándar

En general, los biomateriales 2D no mostraron una expresión consistente de los genes típicos de condrogénesis, con la excepción de la expresión sostenida de SOX9.

En el segundo experimento, los biomateriales control de agarosa apenas expresaron COLI, COLII, ACAN y SOX9 durante todo el período de cultivo (Figura 22 y Figura 23). En el control de células en monocapa no hubo expresión de ACAN y la expresión de COLI y SOX9 fue muy reducida; en cambio, los niveles de COLII fueron 5.50 veces superiores a los basales a los 7 días de cultivo (Figura 22) y 7.24 veces superiores a los mismos a los 14 días de cultivo (Figura 23a), aunque a los 21 días esta expresión había desaparecido (Figura 23b). Por otra parte, los biomateriales 3D cultivados tanto en medio condrogénico como en medio control no expresaron ACAN en ningún momento y la expresión de SOX9 se vio solo ligeramente incrementada con respecto a los niveles basales. La expresión de COLI se vio incrementada a los 14 días de cultivo en los biomateriales F1 (Figura 23a), y a los 21 días también en los biomateriales F2 (Figura 23b). Todos los biomateriales 3D de plasma mostraron una expresión sostenida de COLII de 4.06 a 19 veces superior a la basal durante todo el período de cultivo (Figura 22 y Figura 23).

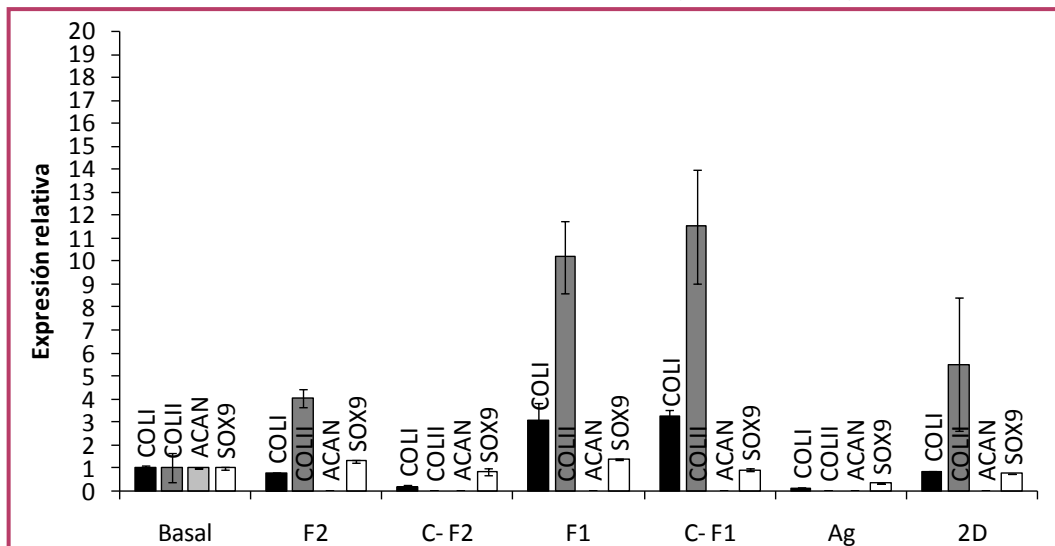


Figura 22. Niveles relativos de expresión de los genes COLI, COLII, ACAN y SOX9 en los biomateriales 3D del segundo experimento a los 7 días de cultivo. Resultados expresados como media \pm error estándar

