



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN
SANITARIA (MAIS)**

Especialidad en Fundamentos de Investigación Biomédica

Curso académico 2018-2019

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Puesta a punto de un protocolo de
diferenciación condrogénica en células madre
pluripotentes inducidas (*iPSCs*) generadas a
partir de pacientes con artrosis de manos y
un donante sano**

Lidia Lorenzo Catoira

19 de Julio de 2019

Dirigido por los Doctores:
Silvia María Díaz Prado e Isaac Manuel Fuentes Boquete

Dña. Silvia M^a Díaz Prado, coordinadora del Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa (TCMR) de la Universidad de A Coruña y **D. Isaac Fuentes Boquete**, profesor del Área de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad de A Coruña.

CERTIFICAN:

Que **Dña. Lidia Lorenzo Catoira**, Graduada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo: **“Puesta a punto de un protocolo de diferenciación condrogénica en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) generadas a partir de pacientes con artrosis de manos y un donante sano”**.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al título del Máster en Asistencia e Investigación Sanitaria con la especialidad en Fundamentos de Investigación Biomédica.

A Coruña, 19 de Julio de 2019

Dña. Silvia M^a Díaz Prado

D. Isaac Fuentes Boquete

ÍNDICE

1. <u>LISTADO DE ABREVIATURAS</u>	IV
2. <u>LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS</u>	VII
3. <u>RESUMEN</u>	X
4. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
4.1. CARTÍLAGO ARTICULAR	1
4.2. ARTROSIS	3
4.2.1. ARTROSIS DE MANO	4
4.3. CÉLULAS MADRE	6
4.3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE	6
4.3.2. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES O <i>PSCs</i>	7
4.3.3. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS O <i>iPSCs</i>	8
4.3.3.1. Origen y características de las <i>iPSCs</i>	8
4.3.3.2. Cultivo de las <i>iPSCs</i>	9
4.3.3.3. Uso de las <i>iPSCs</i> en el modelado de enfermedades	10
4.4. DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA	11
5. <u>OBJETIVOS</u>	14
5.1. OBJETIVO GENERAL	14
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
6. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	15
6.1. LÍNEAS CELULARES	15
6.1.1. LÍNEAS CELULARES DE <i>iPSCs</i>	15
6.1.2. LÍNEA CELULAR DE TC28A2	15
6.2. CULTIVO CELULAR	16

6.2.1. CULTIVO DE <i>iPSCs</i>	16
6.2.1.1. Cultivo en <i>feeder</i>	16
6.2.1.1.1. Siembra de capa de <i>feeder</i>	16
6.2.1.1.2. Inactivación del ciclo celular de las <i>HFF</i>	16
6.2.1.1.3. Siembra de <i>iPSCs</i>	18
6.2.2. CULTIVO LIBRE DE <i>FEEDER</i>	18
6.2.3. CULTIVO DE LA LÍNEA TC28A2	19
6.3. DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA	20
6.3.1. CULTIVO DE LAS <i>iPSCs</i> PARA LA CONDRÓGENESIS DIRIGIDA	20
6.3.1.1. Formación forzada de <i>EBs</i> mediante la técnica de <i>hanging drop</i>	22
6.3.2. CULTIVO DE LOS <i>EBs</i> ESPONTÁNEOS	23
6.4. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA	24
6.4.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA	24
6.4.2. TINCIÓN DE TRICRÓMICO DE MASSON	24
6.4.3. TINCIÓN DE AZUL DE TOLUIDINA	25
6.4.4. TINCIÓN DE SAFRANINA O	25
6.5. ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA	25
6.5.1. OBTENCIÓN, EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN	25
6.5.2. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO	26
6.5.3. <i>PCR</i> CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	26
7. RESULTADOS	29
7.1. CULTIVO CELULAR DE LAS <i>iPSCs</i> Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	29
7.1.1. CULTIVO EN <i>FEEDER</i>	29
7.1.2. ADAPTACIÓN AL CULTIVO LIBRE DE <i>FEEDER</i>	29
7.2. EVALUACIÓN DEL CULTIVO DE CONDRÓGENESIS DIRIGIDA	30
7.2.1. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA	30
7.2.1.1. Formación forzada de <i>EBs</i> de <i>iPSCs</i> y esferoides en TC28a2	32
7.2.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	32
7.2.3. ANÁLISIS MOLECULAR	36
7.3. EVALUACIÓN DEL CULTIVO DE <i>EBs</i> ESPONTÁNEOS	39
7.3.1. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA	39

7.3.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	39
8. <u>DISCUSIÓN</u>	41
9. <u>CONCLUSIONES</u>	48
10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	49
11. <u>AGRADECIMIENTOS</u>	56
12. <u>ANEXOS</u>	57

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

A: Absorbancia

AA: Ácido ascórbico

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: Ácido desoxiribonucleico complementario

ACR: *American Colleague of Reumatology*, Colegio Americano de Reumatología

AGG: *Aggrecan*, Agrecano

ARN: Ácido ribonucleico

ASCs: *Adult stem cells*, células madre adultas

AT: Azul de Toluidina

BMP-2: *Bone morphogenic protein 2*, proteína morfogenética de hueso 2

CO₂: Dióxido de carbono

Col-1: Colágeno de tipo I

Col-2: Colágeno de tipo II

Col-10: Colágeno de tipo X

CHUAC: Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña

c-Myc: *Cellular Myc*, Myc celular

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

dNTPs: *Deoxynucleotide triphosphates*, Deoxinucleótidos trifosfatos

DPBS: *Dulbecco's Phosphate buffered saline*, solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco

EBs: *Embryoid bodies*, cuerpos embrionarios

ECM: *Extracellular matrix*, matriz extracelular

EDTA: *Ethylene diamine tetraacetic acid*, ácido etilendiaminotetraacético

EEUU: Estados Unidos

ESC: *Embrionic stem cells*, células madre embrionarias

bFGF: *Fibroblast Growth Factor*, factor de crecimiento fibroblástico

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, gliceroaldehído 3-fosfato-deshidrogenasa

GAGs: Glicosaminoglicanos

GDF5: *Growth differentiation factor 5*, factor 5 de diferenciación de crecimiento

Gy: Grays

H-E: Hematoxilina-eosina

hES: *Human Embryonic Stem*

hESC: *Human embryonic stem cells*, células madre embrionarias humanas

HFF: *Human foreskin fibroblasts*, fibroblastos de prepucio humano

H₂O: Agua

IDs: Articulaciones interfalángicas distales

IPs: Articulaciones interfalángicas proximales

INIBIC: Instituto de Investigación Biomédica de La Coruña

iPSCs: *Induced Pluripotent Stem Cells*, células madre pluripotentes inducidas

ITS: Insulina-transferrina-ácido selénico

Klf4: *Krüppel-like factor 4*, factor similar al factor Krüppel 4

MEM-NEAA: *MEM-non essential aminoacids*, aminoácidos no esenciales

MEM

MSCs: *Mesenchymal Stem Cells*, Células madre mesenquimales

MgCl₂: Cloruro de magnesio

ml: Mililitros

mm: Milímetros

ng: Nanogramos

nm: Nanómetro

NRE: Niveles relativos de expresión

nt: Nucleótido

OA: *Osteoarthritis*, artrosis

OAm: Artrosis de manos

Oct4: *Octamer-binding transcription factor 4*, factor de transcripción 4 de unión a octámero

OSKM: Factores de reprogramación de Yamanaka

PCR: *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

P/E: Penicilina/estreptomicina

PGs: Proteoglicanos

PSCs: Pluripotent Stem Cells, células madre pluripotentes

qRT-PCR: Quantitative real time PCR, PCR cuantitativa en tiempo real

RI: Rock Inhibitor

rpm: Revoluciones por minuto

s: Segundos

SBF: Suero bovino fetal

SO: Safranina O

SOX 2: [SRY (Sex determining Region Y)-box 2], región determinante del sexo Y caja 2

TGF-β1: Transforming growth factor beta 1, factor de crecimiento transformante beta 1

TM: Tricrómico de Masson

TMC: Articulación trapecio-metacarpiana

Wnt3a: Wingless-type family member 3a, miembro 3a de la familia del tipo sin alas

μl : Microlitro

μM: Micromolar

°C: Grado centígrado

2. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

- **Figura 1.** Estructura de una articulación sinovial. Obtenida y modificada de <https://courses.lumenlearning.com>. 1
- **Figura 2.** Representación de las capas del cartílago articular. Obtenida y modificada de (1). 2
- **Figura 3.** Representación de la destrucción del cartílago. Obtenida y modificada de (12). 3
- **Figura 4.** Articulaciones de la mano más comúnmente afectadas por la OAm. Imagen obtenida y modificada de (23). 5
- **Figura 5.** Etapas de diferenciación celular de las células madre. Obtenida y modificada de <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cell-potency-totipotent-vs-pluripotent-vs-multipotent-stem-cells-303218>. 7
- **Figura 6.** Esquema de reprogramación celular y posibles aplicaciones en Biomedicina. Obtenida y modificada de <https://www.eurostemcell.org/es/celulas-ips-y-reprogramacion-celular-como-convertir-cualquier-celula-del-cuerpo-en-una-celula-madre>. 9
- **Figura 7.** Esquema del cultivo en *feeder* (izquierda) y cultivo libre de *feeder* (derecha). Obtenida y modificada de (45). 10
- **Figura 8.** Representación esquemática de los diferentes métodos para la diferenciación condrogénica de *iPSCs*. Obtenida y modificada de (10). 12
- **Figura 9.** Esquema representativo de la técnica de *hanging drop*. Obtenida y modificada de (55). 12
- **Figura 10.** Imagen de la técnica de picar colonias (izquierda) y de la pipeta Stripper® (derecha). Obtenida y modificada de <https://fertility.coopersurgical.com/products/the-stripper/> (derecha). 18
- **Figura 11.** Esquema del cultivo de diferenciación condrogénica de las *iPSCs*. 21

- **Figura 12.** Esquema representativo del cultivo de diferenciación condrogénica de la línea TC28a2. 22
- **Figura 13.** Técnica de *hanging drop* (izquierda) y esferoides formados (derecha). 22
- **Figura 14.** NFiPS 15/637#7 (izquierda) y MOAFiPS 15/645#7 (derecha) en cultivo en *feeder*. Imágenes tomadas con un microscopio a 2x. 29
- **Figura 15.** Fotos del clon NFiPS 15/637#7 (izquierda) y del clon MOAFiPS 15/645#7 (derecha) adaptados a un sistema libre de *feeder*. Imágenes tomadas con un microscopio a 10x. 30
- **Figura 16.** Línea temporal del protocolo de diferenciación condrogénica con las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7. Imágenes tomadas con un microscopio a 10x. 30
- **Figura 17.** Línea temporal del protocolo de diferenciación condrogénica con la línea TC28a2. Imágenes tomadas con un microscopio a 10x. 31
- **Figura 18.** Esferoide formado durante el cultivo de diferenciación dirigida de la línea MOAFiPs 15/645#7. Imagen tomada a 4x. 31
- **Figura 19.** Tinción de H-E a diferentes aumentos de los esferoides formados de las diferentes líneas. 33
- **Figura 20.** Tinciones de SO, TM y AT de esferoides de la línea TC28a2 en DMEM al 10% como control positivo. 34
- **Figura 21.** Tinciones de SO, TM y AT de esferoides de la línea NFiPS 15/637#7 tras el protocolo de diferenciación dirigida. 34
- **Figura 22.** Tinciones de SO, TM y AT de esferoides de la línea MOAFiPS 15/645#7 tras el protocolo de diferenciación dirigida. .. 35
- **Figura 23.** Gráficas de los NRE del gen OCT-4 de las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 antes y después del protocolo de diferenciación dirigida. 36
- **Figura 24.** Gráficas de los NRE del gen COL-1A Y COL-10 de las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 antes y después del protocolo de diferenciación dirigida. 37

- **Figura 25.** Gráficas de los NRE del gen COL-2A de las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 antes y después del protocolo de diferenciación dirigida..... 38
- **Figura 26.** Gráficas de los NRE del gen AGG de las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 antes y después del protocolo de diferenciación dirigida..... 39
- **Figura 27.** Tinciones de SO, TM y H-E de esferoides tras la diferenciación de la línea NFiPS 15/637#7 de *EBs* espontáneos. 40
- **Figura 28.** Tinciones de SO, TM y H-E de esferoides tras la diferenciación de la línea MOAFiPS 15/645#7 de *EBs* espontáneos. 40

Tablas

- **Tabla I.** Características de las líneas de *iPSCs* utilizadas. 15
- **Tabla II.** Secuencias de los cebadores utilizados. 27
- **Tabla III.** Resultados de la valoración cualitativa de las tinciones histológicas de los controles positivos y de los esferoides formados durante las diferenciaciones condrogénicas de las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 en la placa de diferenciación dirigida y de *EBs* espontáneos: (-) Negativo o ausencia, (+) Levemente positivo o presencia débil, (++) Moderadamente positivo, (+++) Muy positivo o presencia fuerte. 35

3. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue poner a punto un protocolo de diferenciación condrogénica en líneas de células madre pluripotentes inducidas (*iPSCs*) obtenidas de pacientes con artrosis de manos (*OAm*) y un donante sano.

Las *iPSCs*, cultivadas en un medio en *feeder*, se adaptaron a un sistema libre de *feeder* compuesto por Laminina y *Stemflex*. A continuación, se evaluaron 2 protocolos: un protocolo de diferenciación condrogénica dirigida y otro con cuerpos embrionarios (*EBs*) espontáneos. Además, también se testó la formación de *EBs* mediante la técnica de *hanging drop*. Una vez transcurridas las 5 semanas de cultivo, se evaluaron las diferenciaciones de las líneas mediante tinciones histológicas de los esferoides y análisis moleculares de ARN. La línea TC28a2 fue utilizada como control positivo de la diferenciación condrogénica.

Las líneas de *iPSCs* fueron adaptadas al cultivo libre de *feeder* tras varios intentos. Tras la adaptación, se realizaron los protocolos de diferenciación obteniéndose esferoides de ambas líneas. El análisis histológico y molecular mostró diferenciación condrogénica, aunque los resultados no son concluyentes.

RESUMO

O obxectivo deste traballo foi desenrolar un protocolo de diferenciación condroxénica nas liñas de células nai pluripotentes inducidas (*iPSCs*) obtidas a partir de pacientes con artrose de mans (*OAm*) e dun doante san.

As *iPSCs*, cultivadas sobre *feeder*, adaptáronse a un sistema libre de *feeder* composto por Laminina e *Stemflex*. Posteriormente, avaliáronse dous protocolos: un protocolo de diferenciación condroxénica dirixida e outro con corpos embrionarios (*EBs*) espontáneos. Ademais, tamén se probou a formación de *EBs* usando a técnica de *hanging drop*. Despois das 5 semanas de cultivo, a diferenciación das liñas foi avaliada por tinción histolóxica dos esferoides e análise molecular do ARN. A liña TC28a2 utilizouse como control positivo da diferenciación condroxénica.

As liñas de *iPSCs* adaptáronse ao sistema libre de *feeder* tras varios intentos. Despois da adaptación, realizáronse os protocolos de diferenciación obtendo esferoides de ambas liñas. As análises histolóxicas e moleculares mostraron diferenciación condroxénica, aínda que os resultados non son concluíntes.

ABSTRACT

The aim of the present work was to develop a chondrogenic differentiation protocol for induced pluripotent stem cell lines (iPSCs) obtained from patients with hand osteoarthritis (OAm) and a healthy donor.

The iPSCs, cultured onto feeder cells, were adapted to a feeder-free system composed of Laminin and Stemflex. Then, 2 protocols were evaluated: a protocol of directed chondrogenic differentiation and another with spontaneous embryonic bodies (EBs). In addition, the formation of EBs was also tested using the hanging drop technique. After ~~the~~ 5 weeks in culture, the differentiation of the lines was evaluated by histological staining of the spheroids and RNA molecular analysis. The TC28a2 line was used as a positive control for chondrogenic differentiation.

The iPSCs lines were adapted to free feeder culture after several attempts. After the adaptation, the differentiation protocols were tested obtaining spheroids of both lines. Histological and molecular analysis showed chondrogenic differentiation, although the results are not conclusive.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Cartílago articular

El cartílago articular es un tejido conjuntivo altamente especializado localizado en las articulaciones sinoviales (Figura 1) y formado por un único elemento celular, el condrocito, embebido en una matriz extracelular (*Extracellular matrix, ECM*) sintetizada por él mismo (1,2). Su superficie lisa con un bajo coeficiente de fricción, permite un deslizamiento eficaz de los huesos durante el movimiento articular (3).

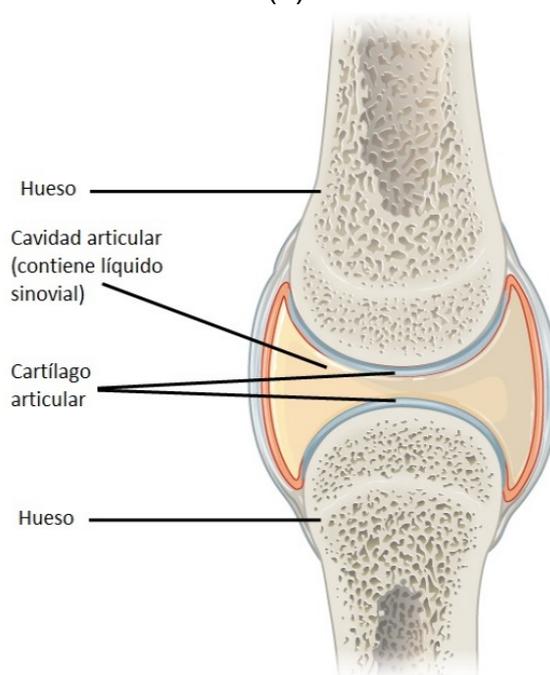


Figura 1. Estructura de una articulación sinovial. Obtenida y modificada de <https://courses.lumenlearning.com>.