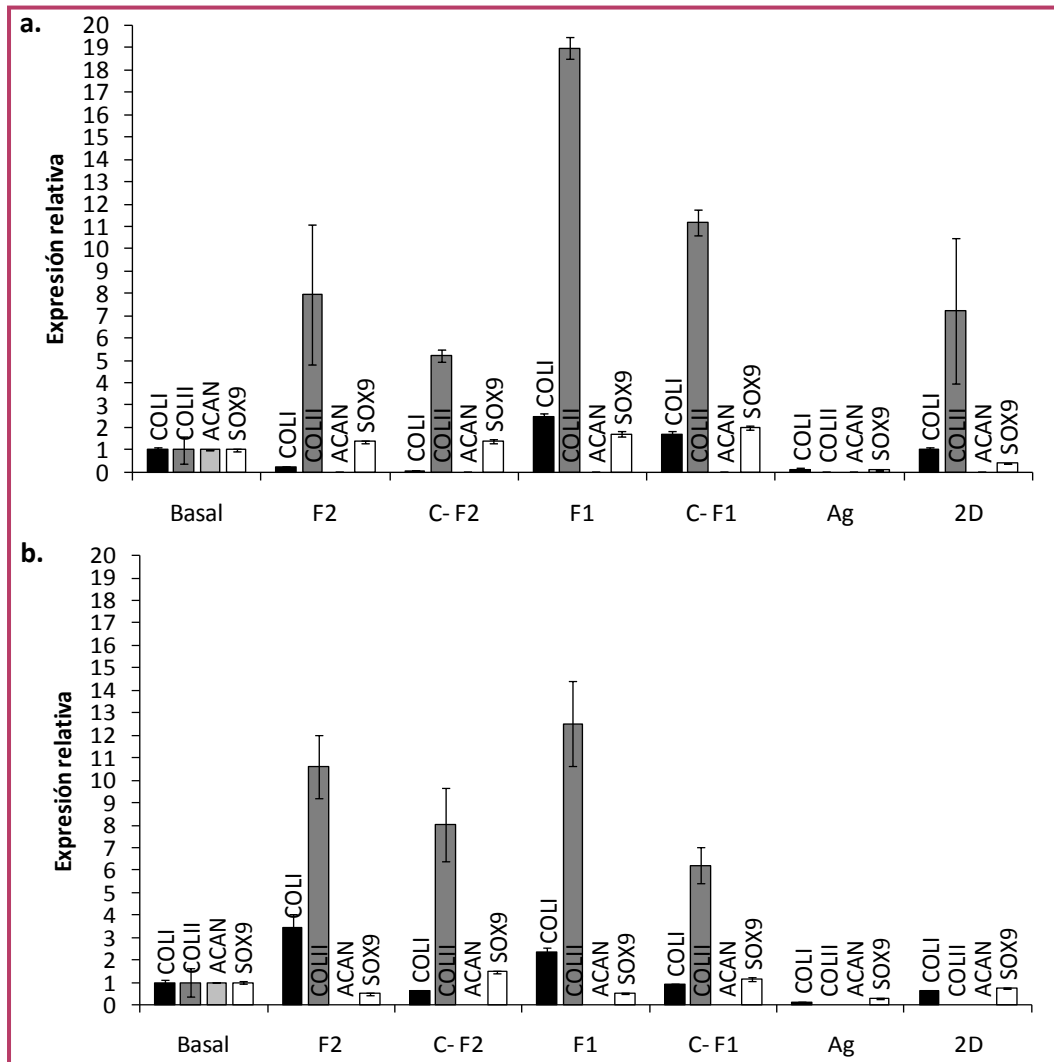


Figura 23. Niveles relativos de expresión de los genes COLI, COLII, ACAN y SOX9 en los biomateriales 3D del segundo experimento a los a. 14 y b. 21 días de cultivo. Resultados expresados como media \pm error estándar

En general, los biomateriales de plasma mostraron una buena expresión de los genes típicos de condrogénesis en comparación con los controles de agarosa y en monocapa, aunque también presentaron unos niveles ligeramente incrementados de COLI y no expresaron ACAN. Con respecto a los resultados obtenidos en el primer experimento, no parece que la diferenciación condrogénica haya sido similar.

5.4.3. Expresión génica relativa de genes específicos de angiogénesis

La normalización y escalado de los niveles de expresión génica se realizaron de la misma forma que en el análisis de la condrogénesis.

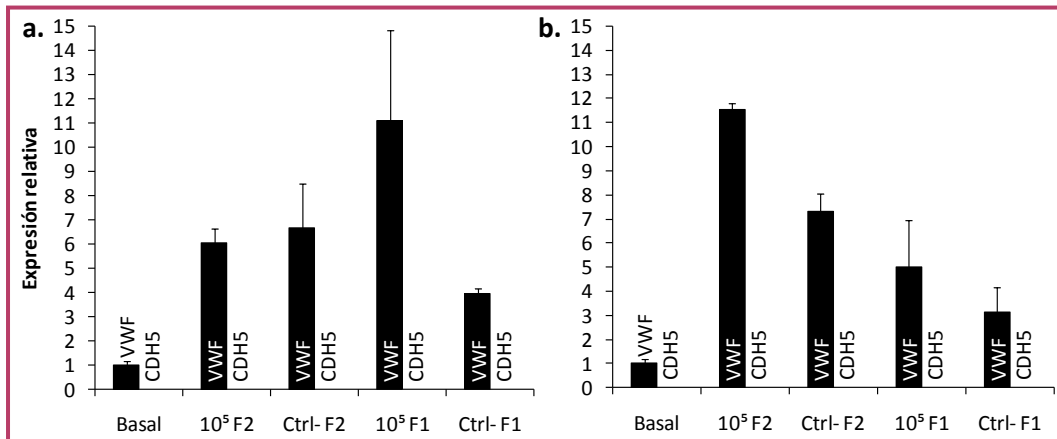


Figura 24. Niveles relativos de expresión de los genes *VWF* y *CDH5* a los a. 14 y b. 21 días de cultivo. Resultados expresados como media \pm error estándar

Los niveles de expresión de *VWF* aparecieron incrementados en todos los casos, tanto en los biomateriales cultivados en medio condrogénico como en los biomateriales cultivados en medio control (Figura 24). Fueron de 3.94 a 11.10 veces superiores a los niveles de expresión detectados en la condición basal a los 14 días de cultivo (Figura 24a), y de 3.13 a 11.55 veces superiores a la expresión basal a los 21 días de cultivo (Figura 24b). En cambio, la expresión de *CDH5* no se detectó en ningún caso a los 14 ni a los 21 días de cultivo.

6. DISCUSIÓN

Este estudio se ha llevado a cabo con la finalidad de obtener distintos biomateriales de PRP o PRFC y células CMMh-3A6 y valorar su potencial de formación de cartílago. El experimento inicial fue una primera aproximación destinada a determinar el formato (células en 2D o 3D) y la dosis celular más adecuados. En este último aspecto, existe una gran controversia en cuanto al número de células que deben contener los biomateriales para producir una regeneración condrogénica óptima²⁶. Los resultados preliminares nos permitieron seleccionar el biomaterial 3D con 10^5 células embebidas, cuyo potencial condrogénico se valoró en un segundo experimento frente a la condrogénesis experimentada por las células CMMh-3A6 al ser cultivadas en monocapa y al ser incluidas en un biomaterial 3D de agarosa, un material muy empleado como soporte en los estudios de IT de cartílago¹⁴. En general, las células proliferaron adecuadamente en los biomateriales de plasma y la condrogénesis fue muy superior a la que experimentaron al encontrarse en monocapa o en la matriz 3D de agarosa.

El análisis histológico general con HE de los biomateriales obtenidos en el experimento inicial nos llevó a desechar los biomateriales 2D con células sembradas en superficie debido a la pérdida de orientación sufrida por los mismos. Los análisis moleculares de expresión de genes típicos de condrogénesis confirmaron que la diferenciación condrogénica en estos biomateriales era muy pobre o nula; usando condrocitos articulares humanos desdiferenciados, Caron et al⁵⁶ ya demostraron que el cultivo en 2D no es favorable para la diferenciación condrogénica. La identificación de células similares a condrocitos inmersos lagunas en los biomateriales 3D nos llevó a pensar que la condrogénesis podía estar siendo efectiva. Esto fue confirmado por las tinciones histoquímicas MM, AA-PAS, AT y SO, que mostraron que las células estaban produciendo activamente las moléculas típicas de la MEC cartilaginosa: colágeno, proteoglicanos y

mucopolisacáridos ácidos. Park et al⁵⁷ encontraron también una distribución pericelular de la MEC cartilaginosa en biomateriales de fibrina, similar a la obtenida en nuestro caso. Los análisis moleculares corroboraron este hallazgo al detectar una expresión moderada-alta de los genes *SOX9*, *COLII* y *ACAN*; al mismo tiempo, la baja expresión de *COLI* indicó que no se estaba produciendo una indeseable diferenciación a fibrocartílago. Por tanto, los análisis morfológicos, histoquímicos y moleculares mostraron que en los biomateriales 3D de plasma se produce una diferenciación de las células CMMh-3A6 hacia células similares a condrocitos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores⁵⁸, aunque también hay estudios que apuntan hacia un efecto inhibitorio de la condrogénesis en las matrices de fibrina⁵⁹.