El mantenimiento de la homeostasis del cartílago articular corre a cargo de los condrocitos mediante la secreción y reparación de los constituyentes de la *ECM* y enzimas que la degradan (2). Los condrocitos son las únicas células que se encuentran en el cartílago y suponen el 2% del volumen del mismo. Además su forma, número y tamaño varían en función de la zona del cartílago en la que se encuentren (4).

La *ECM* está formada por una red de fibras de colágeno, agua (H_2O) y proteoglicanos (PGs), asociados con otras proteínas no colagénicas y glicoproteínas en menores cantidades, embebidos en una sustancia viscosa de carácter básico (4,5).

En los seres humanos, el colágeno tipo II (Col-2) es la principal proteína que forma la *ECM* del cartílago y la que le confiere resistencia a las fuerzas de tensión (6). El H₂O es otro de sus componentes principales, constituyendo entre un 70-80 % del cartílago, lo que le confiere resistencia a la compresión. El agregano (*Aggrecan, AGG*) y los PGs, gracias a las cadenas de queratín sulfato y condroitín sulfato de su estructura que les confiere carga negativa, son los encargados de atraer el H₂O hacia la *ECM* (2,7).

Esta composición única hace que sea resistente tanto a la compresión como a la tracción (7), peculiares características que permiten el movimiento del hueso y la amortiguación de los golpes.

El cartílago articular está diferenciado en 4 zonas con estructura y funciones únicas que se denominan zona superficial, zona media, zona profunda y zona calcificada (Figura 2) (2). Las fibras de colágeno están orientadas de manera distinta dependiendo de la zona en la que se encuentren. En la zona superficial, las fibras de colágeno se sitúan con orientación paralela, mientras que en zona media de manera aleatoria y finalmente, en la zona profunda, con orientación vertical. La línea de calcificación o *tidemark* separa la zona profunda de la zona calcificada, que se sitúa por encima del hueso subcondral (5).

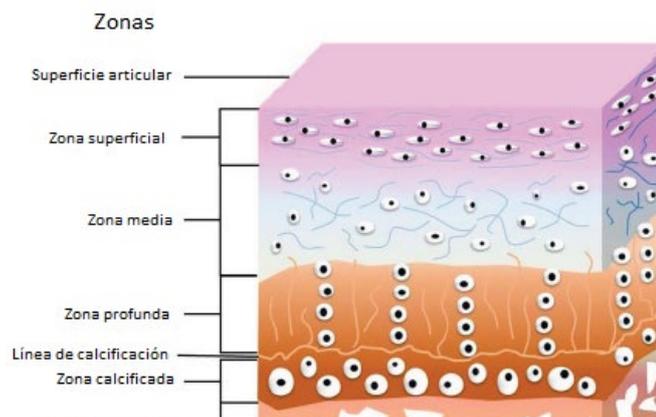


Figura 2. Representación de las capas del cartílago articular. Obtenida y modificada de (1).

El cartílago hialino se caracteriza por ser un tejido avascular y aneural, con limitada capacidad de reparación de sí mismo además de ser sensible a los daños erosivos producidos en las articulaciones, debidos a la edad y a las lesiones (2,8,9). Su avascularidad junto con unos condrocitos con baja capacidad de proliferación limitan su capacidad de regeneración en caso de

lesión (6,10). Por otro lado, el cartílago presenta una serie de mecanismos para distribuir y disipar la energía, que permiten mantener una estabilidad y funcionalidad bajo unas condiciones extremas protegiendo la estructura de la articulación (11). Si estos mecanismos no funcionan correctamente, la carga mecánica que soportan las articulaciones puede acelerar la degeneración articular, dando lugar a la aparición de enfermedades, como la artrosis (*Osteoarthritis*, OA) (10).

4.2. Artrosis

La OA es un trastorno complejo de causa heterogénea caracterizado por la pérdida localizada de cartílago, la remodelación del hueso adyacente e inflamación asociada (Figura 3). Esta enfermedad está caracterizada por estrés celular y degradación de la *ECM*, iniciado por micro- o macrolesiones que activa respuestas inadaptadas de reparación entre las que se incluyen vías proinflamatorias de inmunidad innata. La OA se manifiesta primero como un trastorno molecular seguido de trastornos anatómicos y/o fisiológicos que pueden culminar en el desarrollo de la dolencia (12).

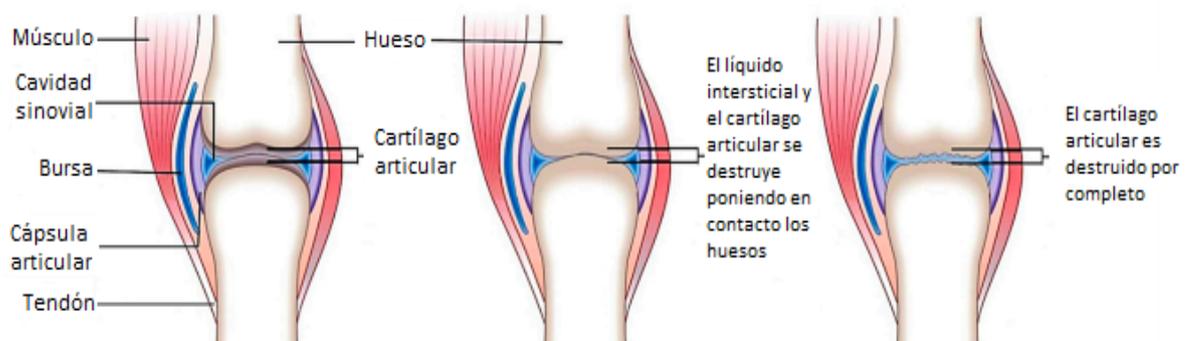


Figura 3. Representación de la destrucción del cartílago. Obtenida y modificada de (12).

Esta enfermedad articular, una de las más comunes en el mundo, provoca enormes costes en los presupuestos destinados a salud de los países (7,12–15); siendo la primera causa de incapacidad laboral permanente y la más frecuente en personas de edad avanzada (16).

La articulación de la cadera, de las rodillas, de la columna y de las manos son las primeras articulaciones en verse afectadas por la OA (17). Según el estudio EPISER, la prevalencia de artrosis sintomática (no confirmada

radiológicamente) en España, en mayores de 20 años, es del 10,2% en la rodilla y del 6,2% en las manos (18).

La OA está caracterizada por dolor articular y reducción en la movilidad asociado a una rigidez y endurecimiento de la zona (12,17). Los síntomas de esta enfermedad pueden aparecer antes de ser diagnosticada mediante técnicas radiográficas (17).

La edad, la obesidad, la genética, el sexo, los traumatismos o el tipo de profesión son considerados factores de riesgo en el desarrollo de la enfermedad (7,14,19). En concreto, la edad es un factor de riesgo que está íntimamente relacionado con el desarrollo de la OA. Este factor se relaciona con la existencia de cambios anatómicos, bioquímicos y estructurales que provocarían la degeneración del cartílago en las personas de avanzada edad (20).

A día de hoy, el tratamiento para esta afección consiste en aliviar el dolor y la inflamación con el empleo de fármacos que controlan los síntomas, pero en caso de OA avanzada se recurre a reemplazar quirúrgicamente la articulación. Esa solución no es permanente y poco recomendable para pacientes jóvenes, ya que las prótesis tienen una vida media de 10 a 15 años, por lo que es conveniente la búsqueda alternativa de nuevas terapias regenerativas para la reparación articular (8,21).

4.2.1. Artrosis de mano

La OA de manos (OAm) es uno de los tipos de OA más comunes en países desarrollados, afectando a la calidad de vida, al impedir la realización de actividades cotidianas (22,23).

El cartílago de las articulaciones de los dedos se destruye, provocando dolor, rigidez y deformidades en la mano que dificultan su movimiento (1,23). Al igual que otras formas de OA, la OAm se caracteriza por la formación de osteofitos, por un estrechamiento del espacio articular, por la degradación del cartílago y la formación de quistes subcondrales (23).

La clasificación de la OAm varía en función de los criterios considerados, definiéndose de 3 formas diferentes: (a) según los criterios clínicos del Colegio Americano de Reumatología (*American College of Rheumatology, ACR*) se define como OAm clínica; (b) según la presencia de OA detectada por técnicas de imagen se define como OAm radiográfica; y (c) según la presencia de dolor se define como OAm sintomática (23).

Este tipo de OA afecta a diferentes articulaciones de la mano, principalmente a las articulaciones trapecio-metacarpianas (TMC) del pulgar, las articulaciones interfalángicas proximales (IPs) y las articulaciones interfalángicas distales (IDs) (17); siendo común la presencia de OA en varias de estas articulaciones (23). En la figura 4, se muestran las articulaciones de los dedos de la mano más comúnmente afectadas por esta patología.

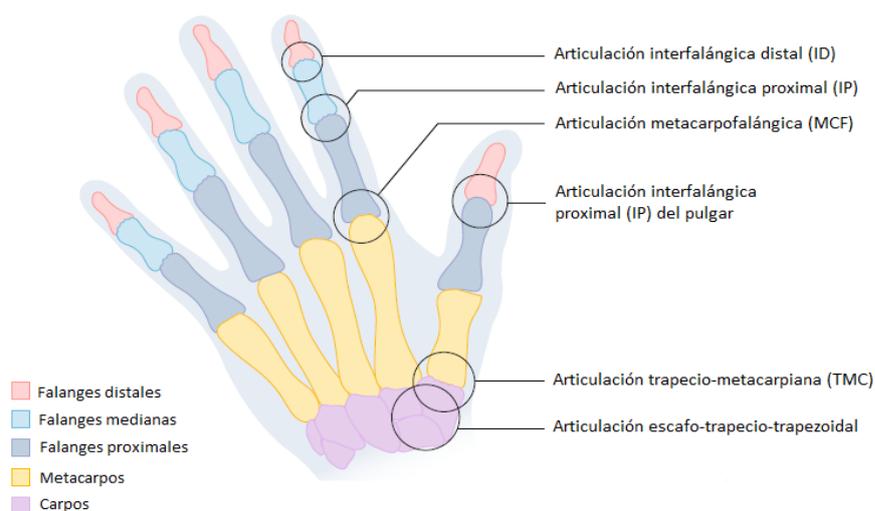


Figura 4. Articulaciones de la mano más comúnmente afectadas por la OAm. Imagen obtenida y modificada de (23).

Las articulaciones IDs son las articulaciones de los dedos más afectadas por la OAm y se caracteriza por la aparición de deformaciones o engrosamientos en las mismas que reciben el nombre de nódulos de Heberden (23,24). La OAm en las articulaciones IPs es menos frecuente y menos incapacitante, aunque su aparición se asocia en un 30% con la OAm en las articulaciones IDs. También aparecen deformaciones en las articulaciones afectadas denominadas nódulos de Bouchard (24).

La OAm en la articulación TMC, que recibe el nombre de rizartrrosis, es común en mujeres mayores de 50 años, siendo menos prevalente en hombres de la misma edad (24). Este tipo de OAm afecta a la base del pulgar y se caracteriza por un dolor mecánico, con una prevalencia mayor en la mano dominante (23,24).

La etiología de la OAm es desconocida, siendo de origen multifactorial, pero existe un componente mecánico importante, ya que a menudo aparece en la mano dominante (24), además de un componente hereditario que predispone a las personas a padecer la enfermedad, especialmente a las mujeres (22,23). Al igual que con la OA del resto de articulaciones, no existe un tratamiento curativo si no que los síntomas se tratan con fármacos que reducen el dolor sin posibilidad de reemplazo protésico.

4.3. Células madre

4.3.1. Clasificación de las células madre

Las células madre son células no especializadas con capacidad para diferenciarse en cualquier tipo celular y de renovarse, que existen tanto en adultos como en embriones (25,26). Las células madre pueden tener un origen adulto, denominadas células madre adultas (*Adult Stem Cells, ASC*), o un origen embrionario, denominadas células madre embrionarias (*Embryonic Stem Cells, ESC*) (27).

Además, en función de su origen, las células madre también pueden ser clasificadas de acuerdo a su potencia celular, es decir, su capacidad para diferenciarse en los diferentes tipos de células. En base a esto, se distinguen células madre totipotentes, pluripotentes (*Pluripotent Stem Cells, PSCs*) y multipotentes (27). En la figura 5 se representa de manera esquemática, las diferentes etapas de diferenciación de las células madre.

Las células madre totipotentes son aquellas que provienen de las dos primeras divisiones del cigoto y son capaces de dividirse en tejidos tanto embrionarios como extraembrionarios. Tras varias divisiones del cigoto, en el estadio de blástula, se origina la masa celular interna. Las células de esta masa celular interna son células madre pluripotentes, ya que pierden la

capacidad de división a tejidos extraembrionarios, pero mantienen su capacidad para diferenciarse en los tres linajes celulares: ectodermo, endodermo y mesodermo; y que, por tanto, darán lugar al embrión. Una vez estas células se diferencien hacia un linaje determinado su potencialidad disminuye, dando lugar a células multipotentes, es decir, con capacidad para diferenciarse en células de ese mismo linaje (27,28).

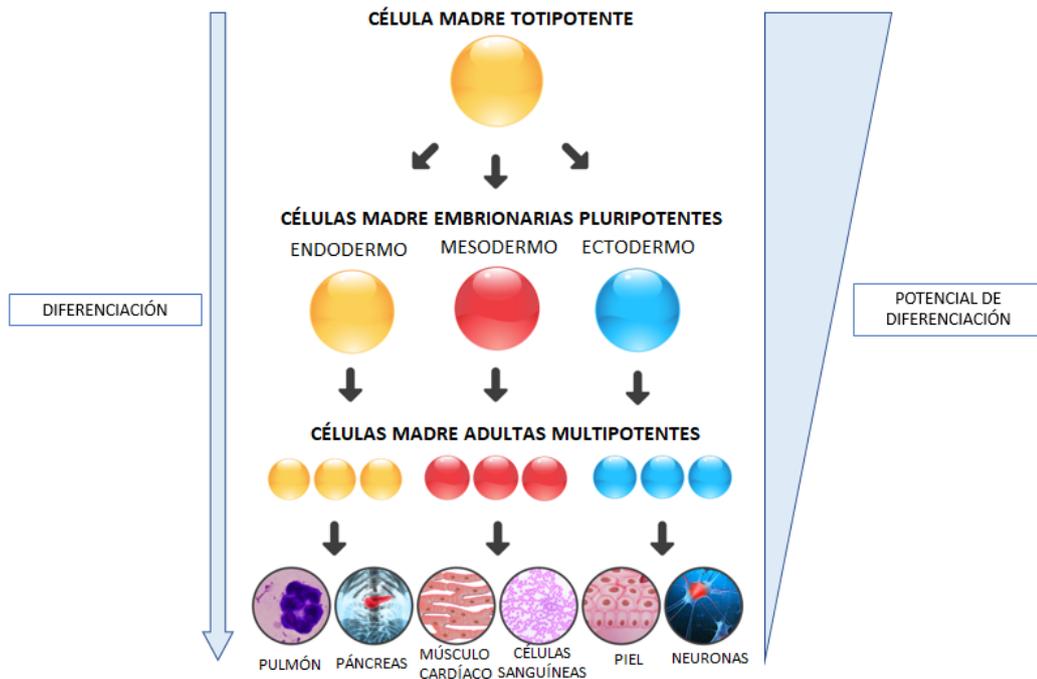


Figura 5. Etapas de diferenciación celular de las células madre. Obtenida y modificada de <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cell-potency-totipotent-vs-pluripotent-vs-multipotent-stem-cells-303218>.

4.3.2. Células madre pluripotentes o PSCs

Los 3 aspectos clave que definen a las *PSCs* son (a) su potencial de desarrollo para diferenciarse en cualquier tipo celular, (b) su capacidad de proliferación indefinida y (c) su clonalidad, es decir, su capacidad de generar un individuo a partir de una única célula (27,29).

Estas células están siendo investigadas no sólo por su potencial regenerador, si no por la cantidad de información que dan sobre el desarrollo humano (29); además de su relativa abundancia (25).

Debido al difícil acceso de las *ASCs* y de la hipertrofia de las células mesenquimales estromales (*MSCs*) durante su expansión (30), junto con su

método de recolección invasivo y el bajo rendimiento celular (10), las *PSCs* han creado nuevas perspectivas por su capacidad de autorenovación y de diferenciación en cualquier tipo celular para su uso en el modelado de enfermedades, el testado de fármacos y la terapia celular (10,27,31–33). La investigación con *ESC* humanas (*hESCs*), ha permitido obtener información más precisa sobre el desarrollo humano, además de permitir obtener otros tipos celulares, como cardiomiocitos o neuronas, que son difíciles de conseguir (29). Sin embargo, el uso de las *hESCs* está restringido por aspectos éticos y legales, ya que proceden de la masa celular interna del embrión (26) y su uso supone la destrucción del mismo. Una alternativa al uso de *hESCs* es la reprogramación de células adultas diferenciadas para obtener células pluripotentes, denominadas células madre pluripotentes inducidas (*Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs*) (32).

4.3.3. Células madre pluripotentes inducidas o *iPSCs*

4.3.3.1. Origen y características de las *iPSCs*

Las *iPSCs* son un tipo de células madre con características pluripotenciales generadas por primera vez por Yamanaka y colaboradores a partir de fibroblastos de ratón (34) y a partir de fibroblastos humanos (35).

Estas células fueron generadas artificialmente a partir de una célula que inicialmente no era pluripotente (célula somática) por un proceso llamado reprogramación celular, mediante la introducción de cuatro factores de transcripción conocidos comúnmente como factores de Yamanaka o factores OSKM: *Octamer-binding transcription factor 4 (Oct4)*, *Krüppel-like factor 4 (Klf4)*, *sex determining region Y-box 2 (Sox2)* y *cellular Myc (c-Myc)* (34,35). Las *iPSCs* tienen capacidad de renovación de sí mismas y de diferenciarse en los tres linajes embrionarios (ectodermo, endodermo y mesodermo) (10,36). Además, tal y como se mencionó anteriormente, carecen de las restricciones éticas asociadas a la utilización de *hESCs* (33,36).

Se han obtenido de diferentes tipos celulares, aunque es más común su reprogramación a partir de células más accesibles como fibroblastos o células sanguíneas (10).

La generación de células *iPSCs* depende de que se utilicen los genes adecuados para la inducción de la reprogramación (25). Principalmente, los sistemas para introducir dichos factores se clasifican según su origen viral, en vectores virales o no virales, o por su integración en el genoma, en sistema integrativos o no integrativos. Los diferentes sistemas utilizados presentan niveles de eficacia en el proceso de reprogramación, en seguridad o en nivel de trabajo muy diferentes (37). La figura 6 muestra un esquema del proceso de reprogramación de *iPSCs* y sus posibles aplicaciones en Biomedicina.

Aunque se han obtenido *iPSCs* mediante la reprogramación de muchos tipos de células somáticas, la eficiencia de reprogramación es relativamente baja (38), entre un 0.1–1.5% en vectores integrativos, y entre 0.001–0.0001% en vectores no integrativos (39).

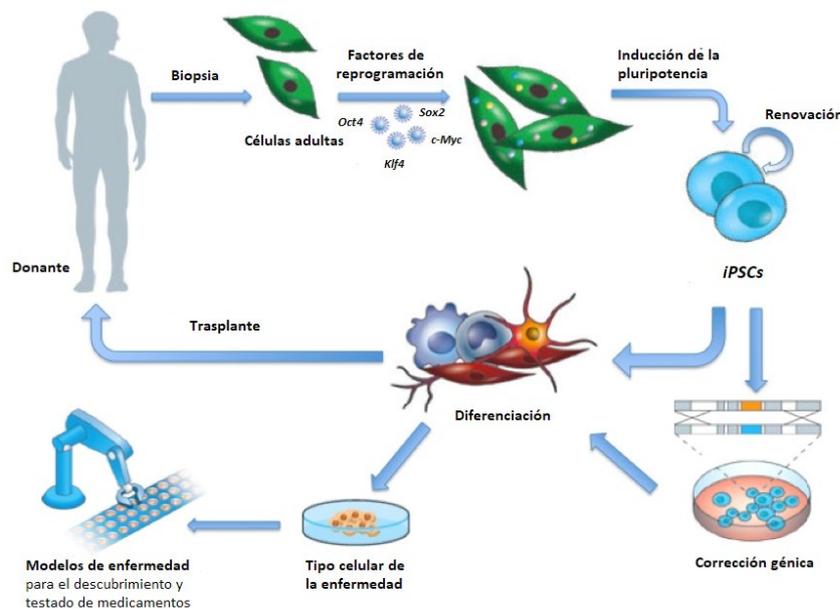


Figura 6. Esquema de reprogramación celular y posibles aplicaciones en Biomedicina. Obtenida y modificada de <https://www.eurostemcell.org/es/celulas-ips-y-reprogramacion-celular-como-convertir-cualquier-celula-del-cuerpo-en-una-celula-madre>.

4.3.3.2. Cultivo de las *iPSCs*

Establecer las condiciones óptimas para el cultivo de las *iPSCs* es fundamental para mantener la pluripotencia de las mismas y un buen estado

de la línea celular, siendo necesario un cambio de medio diario y subcultivos frecuentes para evitar la diferenciación de las células (40,41).

Los cultivos de *iPSCs* se clasifican en sistemas de cultivo en *feeder*, basados en el uso de células alimentadoras, o sistemas de cultivo libres de *feeder* (41), ambos representados en la figura 7.

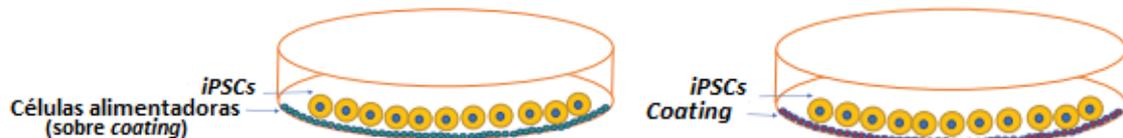


Figura 7. Esquema del cultivo en *feeder* (izquierda) y cultivo libre de *feeder* (derecha).

Obtenida y modificada de (45).

El sistema en *feeder* se basa en el uso de fibroblastos con el ciclo celular inactivado que proporcionan al medio nutrientes y factores de crecimiento que necesitan las *iPSCs* para mantener la pluripotencia. El cultivo tradicional en *feeder* se realizaba sobre fibroblastos de ratón, pero para evitar contaminaciones de productos animales, se comenzaron a usar fibroblastos humanos (42,43). Por el contrario, en los sistemas libres de *feeder*, el medio se suplementa con factores de crecimiento y proteínas que permiten compensar la ausencia de las células alimentadoras (43).

Los sistemas sin *feeder* fueron desarrollados para superar las limitaciones asociadas al cultivo en *feeder* y poder realizar técnicas moleculares sin la presencia de otro tipo celular (41). Cabe destacar que la transición del cultivo en *feeder* al cultivo libre de *feeder* supone un paso crítico para las *iPSCs* (44).

4.3.3.3. Uso de las *iPSCs* en el modelado de enfermedades

El estudio actual de muchas enfermedades humanas se logra mediante el uso de modelos de animales y líneas celulares que se parecen al comportamiento de ciertos tipos de células. Las *PSCs* tienen la ventaja de tener la capacidad de crear modelos de enfermedad más precisos, ya que se pueden diferenciar hacia la célula humana específica afectada por la enfermedad que estás estudiando, proporcionando así información sobre la base molecular de la enfermedad (27,45,46).

La versatilidad de las *iPSCs* hace que sean un recurso valioso en el modelado de enfermedades humanas *in vitro*. Estos modelos permiten una comprensión más profunda de la patogenia de las enfermedades (47).

Previamente al descubrimiento de las *iPSCs*, los estudios de enfermedades se limitaban a modelar la enfermedad en animales (47). Aunque los modelos animales proporcionan información sobre los mecanismos moleculares de las enfermedades, estos sistemas tienen limitaciones debido a que la anatomía y fisiología entre animales y seres humanos no siempre es similar (46).

Para establecer modelos de enfermedad es necesario generar *iPSCs* a partir de las células somáticas de un paciente y diferenciar esas *iPSCs* hacia el tipo de célula afectada por la enfermedad de interés (46).

Hoy en día, las células específicas de la enfermedad de un paciente se reprograman para generar *iPSCs* y se diferencian en una placa Petri hacia el tipo celular deseado (47), proporcionando información sobre las bases moleculares de la enfermedad de estudio, como la OA. Es por ello, que las *iPSCs* constituyen una herramienta con gran potencial en el modelado celular *in vitro* de la OA.

4.4. Diferenciación condrogénica

Tal y como se mencionó anteriormente, las *iPSCs* deben poder diferenciarse en el tipo celular deseado para ser útiles en el modelado de enfermedades y en terapia celular. (29). Para el estudio de la OA, se debe poder conseguir una buena diferenciación condrogénica de las *iPSCs*.

Se distinguen 3 métodos para la diferenciación condrogénica de *iPSCs*, como se muestra en la figura 8: (a) el co-cultivo con condrocitos, (b) la formación de cuerpos embrionarios (*embryoid bodies, EBs*), y (c) la diferenciación dirigida con medio suplementado con factores de crecimiento (10).

Durante el co-cultivo, los condrocitos secretan factores que estimulan la diferenciación de las *iPSCs* a condrocitos (48). En contraposición, el co-cultivo incrementa el riesgo de contaminación con células no deseadas en las células diferenciadas (49).

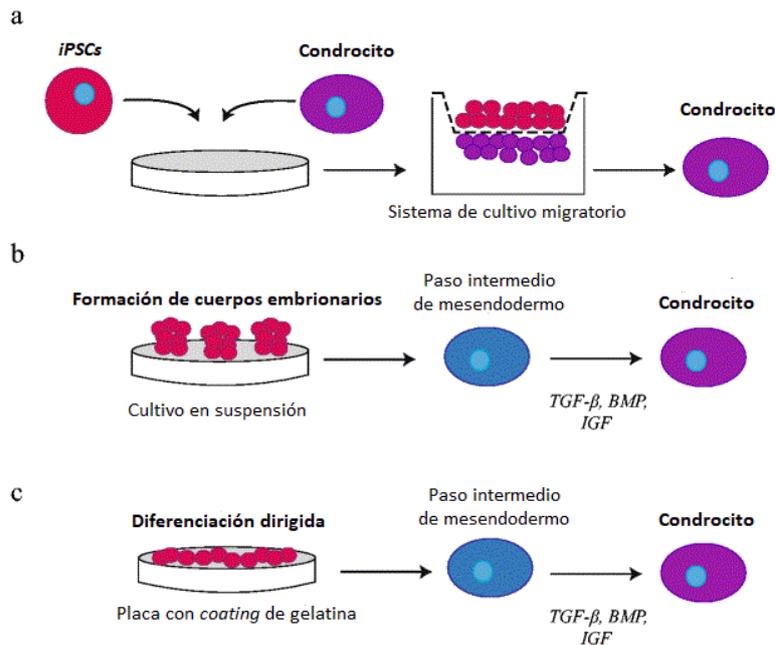


Figura 8. Representación esquemática de los diferentes métodos para la diferenciación condrogénica de iPSCs. Obtenida y modificada de (10).

El sistema de diferenciación basado en la formación de *EBs* es el método que más se utiliza (25). Para llevar a cabo la formación de *EBs* existen diferentes métodos, aunque uno de los más utilizados es la técnica de la gota colgante o *hanging drop*, representada en la figura 9, basada en la formación de agregados tridimensionales mediante el cultivo en gotas situadas en una placa Petri. Este método favorece la cohesividad celular mediante la agregación de las células por acción de la gravedad para formar *EBs* (50).

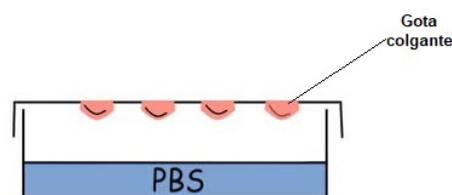


Figura 9. Esquema representativo de la técnica de *hanging drop*. Obtenida y modificada de (55).

La diferenciación dirigida de iPSCs hacia condrocitos es un método no tan extendido como el co-cultivo o la formación de *EBs*, pero que se asemeja más a la diferenciación condrogénica de las *PSCs* (10) ya que trata de reproducir los eventos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario. La diferenciación de los condrocitos está regulada por múltiples vías de transducción de señales para lo que es necesario la adición de moléculas de

señalización, como las proteínas morfogenéticas óseas (*Bone morphogenic proteins, BMP*), los factores de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor, FGF*), el factor de crecimiento transformante beta (*Transforming growth factor- β , TGF- β*), *Wnt* y moléculas de adhesión celular (N-CAM, N-cadherina, b-catenina) (51). Además, la adición de moléculas como el *Rock Inhibitor (RI)* está asociada con el aumento de la síntesis de glicosaminoglicanos (GAGs) en condrocitos diferenciados (52). En este sentido, los medios de cultivo utilizados para estimular la diferenciación condrogénica de las *iPSCs* a menudo se suplementan con distintos factores de crecimiento, como *TGF- β* ; *BMPs* y *FGF*. (25,53), los cuales inducen a las células a que se diferencien hacia condrocitos (53–55).

En los últimos años se han desarrollado numerosos protocolos para estimular la diferenciación condrogénica de las *iPSCs* (5). A pesar de esto, las investigaciones sobre la *OA* se han visto limitadas debido a la ineficiencia y a la complejidad de los actuales protocolos de diferenciación condrogénica (61), siendo muy pocos los estudios que han obtenido buenos resultados (49,62). Es por ello que resulta extremadamente importante desarrollar un protocolo de diferenciación condrogénica de las *iPSCs* que permita superar las limitaciones asociadas a las actuales estrategias, con el fin de obtener una condrogénesis robusta que facilite utilizar de manera eficiente las células *iPSCs* como modelos celulares de *OAm*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha consistido en poner a punto un protocolo de diferenciación condrogénica de células madre pluripotentes inducidas (*iPSCs*) obtenidas de pacientes con artrosis de manos (*OAm*) y una donante normal, con el fin último de que puedan utilizarse en el modelado *in vitro* de la *OAm*.

5.2. Objetivos específicos

1. Adaptar las líneas de células madre pluripotentes inducidas de *OAm* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 a un cultivo libre de *feeder*.
2. Estimular la diferenciación condrogénica de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 utilizando distintos protocolos de diferenciación.
3. Analizar la diferenciación condrogénica de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 mediante técnicas histológicas y de biología molecular.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Líneas celulares

6.1.1. Líneas celulares de iPSCs

Las iPSCs utilizadas para llevar a cabo los experimentos se corresponden con dos líneas generadas previamente por el grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de La Coruña (56). Estas líneas fueron generadas tras la reprogramación de fibroblastos dermales mediante la utilización de vectores derivados del virus Sendai, un sistema no integrativo, y los factores de reprogramación *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*.

Los fibroblastos dermales fueron obtenidos a partir de biopsias de piel de 3 mm de diámetro de una donante que no presentaba patologías artrósicas y/o artríticas, comprobado mediante radiografía, y una paciente que presentaba OAm no erosiva y rizartrrosis bilateral, ambas mujeres.

En la tabla I se resumen las características de las líneas empleadas en este estudio.

Tabla I. Características de las líneas de iPSCs utilizadas.

Nombre de la línea	Sexo	Edad	Etnia	Patología
NFiPS 15/637 #7	Mujer	44	Caucásica	Sin patología artrósica ni artrítica
MOAFiPS 15/645 #7	Mujer	52	Caucásica	OAm no erosiva y rizartrrosis unilateral derecha

6.1.2. Línea celular de TC28a2

La línea TC28a2 es una línea celular inmortalizada de condrocitos de cartílago costal de una mujer de 15 años. Se obtuvo mediante la transfección del antígeno T *Simian Vaculating Virus 40* (SV40- T Ag) tras 5 días de cultivo primario (57). En el presente trabajo, esta línea fue utilizada como control positivo de la diferenciación condrogénica.

Protocolo de diferenciación condrogénica en iPSCs de pacientes con OAm y un donante sano

6.2. Cultivo celular

El cultivo de las células empleadas en este trabajo se llevó a cabo en el área de Cultivo Celular del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). La siembra y manipulación se llevó a cabo bajo condiciones estériles en una cámara de flujo laminar.

6.2.1. Cultivo de iPSCs

6.2.1.1. Cultivo en *feeder*

Las iPSCs se cultivaron en placas adherentes de 6 pocillos (*Corning*®, España) con 2 ml de medio *human Embryonic Stem (hES)* sobre una capa de células *feeder*. El medio *hES* se preparó en el laboratorio a partir de 384,5 ml *KnockOut-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (KnockOut-DMEM, Gibco™, España)*; 100 ml *KnockOut-SERUM (Gibco™)*; 5 ml *Glutamax (Gibco™)*; 5 ml de penicilina y estreptomicina (*P/E, Gibco™*); 5 ml *Minimum Essential Medium-Non Essential Amino Acids Solution (MEM NEAA, Gibco™)*; 0,5 ml *b-Mercaptoetanol (Gibco™)* y 50 µl *Fibroblast Growth Factor (FGFb, Gibco™)*. Los cambios de medio se realizaron cada 24 horas.

6.2.1.1.1. Siembra de capa de *feeder*

Previamente a realizar la siembra de las células *feeder*, las placas de cultivo se prepararon con un *coating* de *Matrigel® Matrix (Corning®)*, incubándolas durante 1 hora a temperatura ambiente.

Como fuente de células alimentadoras se utilizó la línea celular de fibroblastos de prepucio humano (*human foreskin fibroblasts, HFF*; ref. CRL2429, ATCC, EEUU) irradiados con el fin de detener su ciclo celular y su división. Estas células enriquecen el medio de cultivo con factores de crecimiento secretados por ellas mismas que permiten que las iPSCs mantengan su pluripotencia.

6.2.1.1.2. Inactivación del ciclo celular de las HFF

Con el objetivo de aumentar el área de cultivo y el número de células para poder realizar la expansión e irradiación de las células *HFF*, se realizaron sucesivos subcultivos de las mismas. Para ello, las células se sembraron en placas de 150 cm² (*Corning®*) en medio de cultivo compuesto por *Iscove's*

Modified Dulbecco's Media (IMDM, Gibco™), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF, *Gibco™*) y un 1% de P/E. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 100%, se extrajo el medio *IMDM* y se lavaron las células, dos veces, con tampón *Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Oxoid, Inglaterra)*. A continuación, las células se levantaron añadiendo 1 ml de *Trypsina-Ethylene Diamine Tetraacetic Acid 0,05% (Trypsina-EDTA, Gibco™)* y se incubaron durante 2-3 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, con ayuda de un microscopio invertido IX51 (*Olympus España S.A., España*), se comprobó que las células ya no estaban adheridas a la placa. A continuación, se inactivó la tripsina y se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en un volumen de medio de cultivo suficiente para sembrar las células en una mayor superficie de cultivo.

Las células se introdujeron en una estufa y se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 2-3 días. Una vez alcanzaron la confluencia necesaria se repitió el procedimiento para aumentar el área de cultivo hasta obtener unos 20-30 millones de células, momento en el cual las células se levantaron, tal y como se describió anteriormente. Se recogieron en un tubo Falcon de 50 ml, el cual se irradió en el Centro Oncológico de Galicia siguiendo un protocolo de irradiación puesto a punto previamente por el grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa (56). Las células *HFF* fueron irradiadas en un acelerador lineal *Variat Unique* a una dosis de 75 Gy. Una vez irradiadas, las células se contaron con ayuda de una cámara *Neubauer (Paul Marienfeld GmbH & Co, Alemania)* y se repartieron en tubos *Eppendorf (Eppendorf®, España)* de 1,5 ml con 2 millones de células en cada uno, los cuales se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para ser utilizadas como células alimentadoras, las células *HFF* irradiadas se sembraron 2 días antes de sembrar las *iPSCs*.