A la hora de seleccionar la dosis celular más adecuada se tuvieron en cuenta tanto los análisis histológicos como los moleculares. La estabilidad de expresión de los genes *SOX9*, *COLII* y *ACAN*, junto con la intensidad de las tinciones histoquímicas específicas para la MEC cartilaginosa y el grado de degradación, nos llevaron a seleccionar los biomateriales 3D con 10^5 células embebidas. En ellos, los genes mencionados mostraron una expresión más estable, la intensidad de las tinciones histoquímicas fue equiparable a la observada en los biomateriales con $5 \cdot 10^5$ células y la degradación fue moderada en relación a la que se detectó al emplear la dosis celular más elevada. Es destacable la diferenciación condrogénica detectada a nivel molecular (aunque no tanto a nivel histoquímico) en los biomateriales cultivados en medio control, que fue solo levemente inferior a la detectada en los biomateriales cultivados en medio condrogénico. Esta diferenciación posiblemente se deba a los FC aportados por el plasma y las plaquetas. En concreto, *TGF-β*, *bFGF* e *IGF* son FC que se encuentran en cantidades importantes en los gránulos α de las plaquetas y que han demostrado desempeñar un importante papel en la inducción y mantenimiento del fenotipo condrogénico^{6, 60}. En un estudio *in vivo* de regeneración ósea, Paknejad et al⁶¹ encontraron un fenómeno de

diferenciación condrogénica en uno de los biomateriales de fibrina y PRFC que calificaron como metaplasia, pero que podría deberse a los FC condrogénicos aportados por el PRFC al igual que en nuestros controles.

Las estructuras tipo vaso sanguíneo observadas en los biomateriales 3D nos llevaron a realizar pruebas moleculares e histológicas para comprobar si se estaba produciendo una diferenciación angiogénica. Las tinciones inmunohistoquímicas y los análisis de *qRT-PCR* mostraron que, efectivamente, dichos biomateriales estaban sufriendo algún grado de angiogénesis. El alto contenido plaquetario en *VEGF* y *PDGF*, dos de los FC angiogénicos más potentes⁶², explicaría esta incipiente vascularización. Por lo tanto, es probable que en los biomateriales 3D se esté produciendo una competencia entre la diferenciación angiogénica y la diferenciación condrogénica, como ya fue sugerido por Kon et al⁶³. Algunos autores ya han explorado la posibilidad de combinar los soportes de fibrina con agentes antiangiogénicos⁶⁴, o de emplear CMM modificadas genéticamente para expresar inhibidores de *VEGF*⁶⁵.

En el segundo experimento observamos inicialmente una actividad celular reducida en todos los biomateriales 3D con respecto al cultivo en monocapa, lo que podría indicar algún grado de citotoxicidad. No obstante, la agarosa es un soporte inerte ampliamente testado y el plasma es un producto natural cuya degradación no debería generar productos tóxicos¹⁴; además, la reducción de las diferencias de actividad celular a los 14 y 21 días de cultivo nos llevó a pensar que estas diferencias podrían deberse a un distinto grado de activación del metabolismo celular. Es posible que la activación de los mecanismos de diferenciación reduzca inicialmente la actividad metabólica, para luego aumentarla cuando esta diferenciación empieza a ser efectiva. En el caso de la condrogénesis, esta efectividad se correspondería con una producción activa de las moléculas típicas de la MEC cartilaginosa y una remodelación de la matriz de fibrina del biomaterial. De la misma forma, la