6.2.1.1.3. Siembra de *iPSCs*

Transcurridos 2 días desde la siembra de las *feeder*, se reemplazó el medio de las placas con *feeder* por nuevo medio *hES*.

Una vez que las colonias alcanzaron un tamaño adecuado, se recogieron 6-7 colonias en pequeños fragmentos con ayuda de una pipeta *Stripper*[®] (*Grupo Global Med*, España) con sus puntas capilar (*Gynetics*, Bélgica) bajo una lupa Nikon SMZ745T y se depositaron en un pocillo con la capa de células alimentadoras sembradas previamente. En la figura 10, se representa la técnica de picar colonias y una foto de la pipeta *Stripper*[®].

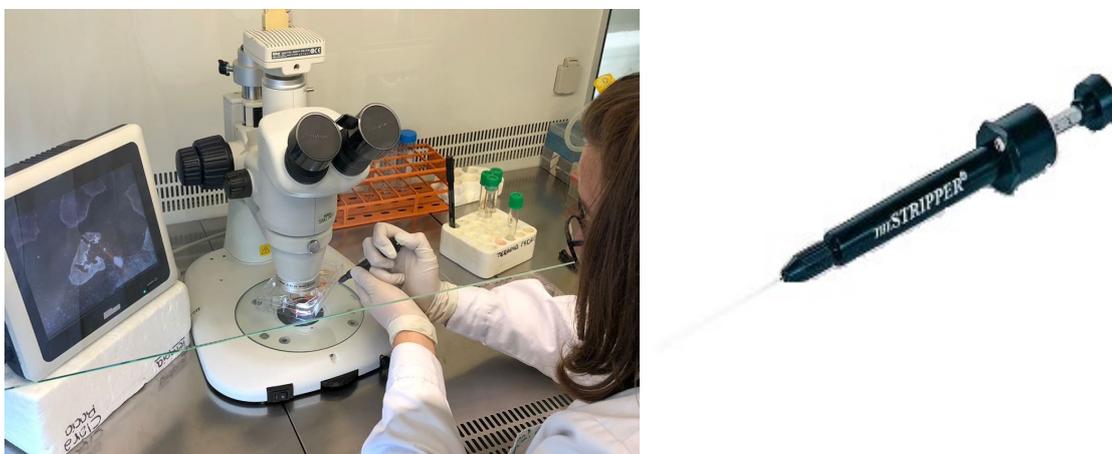


Figura 10. Imagen de la técnica de picar colonias (izquierda) y de la pipeta *Stripper*[®] (derecha). Obtenida y modificada de <https://fertility.coopersurgical.com/products/the-stripper/> (derecha).

Una vez sembradas las células, se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 7 días hasta que alcanzaron el tamaño y la confluencia adecuada, momento en el que se repitió el mismo procedimiento. Los cambios de medio se realizaron diariamente, excepto el día después de su siembra.

6.2.2. Cultivo libre de *feeder*

Para poder realizar los experimentos, es necesario crecer las células en ausencia de células alimentadoras. Para ello, las *iPSCs* se adaptaron a un sistema libre de *feeder* basado en la utilización de una matriz de laminina recombinante humana o *Recombinant Human Laminin-521* (*rhLaminin-521*, *Gibco*TM) y el medio de cultivo *Stemflex* (*Gibco*TM).

La laminina se diluyó con una proporción de 1:40 en *DPBS* con calcio y magnesio siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La mezcla se añadió a los pocillos y se dejó polimerizar toda la noche a 4°C o, análogamente, durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, se retiró la laminina y se añadieron 2 ml de medio *Stemflex*. Para llevar a cabo la adaptación de las *iPSCs*, las células se picaron como se describió previamente y se depositaron en los pocillos con el *coating* de laminina. Durante los 3-4 primeros pases se añadieron 10 µl de *Revitacell™ Supplement (Gibco™)* al medio de cultivo para evitar la apoptosis y facilitar así la adaptación de las células.

Tras haber realizado 3-4 pases de manera manual y una vez adaptadas al sistema libre de *feeder*, las *iPSCs* se levantaron de manera enzimática cuando las colonias alcanzaron una confluencia del 80%. Para ello, se retiró el medio de las placas y se lavaron los pocillos dos veces con *DPBS*, para, posteriormente, añadir la enzima *Versene Solution (Gibco™)*, la cual se dejó actuar durante 2-3 minutos a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se comprobó al microscopio que los bordes de las colonias se encontraban levantados y que se observaban huecos entre el césped de células. En ese momento se retiró la enzima y se añadieron 2 ml de medio de cultivo *StemFlex* para lavar los pocillos y recoger los fragmentos de colonias. Las células se sembraron en proporción 1:2 para aumentar el área de cultivo y se mantuvieron en una estufa a 37°C con un 5% de CO₂ y humedad a saturación realizando cambios de medio *Stemflex* diariamente.

6.2.3. Cultivo de la línea TC28a2

La línea T/C28a2 se cultivó en medio *DMEM (Gibco™)* suplementado al 10% con SBF y realizando cambios de medio cada 2-3 días. Para aumentar el área de cultivo y conseguir el número suficiente de células para llevar a cabo los experimentos las células se levantaron cuando alcanzaron una confluencia del 80%. Para ello la línea de TC28a2 se levantó con ayuda de *Tripsina 2x (Sigma Aldrich Química S.A., España)* y se sembraron en una proporción 1:5.

6.3. Diferenciación condrogénica

Para estimular la diferenciación condrogénica de las líneas de *iPSCs* se testaron dos protocolos de diferenciación:

- Condrogénesis dirigida, basada en la adición de factores de crecimiento.
- Cultivo de los *EBs* espontáneos formados durante el cultivo libre de *feeder*.

Además, en el protocolo de condrogénesis dirigida se incluyó una formación forzada de *EBs* mediante la técnica de *hanging drop* en ambas líneas de *iPSCs* y TC28a2.

En todos los casos se recogieron las células *iPSCs* y TC28a2 antes de comenzar el proceso de diferenciación (tiempo cero, T0) y se almacenaron a modo de *pellet* seco a -20°C para llevar a cabo su posterior análisis mediante técnicas de biología molecular.

6.3.1. Cultivo de las *iPSCs* para la condrogénesis dirigida

Para estimular la diferenciación condrogénica dirigida de las células *iPSCs* se llevó a cabo un protocolo previamente establecido por Yamashita y colaboradores (53), con modificaciones. Este protocolo se basa en reproducir los estadios observados durante el desarrollo embrionario mediante la adición al medio de cultivo de distintos factores de crecimiento.

Para llevar a cabo este protocolo de diferenciación las células *iPSCs* se cultivaron en sistema sin *feeder* tal y como se describió anteriormente. Cuando la confluencia celular fue del 50% se inició el protocolo de diferenciación mediante la sustitución del medio de cultivo *Stemflex* por medio de diferenciación hacia el linaje mesendodérmico. Este medio estaba compuesto por *DMEM/F12* (*Gibco*TM) suplementado al 1% con SBF, 1 % con Insulina-Transferrina-Selenio (ITS, *Gibco*TM), 1% de P/E, 10 ng/μl de *Wingless-type family member 3a* (*Wnt3a*, *R&D Systems*, EEUU) y 10 ng/μl de Activina A (*StemCell*TM *Technologies*, Francia). Transcurridos 3 días en dicho medio, éste se substituyó por medio de diferenciación condrogénico, el cual estaba compuesto por *DMEM* (*Gibco*TM) suplementado al 1% con SBF, 1 % con ITS, 1% de P/E, 50 ng/μl de Ácido Ascórbico (AA), 10 ng/μl de *BMP-2* (*Gibco*TM), 10 ng/μl del factor de crecimiento/diferenciación 5 (*GDF-5*, *R&D*

Systems), 10 ng/μl de *TGF-β1* (ProSpect-Tany Technogene Ltd., Israel) y 10 ng/μl de *FGF-β*. Las células se cultivaron en medio condrogénico durante 35 días realizando cambios de medio cada 2 días.

Tras 2 semanas de cultivo en monocapa, las células se agregan formando unas estructuras denominadas esferoides que se mantuvieron en cultivo en suspensión durante 3 semanas más en medio condrogénico. Transcurrido ese tiempo, los esferoides, así como las células que continuaban adheridas a la placa se recogieron para llevar a cabo análisis histológicos y de biología molecular.

Con el fin de mejorar la supervivencia celular, se testó una transición gradual del medio de cultivo. Esta transición gradual consistió en realizar, en primer lugar, una substitución del medio de cultivo *Stemflex* por un medio de cultivo compuesto por 50% de medio de cultivo de diferenciación hacia mesendodermo y 50% de medio de cultivo *Stemflex*. Transcurridos dos días, se substituyó medio de cultivo por el medio de mesendodermo descrito previamente. La transición hacia el medio de diferenciación condrogénico se realizó del mismo modo, empleando primero un medio compuesto por 50% de medio de diferenciación hacia mesendodermo y 50% de medio condrogénico. Transcurridos dos días, dicho medio se substituyó por el medio condrogénico descrito anteriormente.

Además, se añadió 1 μl por ml de medio de *Rock Inhibitor* (*RI*, *Reprocell*, EEUU), un inhibidor de la apoptosis y se utilizó *DMEM/F12* como medio basal en substitución del *DMEM*. El protocolo de diferenciación condrogénica de las *iPSCs* está representado en la figura 11.

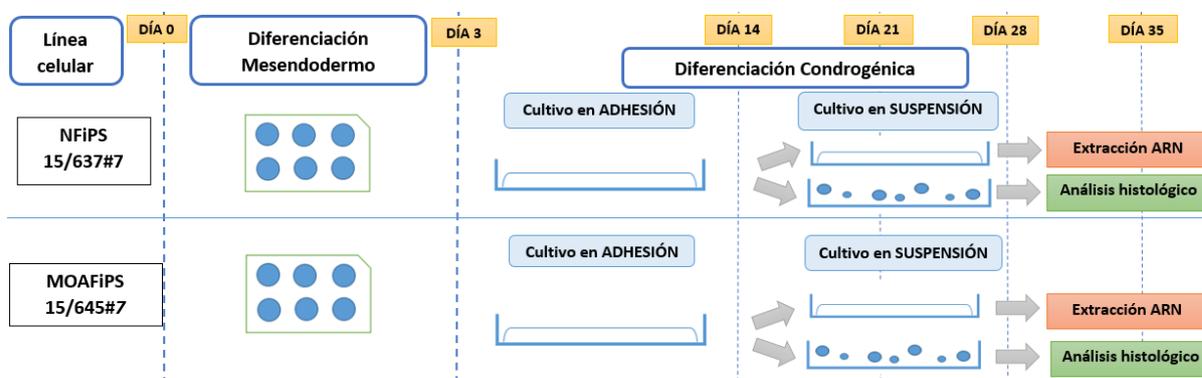


Figura 11. Esquema del cultivo de diferenciación condrogénica de las *iPSCs*.

Se realizó el mismo procedimiento con las células TC28a2 para utilizar como control positivo de diferenciación. Sin embargo, en este caso el proceso de diferenciación se inició con el medio condrogénico. La figura 12 muestra el protocolo seguido para el cultivo de la línea de TC28a2.

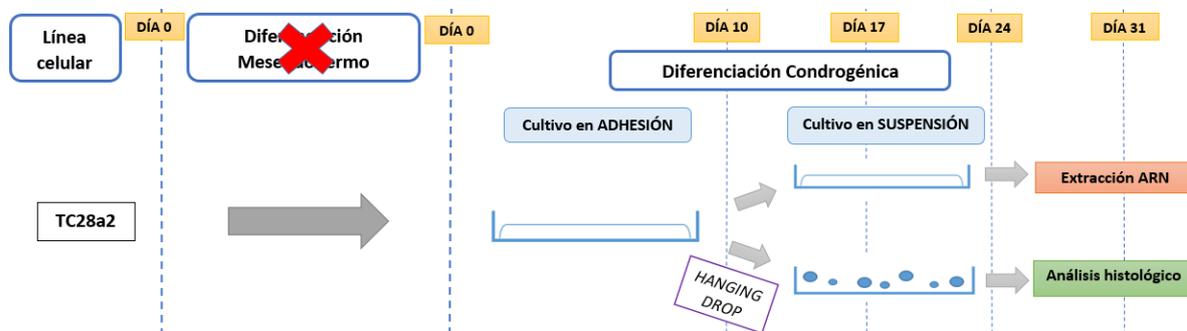


Figura 12. Esquema representativo del cultivo de diferenciación condrogénica de la línea TC28a2.

Se realizaron 4 réplicas biológicas de cada una de las líneas de *iPSCs* con el protocolo de diferenciación dirigida. En el caso de las TC28a2, el protocolo se repitió 2 veces.

6.3.1.1. Formación forzada de *EBs* mediante la técnica de *hanging drop*

Para obtener controles negativos de la diferenciación, del cultivo libre de *feeder*, se levantaron las *iPSCs* con ayuda de la enzima *TrypLE* (Gibco™) y se realizó la técnica de *hanging drop* para formar *EBs*, representada en la figura 13.



Figura 13. Técnica de *hanging drop* (izquierda) y esferoides formados (derecha). Una vez levantadas, las células se recogieron con medio *Stemflex* y se contaron con ayuda de una cámara *Neubauer*. La suspensión celular se

centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en medio *Stemflex*.

Se recogieron 20 µl de la suspensión celular y se depositaron como “gotas” en la superficie de la placa no adherentes de 100 cm². Una vez depositadas, se invirtió la superficie de la placa para la formación de esferoides de 200.000 células. La placa se incubó a 37°C con un 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 48 horas. Una vez formados, los esferoides se recogieron y se depositaron en una placa de 100 cm² con abundante medio.

Para obtener controles positivos previos a la diferenciación y posteriores a la diferenciación, se realizó la técnica de *hanging drop* en la línea TC28a2 con el mismo protocolo que con las *iPSCs*.

La línea TC28a2 se levantó con ayuda de Tripsina 2x (*Sigma Aldrich Química S.A.*, España). La técnica de *hanging drop* se realizó dos veces, antes de añadir medio condrogénico, a modo de control, y tras dos semanas de cultivo de diferenciación condrogénica, para así obtener esferoides antes de la diferenciación y tras ella.

Una vez transcurridas 48 horas, los esferoides formados se recogieron y se depositaron en placas de 100 cm² con abundante medio.

Los esferoides formados del cultivo previo a la diferenciación se mantuvieron en suspensión en una placa de 100 cm² con abundante medio *DMEM* al 10% de SBF durante 5 semanas; mientras que, los esferoides formados de la placa con medio condrogénico, se mantuvieron en suspensión en ese mismo medio durante 3 semanas.

6.3.2. Cultivo de los *EBs* espontáneos

Un total de 54 *EBs* espontáneos, 27 de cada línea de *iPSCs*, que crecieron durante el cultivo libre de *feeder* se recogieron y se depositaron individualmente en pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo cónico (*CorningTM*). Dichos *EBs* se cultivaron siguiendo el protocolo descrito previamente para la diferenciación dirigida, realizando una transición gradual de los medios de cultivo.

Por otro lado, con el fin de obtener un control negativo de la diferenciación, 6 de los *EBs* se cultivaron en medio EB compuesto por *DMEM Knockout without L-glutamine (Gibco™)*, 10% de SBF, 1% de Glutamax (*Gibco™*), 1% de *MEM NEAA*, 0,1% de b-mercaptoethanol (*Gibco™*), y 1% de P/E.

Se realizaron cambios de medio 3 veces por semana durante 5 semanas y se incubó la placa a 37°C con un 5% de CO₂. Transcurrido ese tiempo, los esferoides se recogieron para llevar a cabo el análisis histológico de la diferenciación.

6.4. Evaluación histológica de la diferenciación condrogénica

La evaluación histológica de la diferenciación condrogénica se llevó a cabo en los Servicios Centrales de Histomorfología del INIBIC. Para ello, los esferoides de cada uno de los protocolos realizados fueron incluidos en parafina y cortados con el micrótopo. Dichos cortes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E), Tricrómico de Masson (TM), Azul de Toluidina (AT) y Safranina O (SO).

Los esferoides formados durante el protocolo de diferenciación dirigida fueron teñidos con las tinciones H-E, TM, AT y SO. Mientras que los esferoides del cultivo de *EBs* espontáneos se tiñeron con H-E, TM y SO.

6.4.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina

La tinción de H-E se utiliza para visualizar la estructura celular de los cortes. La hematoxilina se une a cargas negativas, como el ADN, tiñendo de violeta los núcleos; mientras que la eosina, se une a cargas positivas, como el citoplasma, tiñendo de color rosa.

6.4.2. Tinción de Tricrómico de Masson

La tinción de TM es utilizada para visualizar las fibras de Col-1 para lo que se usan 3 colorantes que diferencian entre el núcleo, el citoplasma y las fibras de colágeno. Las fibras aparecerán de un color azulado, mientras que el núcleo se teñirá de morado y el citoplasma de color rojo.

6.4.3. Tinción de Azul de Toluidina

El AT es un colorante metacromático acidófilo. Al unirse a estructuras ácidas cambia de color, tornándose rojizo al contactar con PG. Además, también presenta afinidad con los ácidos nucleicos tiñendo así el ADN y ARN de color azul.

6.4.4. Tinción de Safranina O

La tinción de SO es de contraste, ya que se usa para diferenciar una estructura celular previamente teñida con otro colorante. Este colorante se utiliza en la identificación de procesos degenerativos como la OA, debido a que la SO se une por cargas a los grupos carboxilo y a los grupos sulfato (ambos con carga negativa) de los GAGs, los cuales abundan en la ECM del cartílago, que obtienen una coloración anaranjada.

Una vez teñidas, las muestras se observaron con ayuda de un microscopio Olympus BX61, equipado con una cámara digital Olympus DP70 (*Olympus Corporation*, Japón).

6.5. Análisis molecular de la diferenciación condrogénica

6.5.1. Obtención, extracción y cuantificación de ARN

Una vez finalizados los protocolos de diferenciación condrogénica, las células se levantaron con la enzima Versene tal y como se describió con anterioridad y se almacenaron a modo de *pellet* seco para llevar a cabo la extracción de ARN. Se recogieron *pellets* secos de cada una de las condiciones a las que se somete a nuestras células, teniendo una condición inicial (T0) y otras en medio condrogénico (diferenciación).

Para realizar la extracción de ARN se empleó el *RNeasy® Mini Kit* (*Qiagen®*, Alemania) el cual consiste en un sistema de purificación del RNA mediante el empleo de columnas que contienen una membrana de sílice a la que se unirá el ARN. La extracción se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial para la extracción de ARN de células animales.

Una vez realizada la extracción, el ARN de las muestras se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Tras la extracción del ARN, se realizó una cuantificación con ayuda de un espectrofotómetro (*NanoDrop™ ND-1000; ThermoFisher Scientific*) para

Protocolo de diferenciación condrogénica en *iPSCs* de pacientes con OAm y un donante sano

conocer la concentración y pureza del ARN. Así, se midieron las absorbancias (A) a 280 nm, 260 nm y 230 nm para valorar la concentración de ARN (A260), la contaminación con proteínas (razón A260/A280) y la contaminación con sales y/o alcoholes (razón A260/A230).

6.5.2. Síntesis de ADN complementario

Una vez obtenido y analizado el ARN total, se realizó la retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc) en un termociclador (*GeneAmp PCRSystem 9700*; *Applied Biosystems*, España) con el *kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen™)*, utilizando como cebadores *random hexamers* y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Este *kit* se compone por la mezcla *SuperScript™* y la mezcla VILO para la reacción. La mezcla de 10x *SuperScript™* contiene la retrotranscriptasa, encargada de transcribir el ARN en ADNc y un inhibidor de ribonucleasas. La mezcla 5x VILO contiene los *random hexamers*, cloruro de magnesio (MgCl₂) y los deoxinucleótidos trifosfatos (*dNTPs-Deoxynucleotide triphosphates*), componentes necesarios para realizar la reacción de amplificación en el termociclador. De cada muestra, se retrotranscribió 1 ng de ARN.

En el termociclador se utilizó un programa de amplificación consistente en un ciclo de preincubación de 10 minutos a 25°C; dos ciclos de amplificación de 60 minutos a 42°C, un ciclo de terminación de 5 minutos a 85°C, y un ciclo final de enfriamiento de 4°C.

Las muestras de ADNc fueron almacenadas a 4°C hasta el momento de realización de los análisis de expresión génica mediante *PCR* cuantitativa en tiempo real (*quantitative real time PCR, qPCR*).

6.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real

El análisis de expresión génica mediante *qRT-PCR* se realizó cargando el ADNc, diluido en proporción 1:100 según recomienda el fabricante, en una placa de 96 pocillos (*Roche*, Alemania) junto con *LightCycler 480 Syber Green I Master* (*Roche*) y los cebadores específicos que se muestran en la siguiente tabla II.

Tabla II. Secuencias de los cebadores utilizados.

Nombre	Cebadores	Secuencia
<i>GAPDH</i>	Sentido	5' GGAGTCAACGGATTTGGTCGTA 3'
	Antisentido	5' GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT 3'
<i>AGG</i>	Sentido	5' GCCTACGAAGCAGGCTATGA 3'
	Antisentido	5' GCACGCCATAGGTCCTGA 3'
<i>COL-10</i>	Sentido	5' CACCTTCTGCACTGCTCATC 3'
	Antisentido	5' GGCAGCATATTCTCAGATGGA 3'
<i>COL-1A</i>	Sentido	5' CTGGCCCCATTGGTAATGT 3'
	Antisentido	5' ACCAGGGAAACCAGTAGCAC 3'
<i>COL-2A</i>	Sentido	5' TGGTGCTAATGGCGAGAAG 3'
	Antisentido	5' CCCAGTCTCTCCACGTTTAC 3'
<i>OCT4</i>	Sentido	5' GGAGGAAGCTGACAACAATGAAA 3'
	Antisentido	5' GGCCTGCACGAGGGTTT 3'

La reacción de *PCR* consistió en 10 µl de Master Mix 2X, 0,25 µM de los cebadores sentido y antisentido, el ADNc y H₂O hasta un volumen final de 20 µl.

Los experimentos se diseñaron de forma que cada muestra contase con una réplica técnica. Las reacciones de amplificación se realizaron de acuerdo a los siguientes parámetros: 95°C durante 10 s, 55 ciclos a 95°C durante 10 s, 60°C durante 5 s y 72 °C durante 11 s y un ciclo de enfriamiento de 20 s a 40°C. Después de la amplificación, se realizaron los análisis de las curvas de temperatura de fusión en tres pasos: 95°C durante 5 s, 65°C durante 60 s, 97°C durante 1 s y un enfriamiento final de la placa a 4°C.

Para la detección de expresión de genes constitutivos de referencia se analizó el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*), el cual ya había sido identificado previamente como el gen más estable de una batería de 12 genes en el laboratorio mediante el algoritmo Genorm.

El gen *OCT-4* fue analizado para comprobar la pluripotencia de las células. Para valorar la diferenciación condrogénica se analizó el grado de expresión

de dos genes específicos de condrogénesis: COL-2A y AGG. También se analizó COL-1, un marcador que indica la formación de fibrocartílago debido a una condrogénesis inadecuada; y el COL-10, un marcador de hipertrofia de los condrocitos.

Los resultados se analizaron con *LightCycler 480 Software release 1.5.0. SP4*. Para calcular los niveles relativos de expresión (NRE) de los genes estudiados, los valores obtenidos se normalizaron con respecto al gen de referencia *GAPDH* utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Una vez normalizados, los valores obtenidos de los NRE se relativizaron en función de la condición t0 de la correspondiente línea de *iPSCs* que se estaba comparando.

7. RESULTADOS

7.1. Cultivo celular de las *iPSCs* y caracterización morfológica

7.1.1. Cultivo en feeder

Las colonias presentaban una morfología similar a las colonias de *ESCs*, es decir, colonias compactas con bordes definidos, un elevado ratio núcleo/citoplasma y nucléolos prominentes.

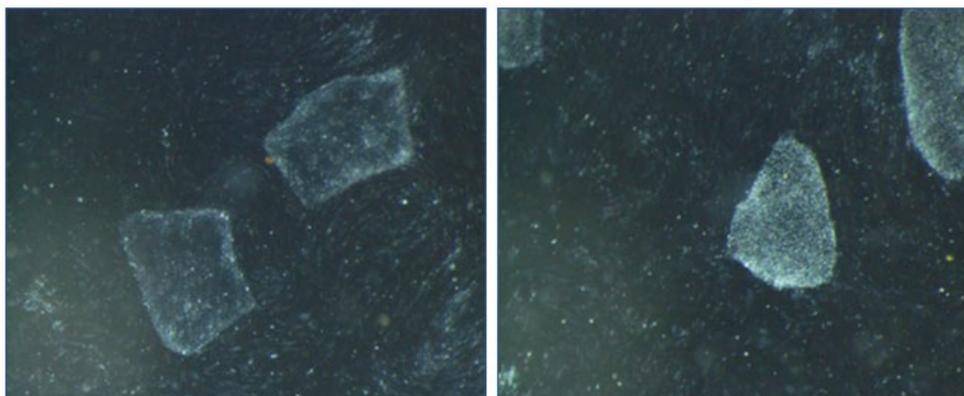


Figura 14. NFIPS 15/637#7 (izquierda) y MOAFiPS 15/645#7 (derecha) en cultivo en *feeder*.
Imágenes tomadas con un microscopio a 2x.

7.1.2. Adaptación al cultivo libre de feeder

Cuando se realizó la adaptación de los clones de *iPSCs* al sistema de cultivo libre de *feeder*, se observó elevada muerte celular y abundantes fragmentos de colonias suspendidos en el medio de cultivo.

Sin embargo, tras realizar el cambio de medio, los pequeños grupos de células que se observaron adheridos a las placas comenzaron a proliferar, manteniendo la morfología de colonias con borde definido y aspecto compacto, como se muestra en la figura 15. Fueron necesarios varios intentos para conseguir adaptar los clones al cultivo libre de *feeder* en Laminina.

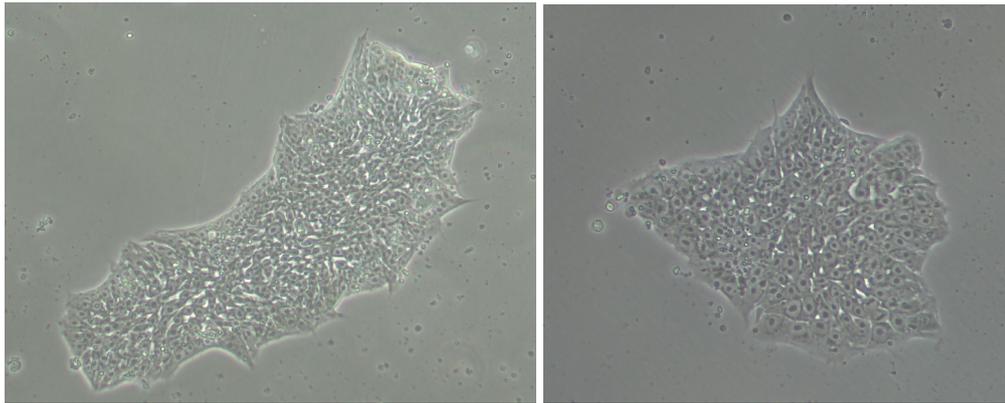


Figura 15. Fotos del clon NFiPS 15/637#7 (izquierda) y del clon MOAFiPS 15/645#7 (derecha) adaptados a un sistema libre de *feeder*. Imágenes tomadas con un microscopio a 10x.

7.2. Evaluación del cultivo de condrogénesis dirigida

7.2.1. Evaluación morfológica

Se realizó el protocolo elaborado por Yamashita y colaboradores sin obtener resultados, ya que las células se levantaron al tercer día de añadir el medio condrogénico.

Dada la baja supervivencia celular observada una vez realizado el primer protocolo de diferenciación dirigida, se procedió a evaluar si una transición gradual de los medios de diferenciación, así como la adición del inhibidor de la apoptosis *R1* permitía obtener mayor viabilidad celular y completar el protocolo de diferenciación condrogénica.

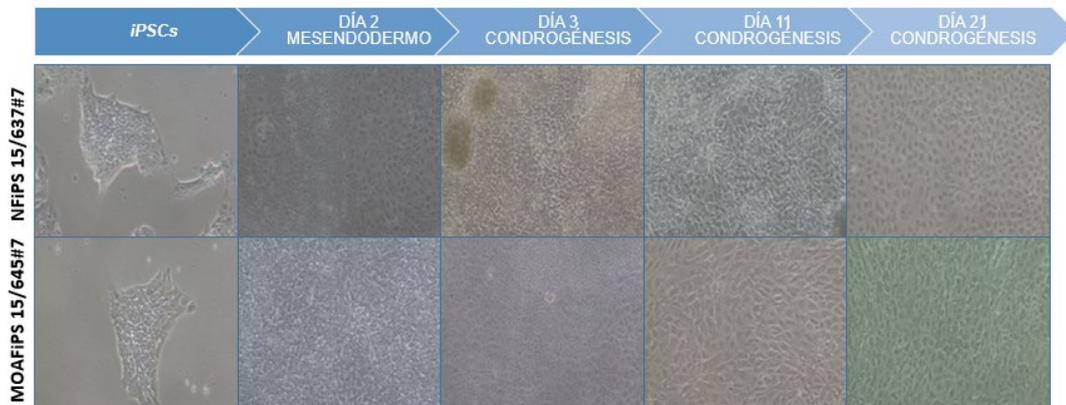


Figura 16. Línea temporal del protocolo de diferenciación condrogénica con las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7. Imágenes tomadas con un microscopio a 10x.

En la figura 16 y figura 17 se muestra una secuencia de fotografías representando las diferentes etapas del protocolo de diferenciación de las líneas de *iPSCs* y de la línea TC28a2, respectivamente.



Figura 17. Línea temporal del protocolo de diferenciación condrogénica con la línea TC28a2. Imágenes tomadas con un microscopio a 10x.

Las líneas de *iPSCs* fueron fotografiadas durante las diferentes etapas observado un cambio morfológico gradual con respecto al aspecto inicial. Las células aumentaron su tamaño y abandonaron la estructura de colonias. Además, se comenzó a observar que en algunas zonas las células formaban agrupaciones en forma de esferoides, como se muestra en la figura 18, los cuales se mantuvieron en suspensión durante toda la diferenciación. A pesar de la supervivencia de las células, cabe destacar que se observó elevada muerte celular durante los cambios de medio entre la fase de mesendodermo y la fase de medio condrogénico.

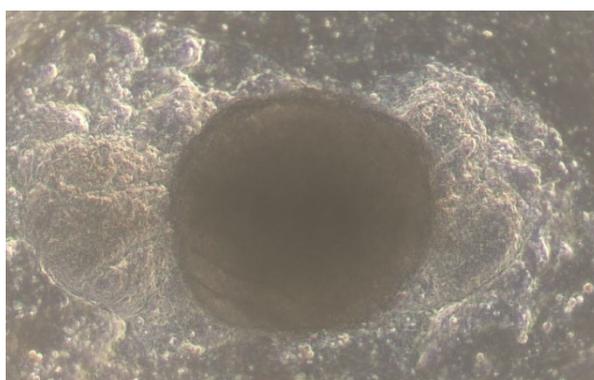


Figura 18. Esferoide formado durante el cultivo de diferenciación dirigida de la línea MOAFiPs 15/645#7. Imagen tomada a 4x.

La línea TC28a2 fue cultivada con el mismo protocolo anteriormente indicado, aunque sin llevar a cabo el paso de diferenciación hacia mesendodermo. Al igual que sucedía con las *iPSCs*, se observó elevada muerte celular tras el cambio a medio de diferenciación condrogénico,

aunque las células sobrevivieron, pero sin cambios morfológicos representativos.

7.2.1.1. Formación forzada de *EBs* de *iPSCs* y esferoides de TC28a2

La línea celular TC28a2 no formó esferoides durante el cultivo condrogénico, por lo que para poder llevar a cabo análisis histológicos fue necesario realizar una formación “forzada” de esferoides (apartado 6.3.1.1 del material y métodos), los cuales se mantuvieron en cultivo en suspensión, al igual que los esferoides derivados de *iPSCs*, para su análisis histológico.

La técnica de la gota colgante no permitió generar *EBs* de las *iPSCs* después de 48 horas en cultivo. Se observó que los *EBs* no se mantenían compactos ni agregados, por lo que no se pudo obtener un control negativo de las diferenciaciones.

7.2.2. Evaluación histológica

Una vez realizadas las tinciones H-E, SO, TM y AT, se compararon diferentes muestras de esferoides estimuladas frente al control positivo de los agregados celulares formados por la técnica *hanging drop* de las TC28a2.

Parte de los esferoides formados se destruyeron durante el proceso de recolección y tinción, por lo que no se obtuvo ningún *EB* de control negativo de la diferenciación empleando el protocolo de cultivo de *EBs* espontáneos (apartado 6.3.2 de material y métodos).

En todos los esferoides formados detectamos la presencia celular con la tinción H-E, como se muestra en la figura 19. La tinción H-E (Figura 19) permitió observar en tono violáceo los núcleos de las células existentes. Su morfología era redondeada, con pequeñas agrupaciones distribuidas por toda la superficie, aunque en mayor proporción en las zonas más externas. Esta tinción mostró además que los esferoides de control positivo de la línea TC28a2 presentaban un aspecto más compacto que los esferoides estimulados de las líneas de *iPSCs* como los de la línea TC28a2 cultivados en medio condrogénico.

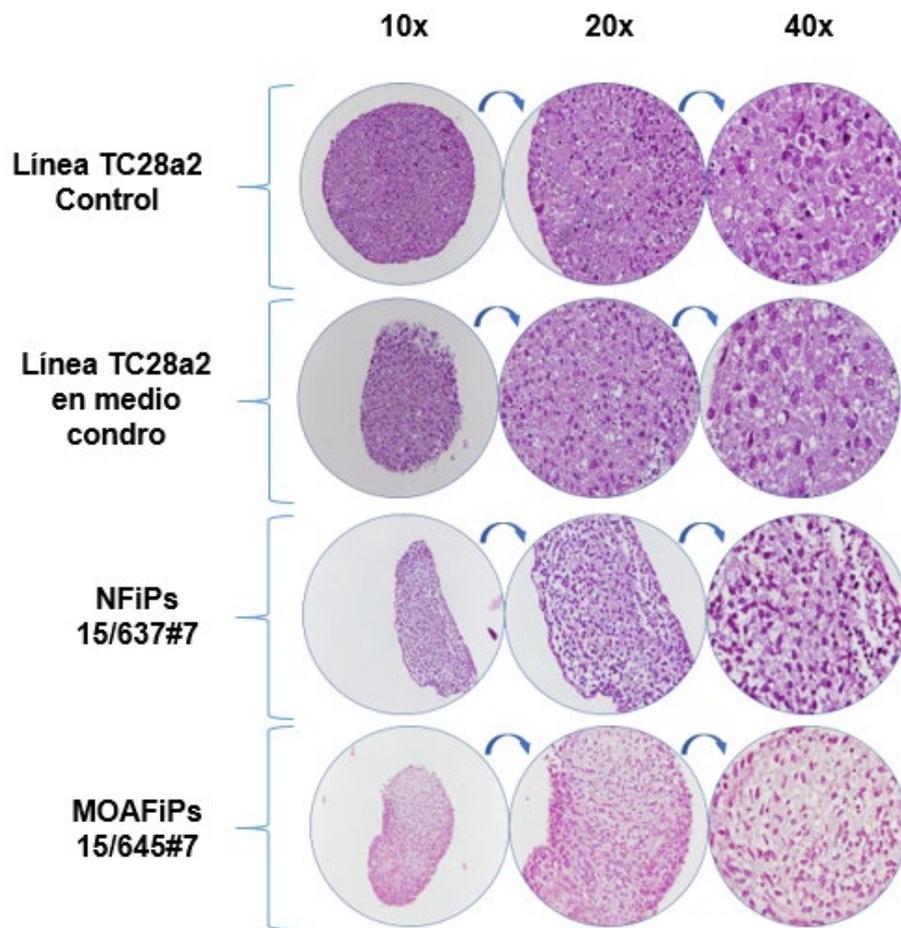


Figura 19. Tinción de H-E a diferentes aumentos de los esferoides formados de las diferentes líneas.