angiogénesis supondría una activación de la proliferación y migración celular para originar las células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos. Esta intensificación metabólica debida a la diferenciación explicaría las diferencias de actividad detectadas entre los biomateriales de plasma cultivados en medio condrogénico y en medio control. Así mismo, las plaquetas y los FC aportados por el soporte bioactivo podrían ser responsables de la mayor actividad en los biomateriales de plasma con respecto al control de agarosa a los 14 días de cultivo, como ya fue sugerido por Gessmann et al⁶⁶ al comparar la actividad en biomateriales de PRP y plasma sin plaquetas. El agotamiento de estos FC llevaría a la reducción de estas diferencias a los 21 días de cultivo. En este sentido hay que destacar la aparente falta de diferencias entre los biomateriales F1 y F2; teóricamente, el mayor contenido en plaquetas de F2 supondría un mayor contenido en FC y, por lo tanto, una mayor activación metabólica que no ha sido detectada en este estudio. Por otra parte, la acusada reducción de la actividad en el control en monocapa puede deberse probablemente a una necrosis en el interior del esferoide formado por las células; la muerte por necrosis en el interior de los esferoides es un fenómeno bien conocido y para el que algunos autores ya han desarrollado diversas soluciones⁶⁷.

Una importante contradicción en los resultados obtenidos es la actividad celular detectada en el control de agarosa, similar a la de los biomateriales de plasma, y la extraordinariamente baja expresión génica en dicho control. No obstante, las cantidades de ARN obtenidas a partir de los controles de condrogénesis en agarosa fueron muy reducidas (resultados no mostrados), por lo que es probable que el análisis de *qRT-PCR* no represente lo que está ocurriendo realmente en estos biomateriales. Watts et al⁶⁸ obtuvieron también cantidades de ARN muy reducidas a partir de biomateriales de agarosa utilizando un kit de extracción comercial basado en la centrifugación en columnas de sílice. En este sentido, Wang y Stegemann⁶⁹ indican que tanto el TRIzol® como

las columnas de centrifugación pueden no ser adecuados para la extracción de ácidos nucleicos de una matriz polisacáridica como la agarosa, y proponen como alternativa el bromuro de cetiltrimetilamonio.

La diferenciación condrogénica de los biomateriales de este segundo experimento fue muy inferior a la experimentada por los biomateriales del experimento inicial. Quizás esto pueda deberse a la variabilidad en los contenidos de FC en la sangre de las ovejas donantes. Una mayor proporción de factores proangiogénicos podría haber provocado la disrupción de la condrogénesis⁶³, aunque esto todavía debe ser confirmado mediante tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas y análisis de expresión génica de la angiogénesis. Otra explicación plausible es que la fuerte degradación experimentada por los biomateriales cultivados en medio condrogénico no haya permitido una diferenciación celular adecuada. Esta intensa fibrinólisis, aparentemente mucho más acusada que en el primer experimento, es posible que derive del menor tamaño de los biomateriales. Es decir, cabría esperar que el grado de fibrinólisis haya sido similar en los dos experimentos, pero el tamaño reducido de los biomateriales del segundo experimento podría haber hecho que la degradación pareciese más intensa. Chien et al²⁸ encontraron tasas de degradación similares en biomateriales de fibrina formados en placas de 24 pocillos, que experimentaron una fibrinólisis completa en unas dos semanas, por lo que el motivo de esta degradación acelerada puede ser otro. Así mismo, la causa de que esta fibrinólisis se produzca en tal magnitud en los biomateriales cultivados en medio condrogénico pero no en los cultivados en medio control no ha sido identificada. Una posibilidad es que la remodelación de la matriz del biomaterial durante la condrogénesis haya incrementado su inestabilidad, resultando en el colapso de la estructura al tener esta un tamaño reducido. En cualquier caso, en futuros estudios cabría considerar la estabilización de los biomateriales mediante la adición de agentes antifibrinolíticos como la aprotina^{13, 57, 70} o el ácido tranexámico⁷¹.

Una de las principales limitaciones del presente estudio es la carencia de réplicas de los experimentos con sangre ovina de distintos donantes para poder realizar un análisis estadístico de los resultados. Por lo tanto, estos resultados preliminares no permiten obtener conclusiones definitivas y requieren ser complementados con nuevos experimentos antes de iniciar estudios más detallados sobre la condrogénesis y capacidad de regeneración de cartílago *in vitro* e *in vivo*.