La tinción SO no mostró la presencia de PG en la *ECM* en los esferoides control positivo de la línea TC28a2 ni en los estimulados de ambas líneas de *iPSCs* ni de la línea de TC28a2, ya que sólo se observa una coloración rosada (Figura 20, 21 y 22). Mientras que su distribución en el esferoide control positivo de la línea TC28a2 fue homogénea y con una coloración más intensa, en las estimuladas de las líneas de *iPSCs*, la tinción se distribuyó en determinadas zonas y de manera no tan compacta.

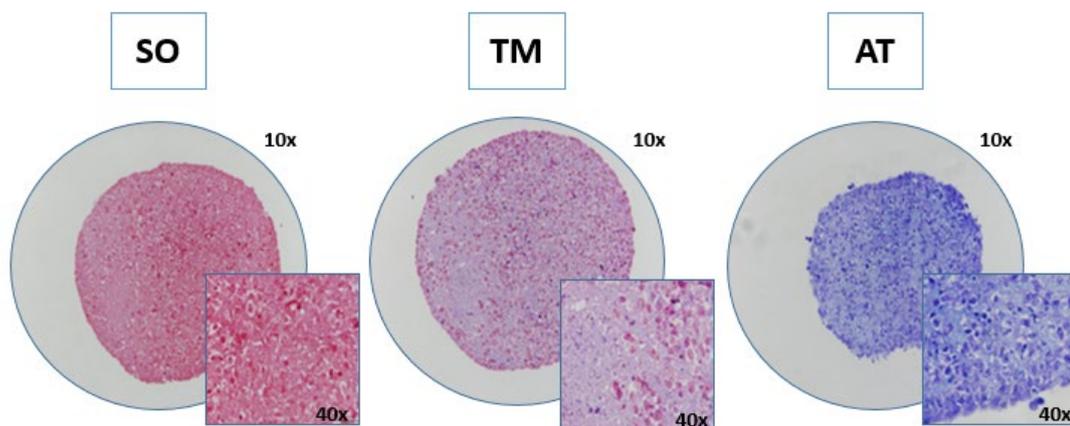


Figura 20. Tinciones de SO, TM y AT de esferoides de la línea TC28a2 en *DMEM* al 10% como control positivo.

La tinción para TM no mostró la presencia de colágeno en la *ECM* en ninguna de las muestras analizadas, salvo en los controles positivos de la línea TC28a2 que se observó una positividad fuerte (++) en el control positivo en *DMEM* 10% (Figura 20), y leve (+) en el cultivado en medio condrogénico. Para los esferoides formados de las líneas de *iPSCs* los resultados fueron “ligeramente positivos”, en concreto, en la zona superior del esferoide de ambas líneas (Figuras 21 y 22).

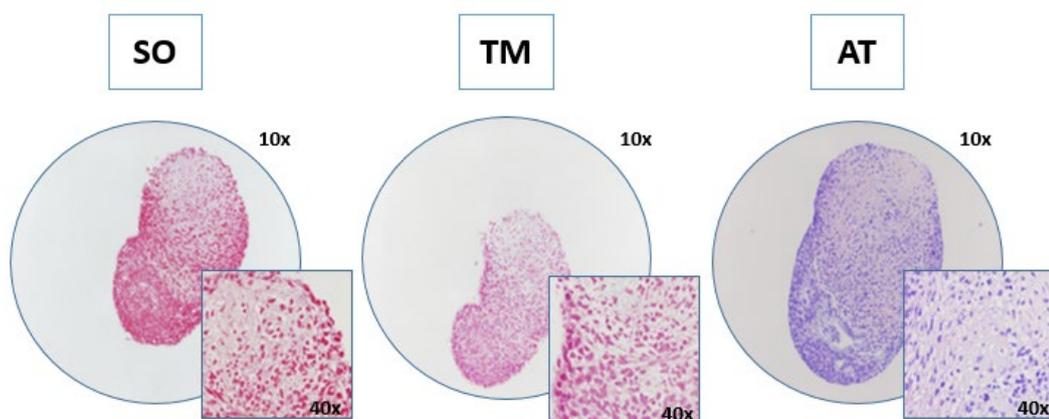


Figura 21. Tinciones de SO, TM y AT de esferoides de la línea NFIPS 15/637#7 tras el protocolo de diferenciación dirigida.

La tinción de AT refleja una coloración azulada en los controles positivos (Figura 20) y de color violáceo en las líneas de *iPSCs* diferenciadas (Figura 21 y 22). El color violeta puede ser por mezcla del azul con el color rojo, lo que puede indicar cierta presencia de PGs (+/-), caracterizados en esta tinción por su tonalidad rojiza.

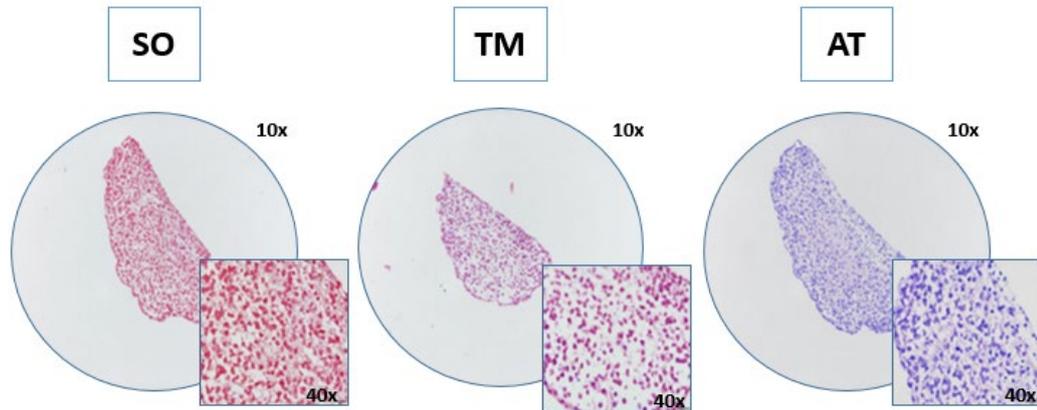


Figura 22. Tinciones de SO, TM y AT de esferoides de la línea MOAFiPS 15/645#7 tras el protocolo de diferenciación dirigida.

A continuación, en la tabla III, se muestra un resumen de la valoración cualitativa de las tinciones histológicas de AT, TM y SO de las diferentes muestras.

Tabla III. Resultados de la valoración cualitativa de las tinciones histológicas de los controles positivos y de los esferoides formados durante las diferenciaciones condrogénicas de las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 en la placa de diferenciación dirigida y de EBs espontáneos: (-) Negativo o ausencia, (+) Levemente positivo o presencia débil, (++) Moderadamente positivo, (+++) Muy positivo o presencia fuerte.

MUESTRA	TINCIÓN		
	SO	TM	AT
Línea TC28a2 Control +	+/-	++	-
Línea TC28a2 Control + de diferenciación dirigida	-	+	-
NFiPS 15/637#7 de diferenciación dirigida	-	+	+/-
MOAFiPS 15/645#7 de diferenciación dirigida	-	+	+/-
NFiPS 15/637#7 de EBs espontáneos	-	-	
MOAFiPS 15/645#7 de EBs espontáneos	-	-	

7.2.3. Análisis molecular

Tras el análisis histológico de los esferoides formados y de la evaluación morfológica, se procedió al análisis molecular de las líneas de *iPSCs* del cultivo de diferenciación dirigida. No se pudo realizar un análisis molecular del protocolo de *EBs* espontáneos porque no se obtuvieron suficientes esferoides para poder realizar la extracción de ARN.

Para analizar la expresión génica de la diferenciación de *iPSCs*, se analizaron varios genes: un marcador de pluripotencia (*OCT-4*), dos marcadores de formación de cartílago (*COL-2A* y *AGG*), y un marcador de fibrocartílago (*COL-1A*) y un marcador de hipertrofia (*COL-10*). Se valoraron los NRE de cada uno de estos genes en cada diferenciación con respecto a una condición inicial (t_0).

Los análisis de *qRT-PCR* mostraron que las dos líneas empleadas expresaban el marcador de pluripotencia (*OCT-4*) en las condiciones iniciales, por el contrario, los valores obtenidos durante las diferenciaciones fueron próximos a 0, como se puede observar en la figura 23, mostrando así la pérdida de su pluripotencia. En el caso de la línea TC28a2 estos valores fueron también próximos a 0, tanto en la condición inicial como tras el cultivo de diferenciación.

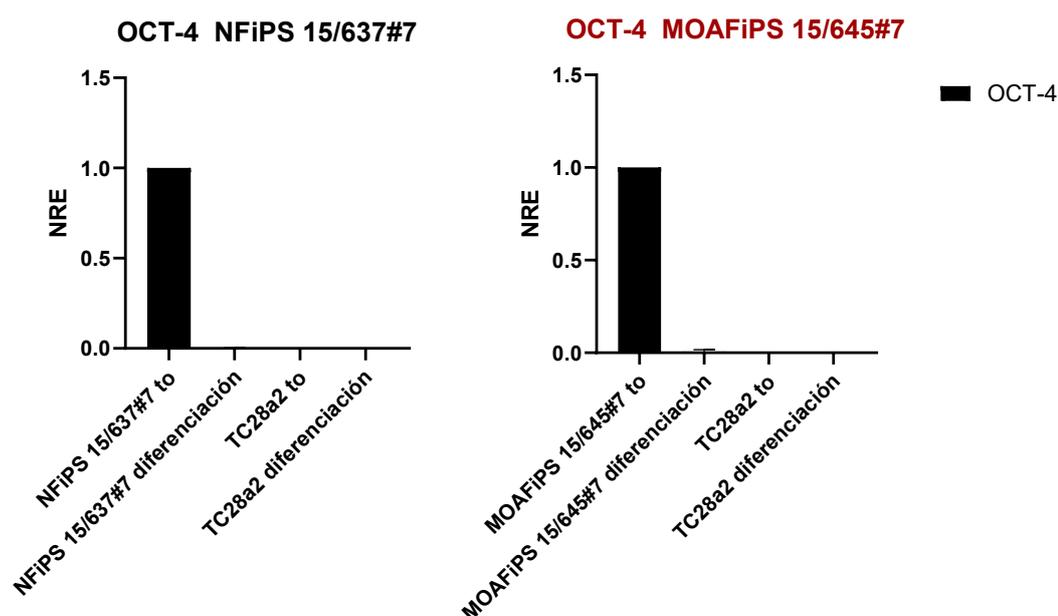


Figura 23. Gráficas de los NRE del gen *OCT-4* de las líneas NFIPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 antes y después del protocolo de diferenciación dirigida.

Con respecto al marcador de fibrocartílago COL-1A, los valores fueron más elevados tras el protocolo de diferenciación en comparación a la condición inicial en ambas líneas de *iPSCs*, como se muestra en la figura 24. La desviación de las 4 réplicas de ambas líneas fue también bastante elevada. La línea TC28a2 presenta valores del gen COL-1, tanto a t0 como tras el protocolo de diferenciación dirigida, menores en comparación con la línea de *iPSCs*.

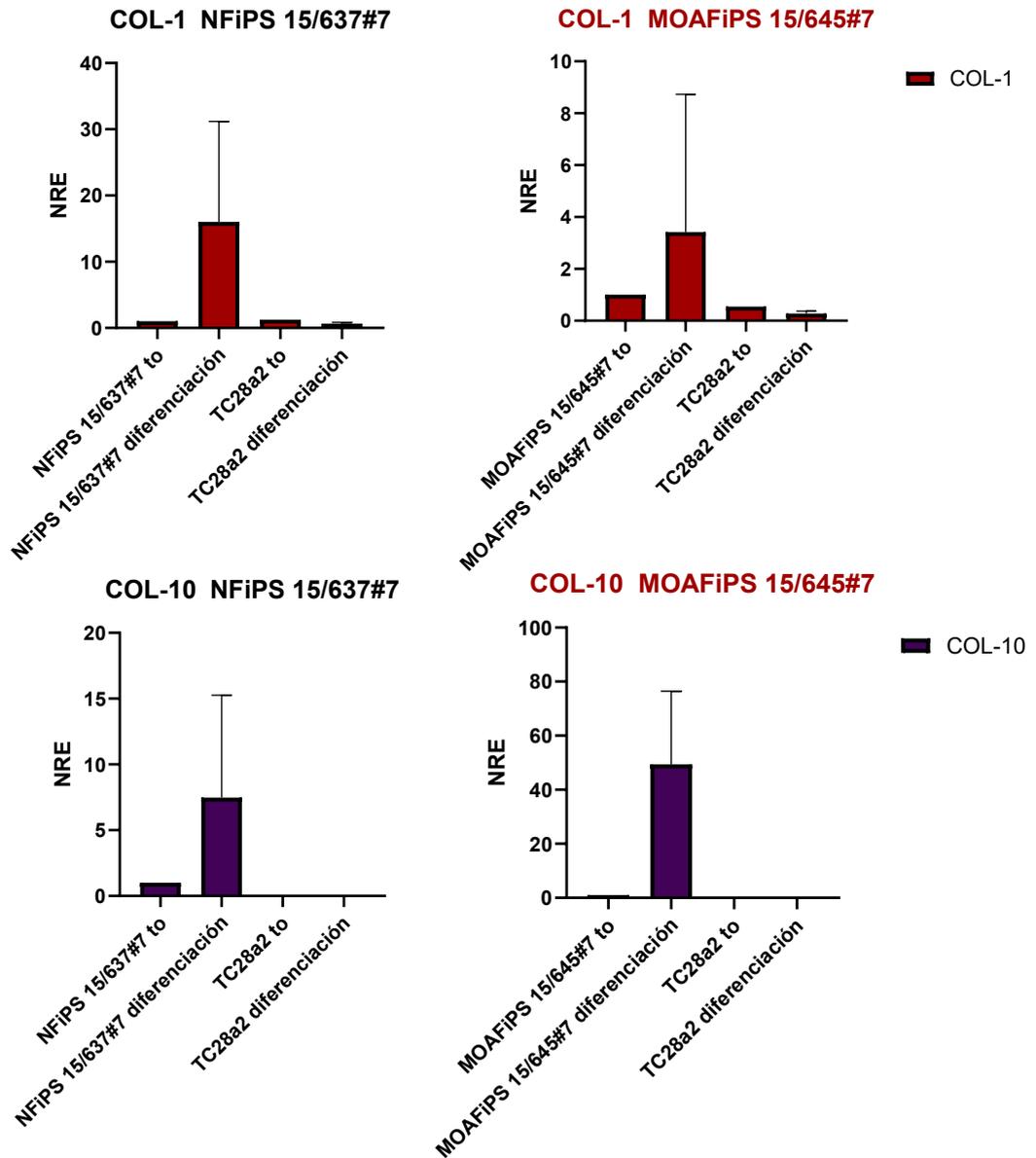


Figura 24. Gráficas de los NRE del gen COL-1A Y COL-10 de las líneas NFIPs 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 antes y después del protocolo de diferenciación dirigida.

En cuanto al marcador de hipertrofia COL-10, los valores obtenidos de las diferenciaciones en la línea NFiPS 15/637#7 fueron inferiores a los observados en el control de t0; al igual que sucedió en la línea MOAFiPS 15/645#7, como se muestra en las gráficas de la figura 24. Además, también se observó una gran desviación de los valores de las réplicas como en el marcador de fibrocartilago del COL-1A. La expresión del gen del COL-10 en la línea TC28a2, es casi inexistente comparándola con los valores de las *iPSCs* antes y después de la diferenciación.

Los NRE de marcadores de formación de cartilago articular (COL-2A y AGG) se representan en las figuras 25 y 26. En la línea NFiPS 15/637#7, los valores de la diferenciación son similares con respecto al t0. Por el contrario, la expresión del COL-2A en la línea MOAFiPS 15/645#7 se incrementa tras la diferenciación. No se detectó expresión de COL2 en la línea de TC28a2 en comparación con las líneas de *iPSCs*, como se muestra en la figura 25.

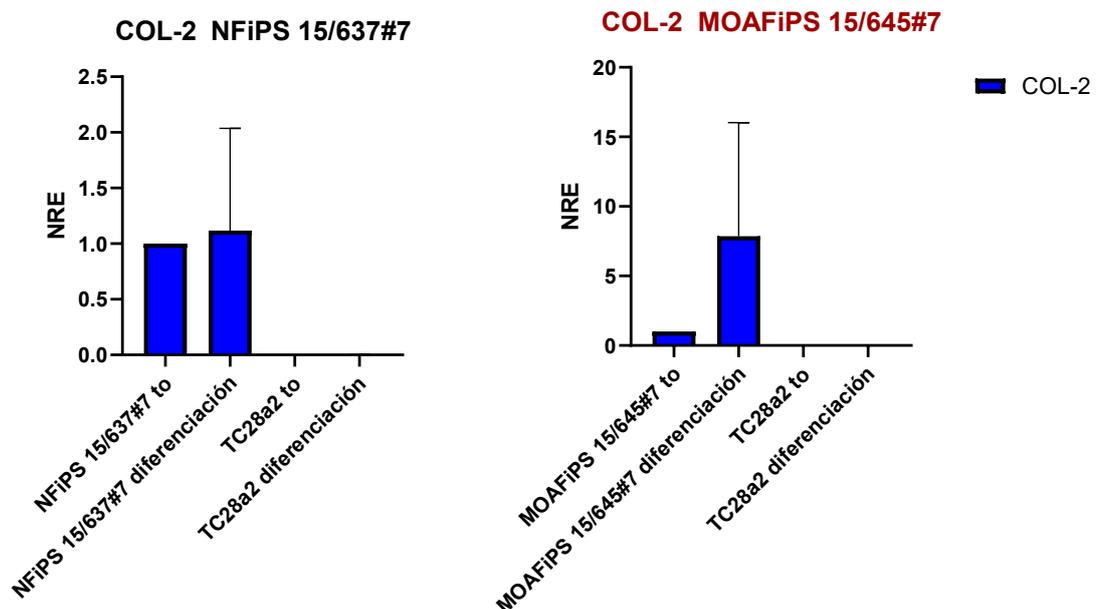


Figura 25. Gráficas de los NRE del gen COL-2A de las líneas NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 antes y después del protocolo de diferenciación dirigida.

Los NRE del AGG en la línea NFiPS 15/637#7 se mantuvieron estables en la diferenciación con respecto a la condición inicial. En la línea MOAFiPS 15/645#7, los NRE del AGG tras la diferenciación disminuyeron con respecto a la condición inicial. En la línea TC28a2, los valores fueron muy bajos

comparándolos con el tiempo inicial de las *iPSCs*, como se observa en la figura 26.

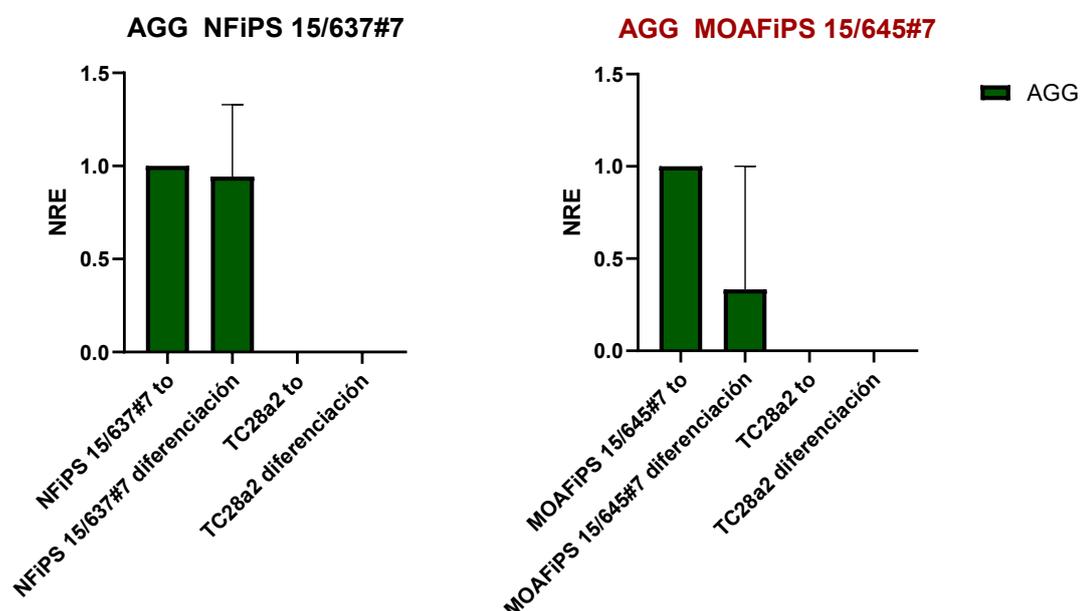


Figura 26. Gráficas de los NRE del gen AGG de las líneas NFIPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 antes y después del protocolo de diferenciación dirigida.

7.3. Evaluación del cultivo de *EBs* espontáneos

7.3.1. Evaluación morfológica

Dada la baja supervivencia celular observada una vez realizado el primer protocolo de diferenciación dirigida, se observó que durante el cultivo libre de *feeder* se formaban *EBs* de manera espontánea que se recogieron siguiendo el protocolo del apartado 6.3.2. de material y métodos.

Durante el cultivo, se observó que muchos de los *EBs* se destruían o se adherían a la placa, aunque algunos mantuvieron su estructura tridimensional y agregada durante el cultivo de *EBs* espontáneos y que fueron, por tanto, empleados para llevar a cabo los análisis histológicos.

7.3.2. Evaluación histológica

No se pudieron obtener esferoides para el control negativo de la diferenciación ya que todos se habían destruido; por el contrario, sí se obtuvieron esferoides de ambas líneas de *iPSCs*, los cuales fueron cultivados en medio condrogénico con el protocolo de *EBs* espontáneos y posteriormente analizados por histología tal y como se mencionó

Protocolo de diferenciación condrogénica en *iPSCs* de pacientes con OAm y un donante sano

anteriormente. Los resultados obtenidos de los cortes histológicos fueron negativos, con esferoides de pequeño tamaño y estructura poco definida. Aunque la tinción H-E reveló la presencia celular en los esferoides, también mostró poca compactación de los mismos con respecto a los esferoides formados de la línea TC28a2 y los esferoides del protocolo de condrogénesis dirigida, como se muestra en las figuras 27 y 28.

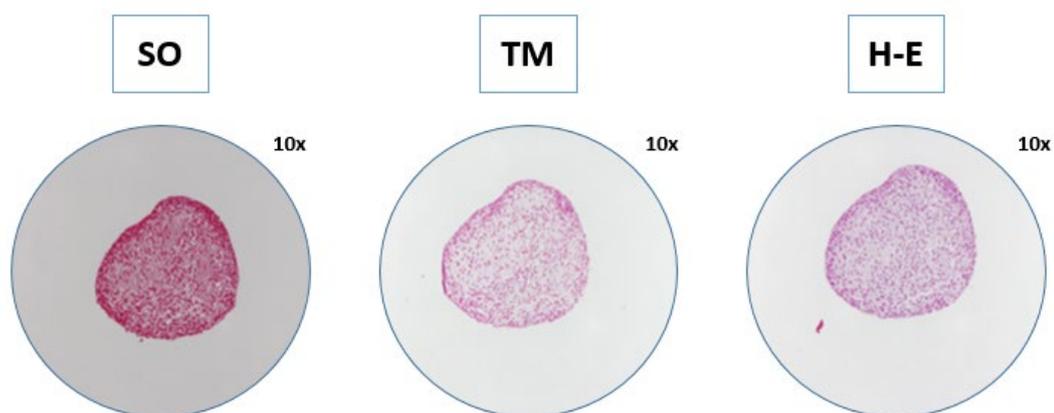


Figura 27. Tinciones de SO, TM y H-E de esferoides tras la diferenciación de la línea NFiPS 15/637#7 de EBs espontáneos.

La tinción para TM no mostró la presencia de colágeno en la *ECM* en ninguno de los esferoides analizados de ambas líneas. De la misma manera, la tinción SO no mostró la presencia de PGs en la *ECM* en los esferoides de ninguna de las líneas, ya que sólo se observó una coloración rosada-rojiza, muy intensa en la línea NFiPS 15/637#7, pero muy leve en la línea MOAFiPS 15/645#7, resultados similares a los observados en el protocolo de diferenciación dirigida.

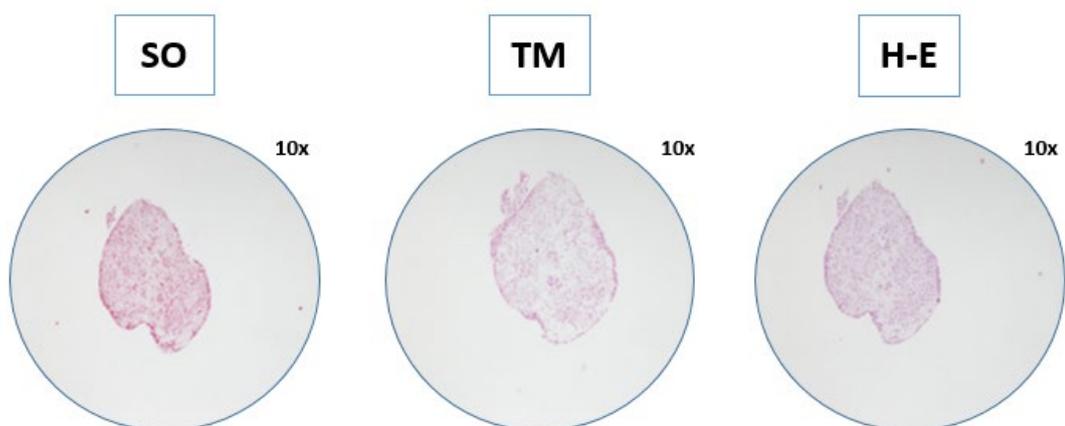


Figura 28. Tinciones de SO, TM y H-E de esferoides tras la diferenciación de la línea MOAFiPS 15/645#7 de EBs espontáneos.

8. DISCUSIÓN

Este estudio se ha llevado a cabo con la finalidad de obtener una buena diferenciación condrogénica de dos líneas de *iPSCs* para poder ser empleadas en el modelado de la *OAm*.

La *OAm* afecta habitualmente a las articulaciones de los dedos, provocando dolor, rigidez e incapacidad para realizar actividades diarias (23). Aunque presenta una alta prevalencia y limita la capacidad de movimiento, su etiología aún es desconocida (1). La ausencia de modelos animales, además del escaso número de muestras disponibles, dificulta su investigación (23).

Los modelos celulares *in vitro* son herramientas importantes para explicar los mecanismos moleculares y las rutas que intervienen en la *OAm*. Para el estudio de la *OA*, se utilizan como modelos *in vitro* condrocitos articulares primarios, líneas celulares inmortalizadas y líneas de células madre, como *iPSCs*, *MSCs* o *ESCs* (58). El uso de los condrocitos primarios, de las líneas inmortalizadas o de las *MSCs* presenta ciertas limitaciones, como la dificultad de obtener las muestras, la pérdida del fenotipo de las células en cultivo o la pérdida del potencial de diferenciación, respectivamente (10,51,58). Además, el empleo de *ESCs* se ve restringido por consideraciones éticas (36). Por el contrario, las *iPSCs* son células con capacidad proliferativa indefinida que no pierden sus características y se diferencian hacia cualquier tipo celular del organismo, con el estímulo adecuado, y carecen de tantas restricciones éticas (10). Por tanto, las *iPSCs* podrían ser una fuente adecuada para el desarrollo de modelos *in vitro* de *OAm* para estudiar en profundidad los mecanismos moleculares y las rutas que intervienen en la enfermedad.

Este estudio emplea una línea de *iPSCs* generadas partir de fibroblastos dermales de una paciente con *OAm* (MOAFiPS 15/645#7), así como una línea de *iPSCs* “sana” (NFiPS 15/637#7) (56). Las condiciones de cultivo utilizadas para mantener y expandir las líneas celulares deben ser óptimas para asegurar el mantenimiento de las características de las mismas (40,41). En este sentido, las células fueron cultivadas en un sistema en *feeder* basado

en el uso de fibroblastos con el ciclo celular inactivado que proporcionan al medio nutrientes y factores de crecimiento que necesitan las *iPSCs* para mantener la pluripotencia (42,43).

En este estudio, se utilizaron *HFF* irradiados sobre un *coating* de Matrigel y medio de cultivo *hES*, combinación que permitió a las líneas mantener su capacidad de crecimiento indefinido y su pluripotencia.

En ocasiones, es necesario realizar una adaptación de las *iPSCs* a un cultivo libre de células alimentadoras para realizar determinadas pruebas (44). En este trabajo, se utilizó la laminina recombinante humana 521 en combinación con el medio de cultivo *Stemflex* que posibilitó la adaptación de los dos clones de *iPSCs*. Este tipo de laminina es una matriz adecuada para cultivos de células madre pluripotentes recién derivadas y cultivadas previamente en *feeder*, además de que las células presentan un comportamiento más estable durante protocolos de diferenciación (59). La adaptación a un medio libre de *feeder* supone un paso crítico en la supervivencia de las células, además de incrementar la posibilidad de aparición de errores en la dotación cromosómica (44). Esto se pudo comprobar en nuestro estudio, ya que fue necesario realizar varios intentos para conseguir que las colonias sobreviviesen al proceso de adaptación.

Para mejorar la adaptación de las colonias se realizaron varios subcultivos mecánicamente con el fin de aumentar la eficacia y posteriormente se procedió a subcultivar enzimáticamente lo que facilitó la expansión. Esto concuerda con estudios previos, donde las *iPSCs* presentan una elevada mortalidad al realizar los pases de las células individualmente, por lo que es recomendable realizar varios subcultivos de manera mecánica antes de usar métodos enzimáticos (38,60).

La adición de compuestos que evitan la muerte celular al medio de cultivo parece que favorecen la supervivencia y el cultivo de las *iPSCs* (61,62). En concordancia con esto, se observó que la adición al medio de cultivo de *RI* o el suplemento celular *Revitacell*[™], mejoró la supervivencia de las células. Estos compuestos no sólo favorecen a las *iPSCs*, si no también facilitan el

crecimiento de células diferenciadas en cultivo (38), por lo que estas moléculas deben utilizarse de manera controlada y con ciertas restricciones.

En los últimos años se han desarrollado numerosos protocolos para estimular la diferenciación condrogénica de las *iPSCs* (10). La diferenciación de condrocitos está regulada por múltiples vías de transducción de señales, en las cuales varias moléculas de señalización regulan este proceso. Las *BMP*, *FGF*, *TGF β* , y *Wnt* se incluyen dentro de esas moléculas (51).

Muy pocos son los estudios que han obtenido buenos resultados de diferenciación condrogénica (53,63), por lo que las investigaciones se han visto limitadas por el uso de protocolos poco eficientes y complejos (64). Aunque la mayoría de los investigadores realizan protocolos de diferenciación condrogénica dirigida aplicando temporal y secuencialmente factores definidos para imitar la condrogénesis embrionaria (10).

En nuestro estudio se ha utilizado un protocolo de diferenciación dirigida descrito previamente por Yamashita y colaboradores (53). A pesar de que en su estudio obtuvieron buenos resultados, nosotros observamos que tras la adición del medio condrogénico la mortalidad de las células aumentaba. Esto puede ser debido a que el *coating* utilizado no fue el adecuado, ya que en este protocolo es necesario el crecimiento de las células unas sobre otras formando múltiples capas, pero la matriz de laminina no permite este tipo de crecimiento de las células (59). Otro motivo de la alta mortalidad podría ser porque nuestras líneas son particularmente sensibles a este cambio de medio. Por ello, intentamos mejorar el protocolo realizando una transición gradual de los medios de diferenciación y añadiendo cambios de medio graduales y la adición de moléculas para evitar la apoptosis como el *RI*. Varios estudios también sugieren que el tratamiento con *RI* evita la desdiferenciación de los condrocitos, sin inducir hipertrofia ni disminuir el número de células (65). Además, hay estudios que sugieren un efecto positivo del empleo de *RI* en la diferenciación condrogénica de *iPSCs* (66). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se podría plantear la posibilidad de implementar un paso previo de purificación del cultivo con

citometría de flujo , con el fin de evaluar si se obtienen mejores resultados, ya que existen estudios que han sugerido que el paso de purificación de los cultivos es un paso crítico en los protocolos de diferenciación (10,51).

La evaluación histológica de los esferoides reveló presencia celular, por otro lado, las tinciones de AT, SO y TM revelaron cierta producción de *ECM* en algunos de los esferoides, aunque los resultados no fueron los esperados. Las tinciones de AT, SO y TM son tinciones comunes en numerosos estudios de diferenciación condrogénica para evaluar la formación de cartílago (53,63). Podría realizarse un estudio histológico más amplio con otras tinciones como el Azul Alcían en el que comprobar la presencia de otros componentes típicos de la *ECM* del cartílago, como la producción de GAGs (64). Además, en numerosos estudios de diferenciación condrogénica, se realizan técnicas de inmunohistoquímica para los anticuerpos del Col-1 y Col-2 (9,53,63,64), con el objetivo de completar los resultados obtenidos con las tinciones y el análisis molecular.

Por otro lado, los resultados del análisis molecular muestran resultados inconcluyentes. Los valores de NRE del gen *OCT-4* se ven reducidos en ambas líneas de *iPSCs* tras el protocolo de diferenciación dirigida, lo que concuerda con otros estudios en los cuales la expresión de los marcadores de pluripotencia se reduce tras la diferenciación (9,53), mientras que los valores en la línea TC28a2 se mantienen próximos a 0, ya que se trata de células ya diferenciadas.

La expresión de los marcadores de fibrocartílago e hipertrofia aumentaron en las líneas de *iPSCs* con respecto a la condición inicial, lo que indica una diferenciación hacia cartílago no hialino. Los resultados obtenidos por Yamashita y colaboradores sugieren una hipertrofia de las células pero tras 6 semanas de cultivo de diferenciación dirigida (53), algo que en nuestras células tuvo lugar antes. Otros protocolos llevados a cabo utilizando *iPSCs* a tiempos de 21 días, presentan valores en los marcadores de hipertrofia bajos (67). Esto podría indicar que la duración de los protocolos de diferenciación condrogénica todavía deben optimizarse y establecerse unos valores

óptimos y estándar que faciliten la obtención de conclusiones y la comparación entre estudios.