En un futuro se iniciarán experimentos con biomateriales de sangre y CMM obtenidas de pacientes humanos para su potencial uso clínico. Se caracterizarán las CMM, se determinará la cinética de liberación de los FC contenidos en los biomateriales y se valorará su capacidad de diferenciación a los tres linajes mesodérmicos (adipogénico, osteogénico y condrogénico) antes de iniciar un modelo de regeneración *in vitro* de defectos condrales focales en explantes de cartílago normal y artrósico. Posteriormente, si los resultados son favorables, se pretende testar su capacidad de regeneración en un modelo *in vivo* de defectos focales y OA.

7. CONCLUSIONES

1. Es posible obtener biomateriales de PRP o PRFC combinados con células CMMh-3A6.
2. El formato 3D es más adecuado que el formato 2D para la diferenciación condrogénica de las células.
3. Los FC aportados por el plasma y las plaquetas parecen contribuir a la diferenciación condrogénica, pero también parecen inducir angiogénesis.
4. En futuros estudios sería conveniente intentar estabilizar los biomateriales mediante la adición de un agente antifibrinolítico y/o la inhibición de la diferenciación angiogénica.

8. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a la Dra. Elena Fernández Burguera y al Dr. Francisco Javier Blanco García por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, en especial a la Dra. Elena Fernández por las largas horas de trabajo y enseñanza dedicadas. Y a Ángela Vela, Tamara Hermida, Joana Silva, María José Sánchez, Purificación Filgueira y Noa Goyanes por sus consejos y por haber resuelto numerosas dudas y haber colaborado en el buen desarrollo de este estudio.

También agradezco al CIBER-BBN/ISCIII el apoyo económico recibido para participar en este proyecto. Al *BTI Biotechnology Institute* el material y equipamiento proporcionados para poder llevar a cabo este estudio, a la Unidad de Cirugía Experimental del INIBIC la provisión de sangre de oveja, y al Dr. Chih-Chien Tsai (*Stem Cell Laboratory, Departmente of Medical Research & Education and Orthopaedics & Traumatology, Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan*) la cesión de la línea celular CMMh-3A6.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Reumatología. Artrosis: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. 1ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2010.
2. Lubis AM, Lubis VK. Adult bone marrow stem cells in cartilage therapy. *Acta Med Indones*. 2012; 44(1):62-68.
3. Richter W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med*. 2009; 266(4):390-405.
4. Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira Fernandez P, Goyanes N et al. Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis* [revista en Internet]. 2013 [consultado el 16/05/2014]; 72(6):[10p.]. Disponible en: <http://ard.bmj.com/content/early/2013/11/13/annrheumdis-2013-204244.abstract>.
5. Perera JR, Gikas PD, Bentley G. The present state of treatments for articular cartilage defects in the knee. *Ann R Coll Surg Engl*. 2012; 94(6):381-387.
6. Zhu H, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y et al. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013; 21(11):1627-1637.
7. Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. *Phil Trans London*. 1743; 42:514-521.
8. Matsumoto T, Okabe T, Ikawa T, Iida T, Yasuda H, Nakamura H et al. Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. *J Cell Physiol*. 2010; 225(2):291-295.
9. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med*. 2000; 133(5):321-328.

10. Mobasheri A, Csaki C, Clutterbuck AL, Rahmanzadeh M, Shakibaei M. Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy. *Histol Histopathol.* 2009; 24(3):347-366.
11. Anitua E, Prado R, Orive G. Endogenous morphogens and fibrin bioscaffolds for stem cell therapeutics. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(6):364-374.
12. Hollander AP, Dickinson SC, Sims TJ, Brun P, Cortivo R, Kon E et al. Maturation of tissue engineered cartilage implanted in injured and osteoarthritic human knees. *Tissue Eng.* 2006; 12(7):1787-1796.
13. Ahmed TA, Giulivi A, Griffith M, Hincke M. Fibrin glues in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(3-4):323-335.
14. Zhao W, Jin X, Cong Y, Liu Y, Fu J. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J Chem Technol Biotechnol.* 2013; 88(3):327-339.
15. Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62(7-8):741-752.
16. Brower J, Blumberg S, Carroll E, Pastar I, Brem H, Chen W. Mesenchymal stem cell therapy and delivery systems in nonhealing wounds. *Adv Skin Wound Care.* 2011; 24(11):524-532.
17. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29(1):37-41.
18. Roelofs AJ, Rocke JP, De Bari C. Cell-based approaches to joint surface repair: a research perspective. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(7):892-900.
19. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(19):10711-10716.

20. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999; 284(5417):1168-1170.
21. Hung SC, Yang DM, Chang CF, Lin RJ, Wang JS, Ho LLT et al. Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes. *Int J Cancer*. 2004; 110(3):313-319.
22. Tsai CC, Chen CL, Liu HC, Lee YT, Wang HW, Hou LT et al. Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *J Biomed Sci [revista en Internet]*. 2010 [consultado el 24/03/2014]; 17:64 [13p.]. Disponible en: <http://www.jbiomedsci.com/content/17/1/64>.
23. Chang SLY, Chou RH, Zeng HJ, Lin YH, Chiu TY, Yang DM et al. Downregulation of DAB2IP promotes mesenchymal-to-neuroepithelial transition and neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLOS ONE [revista en Internet]*. 2013 [consultado el 24/03/2014]; 8(9):e75884 [9p.]. Disponible en: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0075884>.
24. Chang MC, Tsao CH, Huang WH, Chen PCH, Hung SC. Conditioned medium derived from mesenchymal stem cells overexpressing HPV16 E6E7 dramatically improves ischemic limb. *J Mol Cell Cardiol*. 2014; 72:339-349.
25. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998; 238(1):265-272.
26. Buxton AN, Bahney CS, Yoo JU, Johnstone B. Temporal exposure to chondrogenic factors modulates human mesenchymal stem cell chondrogenesis in hydrogels. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17(3-4):371-380.

27. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(8):1894-1904.
28. Chien CS, Ho HO, Liang YC, Ko PH, Sheu MT, Chen CH. Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res Part B.* 2012; 100(4):948-955.
29. Ma K, Titan AL, Stafford M, Zheng CH, Levenston ME. Variations in chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin/alginate blended hydrogels. *Acta Biomater.* 2012; 8(10):3754-3764.
30. Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, Liu S, Jia W et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials.* 2012; 33(29):7008-7018.
31. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55(11):1294-1299.
32. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(6):638-646.
33. Dohan-Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009; 27(3):158-167.
34. Andía I, Sánchez M, Maffulli N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther.* 2012; 12(1):7-22. PMID: 22171664.
35. Anitua E, Prado R, Sánchez M, Orive G. Platelet-rich plasma: preparation and formulation. *Oper Tech Orthop.* 2012; 22(1):25-32.

36. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14(4):529-535.
37. Anitua E, inventor; Furtado – Marcas e Patentes, S.A., assignee. Bone tissue regenerating composition. Europe patent EP 1,066,838. 2001 Jan 10.
38. BTI Biotechnology Institute. Tecnología PRGF®-Endoret®: Cirugía ortopédica y medicina del deporte. Dossier Científico [Libro en Internet]. 1ª edición. Vitoria-Gasteiz (España): BTI Biotechnology Institute; 2012 [27/11/2013]. Disponible en: <https://www.utbproject.org/galeria/Libro%20Publi%20Trauma.pdf>
39. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006; 24(5):227-234.
40. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol*. 2007; 78(4):661-669.
41. Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P et al. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF. *J Cell Physiol*. 2010; 225(3):757-766.
42. Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol*. 2012; 37(6):652-657.
43. Rodríguez-Jiménez FJ, Valdes-Sánchez T, Carrillo JM, Rubio M, Monleon-Prades M, García-Cruz DM et al. Platelet-rich plasma favors proliferation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells in methacrylate-endcapped caprolactone porous scaffold niches. *J Funct Biomater*. 2012; 3(3):556-568.
44. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehrani A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived

- growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012; 40(1):2-7.
45. Oliva A, Passaro I, Di Pasquale R, Di Feo A, Criscuolo M, Zappia V et al. Ex vivo expansion of bone marrow stromal cells by platelet-rich plasma: a promising strategy in maxillo-facial surgery. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2005; 18(3):47-53.
46. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, de la Fuente M, Azofra J et al. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology (Oxford).* 2007; 46(12):1769-1772.
47. Anitua E, Sánchez M, de la Fuente M, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012; 20(9):1657-1665.
48. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andía I, Padilla S, Santisteban J et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35(10):1648-1652.
49. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andía I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26(5):910-913.
50. Wang-Saegusa A, Cugat R, Ares O, Seijas R, Cuscó X, Garcia-Ballebó M. Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011; 131(3):311-317.
51. Sánchez M, Fiz N, Azofra J, Usabiaga J, Aduriz-Recalde E, García-Gutierrez A et al. A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthroscopy.* 2012; 28(8):1070-1078.

52. Filardo G, Kon E, Pereira-Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di Martino A et al. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: a single- versus double-spinning approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012; 20(10):2082-2091.
53. Sánchez M, Guadilla J, Fiz N, Andía I. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51(1):144-150.
54. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paeppe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol [revista en Internet].* 2002 [consultado el 16/05/2014]; 3(7):RESEARCH0034 [12p.]. Disponible en: <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>.
55. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-408.
56. Caron MM, Emans PJ, Coolsen MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012; 20(10):1170-1178.
57. Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park KH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin constructs evaluated in vitro and in nude mouse and rabbit defects models. *Biomaterials.* 2011; 32(6):1495-1507.
58. Ho STB, Cool SM, Hui JH, Hutmacher DW. The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 2010; 31(1):38-47.
59. Ma K, Titan AL, Stafford M, Zheng CH, Levenston ME. Variations in chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin/alginate blended hydrogels. *Acta Biomater.* 2012; 8(10):3754-3764.

60. Danisovic L, Varga I, Polák S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. 2012; 44(2):69-73.
61. Paknejad M, Shayesteh YS, Yaghobee S, Shariat S, Dehghan M, Motahari P. Evaluation of the effect of plasma rich in growth factors (PRGF) on bone regeneration. *J Dent (Tehran)*. 2012; 9(1):59-67.
62. Anitua E, Sánchez M. Un nuevo enfoque biológico de la cirugía ortopédica y medicina del deporte. 1ª edición. Álava: Teamwork Media España; 2012.
63. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Fini M, Salamanna F, Giavaresi G et al. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxiapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010; 11:220.
64. Centola M, Abbruzzese F, Scotti C, Barbero A, Vadalà G, Martin I et al. Scaffold-based delivery of a clinically relevant anti-angiogenic drug promotes the formation of in vivo stable cartilage. *Tissue Eng Part A*. 2013; 19(17-18):1960-1971.
65. Kubo S, Cooper GM, Matsumoto T, Phillippi JA, Corsi KA, Usas A et al. Blocking vascular endothelial growth factor with soluble Flt-1 improves the chondrogenic potential of mouse skeletal muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(1):155-165.
66. Gessmann J, Seybold D, Peter E, Schildhauer TA, Köller M. Plasma clots gelled by different amounts of calcium for stem cells delivery. *Langenbecks Arch Surg*. 2013; 398(1):161-167.
67. Anada T, Fukuda J, Sai Y, Suzuki O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials*. 2012; 33(33):8430-8441.
68. Watts AE, Ackerman-Yost JC, Nixon AJ. A comparison of three-dimensional culture systems to evaluate in vitro chondrogenesis of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2013; 19(19-20):2275-2283.

69. Wang L, Stegemann JP. Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*. 2010; 31(7):1612-1618.
70. Park JS, Yang HN, Woo DG, Chung HM, Park KH. In vitro and in vivo chondrogenesis of rabbit bone marrow-derived stromal cells in fibrin matrix mixed with growth factor loaded in nanoparticles. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(8):2163-2165.
71. Sitek P, Wysocka-Wycisk A, Kepski F, Król D, Bursig H, Dylag S. PRP-fibrinogen gel-like chondrocyte carrier stabilized by TXA- preliminary study. *Cell Tissue Bank*. 2013; 14(1):133-140.