Los marcadores de formación de cartílago articular mostraron resultados diferentes para ambas líneas, en el caso de la línea “sana” la expresión de ambos genes fue similar tanto a t0 como tras el protocolo de diferenciación. En cambio, en la línea artrósica, los valores del gen COL-2A aumentaron tras la diferenciación, pero, con respecto al gen *AGG*, estos valores se vieron reducidos. A pesar de que cabría esperar que los NRE del COL-2A fueran superiores en la línea “sana” que en la línea “OA”, todavía no existen estudios en los que se comparen resultados de la diferenciación condrogénica en este tipo de líneas, ya que todavía no han sido generadas. Teniendo esto en cuenta y considerando el pequeño tamaño muestral de nuestro estudio, resulta difícil concluir el porqué de estos resultados. No obstante, estudios realizados con otro tipo de células madre sugieren que la capacidad proliferativa y de diferenciación condrogénica de las células procedentes de pacientes con OA es menor que la de pacientes “sanos” (68).

Cabe destacar además que, a pesar de que mediante histología prácticamente no se detectó expresión de colágenos mediante las tinciones TM y AT, sí se observó expresión de colágeno de tipo 1, 10 o 2 en los análisis moleculares. Estos resultados no concuerdan con otros estudios en los que se observa que los análisis moleculares se corresponden con los resultados obtenidos mediante histología (53,64). En nuestro caso, podría ser debido a que a pesar de que se están expresando dichos genes, todavía es pronto para poder observar sus niveles en forma de proteína, lo que ilustraría nuevamente la necesidad de optimizar los tiempos de duración de los protocolos actuales de diferenciación condrogénica de las *iPSCs*, así como de las células madre en general.

Por otro lado, la formación de *EBs* a partir de *iPSCs* es un método común para producir diferentes linajes celulares con diversas aplicaciones. Los métodos de cultivo de *EBs* más comunes, como el método de *hanging drop*, son utilizados para inducir la diferenciación condrogénica de las *iPSCs* (69).

En este trabajo, se decidió testar también la capacidad de diferenciación condrogénica de las líneas de *iPSCs* mediante la formación de *EBs*, ya que se ha demostrado que esta estructura 3D facilita la cohesividad y aumenta la producción de *ECM* (10,50). Durante el cultivo libre de *feeder*, se observó que cuando la confluencia celular era elevada, se formaban *EBs* espontáneos. Como la condensación de las células es fundamental para la diferenciación condrogénica de las células madre (70), decidimos recoger dichos *EBs* espontáneos y estimular su diferenciación de acuerdo al protocolo de cultivo de diferenciación dirigida. La evaluación histológica de los esferoides no mostró buenos resultados para la presencia de colágeno y PGs, aunque si se detectó presencia celular por la tinción de H-E. Estos resultados observados difieren con los obtenidos por otros estudios que sugieren que la estimulación de las células madre en cultivo tridimensional a modo de *EBs*, junto con su cultivo en un medio suplementado con factores condrogénicos como el *TGF-β* o *BMP-2*, permite obtener NRE elevados de COL-2 y AGG (71). Cabe destacar finalmente que en nuestro estudio no se pudo realizar un análisis molecular del protocolo de *EBs* espontáneos por falta de muestras, por lo que sería interesante repetir el experimento con el fin de poder llevar a cabo análisis moleculares y obtener así resultados más concluyentes.

Dado que no se obtuvieron análisis moleculares en el segundo protocolo no se pueden comparar los resultados de ambos, aunque basándonos en la histología se podría decir que se obtuvieron mejores resultados con el protocolo de diferenciación dirigida. Una posible explicación podría ser que la estimulación con Activina A y *Wnt-3a* sea más efectiva para estimular células en monocapa que células ya agregadas, aunque tal y como se mencionó las conclusiones que se obtengan deben ser tomadas con precaución dado el escaso tamaño muestra del estudio y a la ausencia de resultados de biología molecular en el segundo protocolo de diferenciación.

En futuros trabajos sería interesante realizar estos experimentos con las modificaciones en los protocolos comentadas anteriormente, o adaptar las células a un sistema libre de *feeder* más adecuado para el protocolo de

diferenciación condrogénica dirigida (72). Por otra parte, sería interesante obtener controles negativos de los esferoides de las líneas de *iPSCs* previos a la diferenciación y poder realizar así una comparación. Otra modificación posible podría ser la toma de datos a un tiempo de diferenciación intermedio, como el cultivo tras tres días con medio hacia mesendodermo, para tener más datos acerca de la evaluación de la diferenciación celular a lo largo de todo el protocolo.

Para concluir cabe destacar que, en general, no se obtuvieron los resultados esperados con respecto al protocolo descrito previamente por Yamashita y colaboradores (53). 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 el modelado de la *OAm* empleando estas líneas de *iPSCs*.

9. CONCLUSIONES

1. La utilización de una matriz de Laminina 521 y el medio de cultivo *Stemflex* permite adaptar las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 a un cultivo libre de *feeder*.
2. El protocolo de diferenciación condrogénica dirigida permite diferenciar condrogenicamente las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7.
3. El protocolo de diferenciación basado en la utilización de los *EBs* espontáneos no permite diferenciar condrogenicamente las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 ni MOAFiPS 15/645#7.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Gabay O, Gabay C. Hand osteoarthritis: New insights. *Jt Bone Spine*. 2013;80(2):130–4.
2. Ng HY, Lee AA, Shen KX. Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. *JSM Bone Jt Dis*. 2017;1(2):1010.
3. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1697–707.
4. Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1(6):461–8.
5. Jørgensen AEM, Kjær M, Heinemeier KM. The Effect of Aging and Mechanical Loading on the Metabolism of Articular Cartilage. *J Rheumatol*. 2017;44(4):410–7.
6. Gomoll AH, Minas T. The quality of healing : Articular cartilage. *Wound repair Regen*. 2014;22:30–8.
7. Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015;386:376–87.
8. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Athanasiou KA, Hu JC. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;11(1):21–34.
9. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, Bates N, Grady LM, Soncin F, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol*. 2010;28(11):1187–94.
10. Driessen BJH, Logie C, Vonk LA. Cellular reprogramming for clinical cartilage repair. *Cell Biol Toxicol*. 2017;33(4):329–49.
11. Boettcher K, Kienle S, Nachtsheim J, Burgkart R, Hugel T, Lieleg O. *Acta Biomaterialia* The structure and mechanical properties of articular cartilage are highly resilient towards transient dehydration. *Acta Biomater*. 2016;29:180–7.

12. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(8):1233–41.
13. Musumeci G, Aiello FC, Szychlinska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: Risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):6093–112.
14. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(7):412–20.
15. Wang X, Zhai M, Zhao Y, Yin J. A review of articular cartilage and osteoarthritis studies by Fourier transform infrared spectroscopic imaging. *Ann Jt.* 2018;3(6):9–9.
16. Blanco FJ. Osteoarthritis: Something is moving. *Reumatol Clínica.* 2014;10(1):4–5.
17. Leung GJ, Rainsford KD, Kean WF. Osteoarthritis of the hand I: Aetiology and pathogenesis, risk factors, investigation and diagnosis. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66(3):339–46.
18. Seoane-mato D, Sánchez-piedra C, Silva-fernández L, Sivera F, Blanco FJ, Ruiz P, et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Adult Population in Spain (EPISER 2016 Study): Aims and Methodology. *Reumatol Clínica.* 2017;15(2):90–6.
19. Wang X, Hunter D, Xu J, Ding C. Metabolic triggered inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(1):22–30.
20. Musumeci G, Szychlinska MA, Mobasher A. Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: Molecular markers of senescent chondrocytes. *Histol Histopathol.* 2015;30(1):1–12.
21. Zhang W, Ouyang H, Dass CR, Xu J. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Res.*

2016;4:15040.

22. Ishimori ML, Altman RD, Cohen MJ, Cui J, Guo X, Rotter JI, et al. Heritability patterns in hand osteoarthritis: the role of osteophytes. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R180.
23. Marshall M, Watt FE, Vincent TL, Dziedzic K. Hand osteoarthritis: clinical phenotypes, molecular mechanisms and disease management. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(11):641–56.
24. Feydy A, Pluot E, Guerini H, Drapé JL. Osteoarthritis of the Wrist and Hand, and Spine. *Radiol Clin North Am.* 2009;47(4):723–59.
25. Beane OS, Darling EM. Isolation, Characterization, and Differentiation of Stem Cells for Cartilage Regeneration. *Ann Biomed Eng.* 2013;40(10):2079–97.
26. Zakrzewski W, Dobrzy M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells : past , present , and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68.
27. Qi SD, Smith PD, Choong PF. Nuclear reprogramming and induced pluripotent stem cells: a review for surgeons. *ANZ J Surg.* 2014;84:417–23.
28. Bindu H, Cell JS, Ther R, A HB, Srilatha B. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *J Stem Cell Res Ther.* 2011;1(3):115.
29. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68.
30. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2015;17(1):11–22.
31. Alvarado AS, Yamanaka S. Rethinking differentiation: Stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell.* 2014;157(1):110–9.
32. Brouwer M, Zhou H, Nadif Kasri N. Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent

- Stem Cell Reprogramming Strategies. *Stem Cell Rev Reports*. 2016;12(1):54–72.
33. Ding Z, Sui L, Ren R, Liu Y, Xu X, Fu L, et al. A widely adaptable approach to generate integration-free iPSCs from non-invasively acquired human somatic cells. *Protein Cell*. 2015;6(5):386–9.
 34. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
 35. Narita M, Yamanaka S, Ichisaka T, Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
 36. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev*. 2009;30(3):204–13.
 37. Saha B, Borgohain M, Dey C, Thummer R. iPS Cell Generation : Current and Future Challenges. *Ann Stem Cell Res Ther*. 2018;1(2):1007.
 38. Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. A high efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):340–345.
 39. Malik N, Rao MS. A Review of the Methods for Human iPSC Derivation. In: *Pluripotent Stem Cells: Methods and Protocols*. New York; 2013. p. 23–33.
 40. Kent L. Culture and Maintenance of Human Embryonic Stem Cells. *J Vis Exp*. 2009;34:3–5.
 41. Khan FA, Almohazey D, Alomari M, Almofty SA. Isolation, Culture, and Functional Characterization of Human Embryonic Stem Cells: Current Trends and Challenges. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1–8.
 42. Amit M, Itskovitz-Eldor J. Feeder-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells. *Methods Enzymol*. 2006;420(06):37–49.

43. Yu G, Kamano Y, Wang F, Okawa H. Feeder Cell Sources and Feeder-Free Methods for Human iPS Cell Culture. In: Interface Oral Health Science 2014. 2015. p. 145–59.
44. Skottman H, Hovatta O. Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2006;132:691–698.
45. Colman A, Dreesen O. Pluripotent Stem Cells and Disease Modeling Alan. *Cell Stem Cell*. 2009;5(3):244–7.
46. Saha K, Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell*. 2009;5(6):584–95.
47. Teoh HK, Cheong SK. Induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Malays J Pathol*. 2012;34(1):1–13.
48. Wei Y, Wei Y, Zeng W, Wan R, Wang J, Zhou Q, et al. Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix. *Eur cells Mater*. 2012;23:1–12.
49. Lietman SA. Induced pluripotent stem cells in cartilage repair. *World J Orthop*. 2016;7(3):149.
50. Foty R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J Vis Exp*. 2011;20:4–7.
51. Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, et al. Induced Pluripotent Stem Cells for cartilage repair: current status and future perspectives. *Eur Cells Mater*. 2018;36:96–109.
52. Woods A, Wang G, Beier F. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11626–34.
53. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015;4(3):404–18.

54. Pelttari K, Steck E, Richter W, Ding Z, Sui L, Ren R, et al. Cellular reprogramming for clinical cartilage repair. *Cell Biol Toxicol.* 2015;6(3):329–49.
55. Guzzo RM, Drissi H. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Chondrocytes. In: *Cartilage Tissue Engineering: Methods and Protocols*,. 2012. p. 79–95.
56. Castro Viñuelas R. Células madre pluripotentes inducidas : generación, caracterización y aplicaciones en el estudio y tratamiento de la artrosis. 2019.
57. Goldring MB, Birkhead JR, Suen L, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, et al. Interleukin-1 β – modulated gene expression in immortalized chondrocytes. *J Clin Invest.* 1994;94:2307–16.
58. Thyssen S, Luyten FP, Lories RJU. Targets , models and challenges in osteoarthritis research. *Dis Model Mech.* 2015;8:17–30.
59. Albalushi H, Kurek M, Karlsson L, Landreh L, Kjartansdóttir KR, Söder O, et al. Laminin 521 Stabilizes the Pluripotency Expression Pattern of Human Embryonic Stem Cells Initially Derived on Feeder Cells. *Stem Cells Int.* 2018;2018:9.
60. Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, et al. Enzyme-free passage of human pluripotent stem cells by controlling divalent cations. *Sci Rep.* 2014;4:1–7.
61. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007;25(6):681–6.
62. Ye H, Wang Q. Efficient Generation of Non-Integration and Feeder-Free Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral Blood Cells by Sendai Virus. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(4):1318–31.
63. Craft AM, Rockel JS, Nartiss Y, Kandel RA, Alman BA, Keller GM. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem

- cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33(6):638–45.
64. Nejadnik H, Diecke S, Lenkov OD, Chapelin F, Donig J, Tong X, et al. Improved Approach for Chondrogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports.* 2015;11(2):242–53.
 65. Matsumoto E, Furumatsu T, Kanazawa T, Tamura M, Ozaki T. ROCK inhibitor prevents the dedifferentiation of human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;420(1):124–9.
 66. Lee J, Taylor SEB, Smeriglio P, Lai J, Maloney WJ, Yang F, et al. Early induction of a prechondrogenic population allows efficient generation of stable chondrocytes from human induced pluripotent stem cells. *FASEB J.* 2015;29(8):3399–410.
 67. Ko J, Kim K, Park S, Im G. In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials.* 2014;35(11):3571–81.
 68. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(3):704–13.
 69. Rungarunlert S, Techakumphu M, Pirity MK, Dinnyes A. Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells : Benefits of bioreactors. *World J Stem Cells.* 2009;1(1):11–21.
 70. Toh WS, Yang Z, Liu H, Heng BC, Lee EH, Cao T. Effects of Culture Conditions and Bone Morphogenetic Protein 2 on Extent of Chondrogenesis from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 2007;25(4):950–60.
 71. Lach M, Trzeciak T, Richter M, Pawlicz J, Suchorska WM. Directed differentiation of induced pluripotent stem cells into chondrogenic lineages for articular cartilage treatment. *J Tissue Eng.* 2014;5(135):1–9.

72. Stefan, Lach M, Joanna W, Katarzyna K, Magdalena R, Tomasz T, Maria, Suchorska W. Chondrogenic Differentiation of Pluripotent Stem Cells under Controllable Serum-Free Conditions. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2711):1–15.

11. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo agradeciendo a mis tutores, la Dra. Silvia María Díaz Prado y el Dr. Isaac Manuel Fuentes Boquete, por haberme dado la oportunidad de hacer este trabajo.

Por supuesto, gracias a Rocío por toda su paciencia, tiempo y dedicación, por guiarme en el día a día, por resolver todas mis dudas y, en definitiva, por enseñarme prácticamente todo lo que sé sobre *iPSCs*, sin ti no hubiese aprendido tanto este año.

Gracias al grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, en especial a María y Silvia, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por resolver los problemas que me surgían.

A mis compañeros de Máster, Alba, Alex, David, María y Marina, por haber compartido este año conmigo, gracias por todo, sin vosotros no hubiese sido posible.

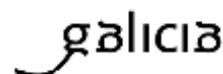
Gracias a ti, Helena, por tu apoyo incondicional y tu paciencia, por creer en mí y no dejar que me rinda en perseguir mis sueños.

Y por último, gracias a mis padres y a mi hermano Iván, por ofrecerme su apoyo y su cariño, por estar siempre ahí y aguantarme en todos los momentos difíciles.

12. ANEXOS



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Saúde
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; celc@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE A CORUÑA-FERROL

Carlos Rodríguez Moreno, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 21/01/2015 el estudio:

Título: Creación de modelos humanos celulares de artrosis (de rodilla, cadera y manos) y modelos humanos celulares sanos generados en células madre pluripotentes inducidas (iPS).

Promotor: Silvia M^a Díaz Prado, Isaac Manuel Fuentes Boquete

Tipo de estudio: Otros

Version:

Código del Promotor:

Código de Registro: 2014/405

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y el la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
C.H.U de A Coruña	Silvia M ^a Díaz Prado, Isaac Manuel Fuentes Boquete

En Santiago de Compostela, a
El secretario





Subdirección General de Investigación
en Terapia Celular y Medicina Regenerativa



D^a. Rocío Mosquera Álvarez
Consejería de Sanidad
Xunta de Galicia
Edificio Administrativo de San Lázaro
15703 Santiago de Compostela – A coruña

Madrid, a 14 de abril de 2015

La Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos, en base a lo acordado en la reunión de 13 de abril de 2015, y bajo la presidencia del Director del Instituto de Salud Carlos III, acordó informar el siguiente proyectos presentado por ese Departamento:

335 282 1 Creación de modelos humanos celulares de artrosis (rodilla, cadera y manos) y modelos humanos celulares sanos generados en células madre pluripotentes inducidas (iPS)

Se informa favorablemente.

Se le recuerda la obligación de remitir a esta Comisión un breve informe anual sobre la evolución de los proyectos, indicando posibles publicaciones o comunicaciones a congresos.

Todo lo cual pongo en su conocimiento en cumplimiento de lo dispuesto en la Ley 14/2007 de 4 de julio de Investigación Biomédica.

Atentamente,



Javier Arias Díaz
Secretario de la Comisión de Garantías para la Donación
Y Utilización de Células y Tejidos Humanos



Monforte de Lemos, núm. 5
28010 Madrid

Teléfono 91 8222103 / 85
Fax 91 9711111

