

Optimización de las condiciones de cultivo de líneas celulares condrocíticas inmortalizadas

Optimización das condicións de cultivo de
líneas celulares condrocíticas inmortalizadas

Optimization of culture conditions of
immortalized chondrocytic cell lines

Elena Córdoba Clavero

Febrero 2021

Facultad de Ciencias
Instituto de Investigación Biomédica
de A Coruña

Optimización de las condiciones de cultivo de líneas celulares condrocíticas inmortalizadas

Optimización das condicións de cultivo de
líneas celulares condrocíticas inmortalizadas

Optimization of culture conditions of
immortalized chondrocytic cell lines

CORDOBA
CLAVERO
ELENA -
533732635

Firmado
digitalmente por
CORDOBA CLAVERO
ELENA - 533732635
Fecha: 2021.02.05
09:33:49 +01'00'

Elena Córdoba Clavero

En A Coruña, a 5 de febrero de 2021

Autorización de las tutoras:

La Dra. Silvia María Díaz Prado y la Dra. Clara Sanjurjo Rodríguez del área de Anatomía y Embriología Humana, en calidad de tutoras de este Trabajo de Fin de Máster

AUTORIZAN

Presentación ante el Tribunal de evaluación el trabajo “Optimización de las condiciones de cultivo de líneas celulares condrocíticas inmortalizadas” que Dña Elena Córdoba Clavero ha realizado bajo nuestra dirección.

DIAZ
PRADO
SILVIA
MARIA - DNI
32823979N

Firmado
digitalmente por
DIAZ PRADO
SILVIA MARIA -
DNI 32823979N
Fecha: 2021.02.05
22:15:34 +01'00'

Dra. Silvia María Díaz Prado

SANJURJO
RODRIGUEZ
CLARA -
47353452V

Firmado
digitalmente por
SANJURJO
RODRIGUEZ CLARA
- 47353452V
Fecha: 2021.02.05
11:51:15 +01'00'

Dra. Clara Sanjurjo Rodríguez

Área de Anatomía y Embriología Humana

Dpto. Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidade da Coruña

En A Coruña a 5 de febrero de 2021

AGRADECIMIENTOS

A todas y cada una de las personas que han hecho posible, no solo la realización de este trabajo, sino también que mi paso por A Coruña haya sido una experiencia increíble.

A la Dra. Silvia María Díaz Prado por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo de investigación y a la Dra. María Carmen Veiga Barbazán por haberme ayudado a buscar este trabajo. A la Dra. Clara Sanjurjo Rodríguez, María y Silvia por haberme guiado, por toda su ayuda y sus consejos. Gracias por haber confiado en mí, por hacerme sentir una más en vuestro trabajo y por todo lo que me habéis enseñado en este tiempo.

A Laura, Mónica, Pedro, Adrián, Lucía, María, Roque, Alba, Junquera, Ana María y Marcos. Un millón de gracias por este año y medio lleno de buenos momentos y por todo el apoyo mutuo que nos hemos dado. Sois lo mejor que me ha dado este máster y os voy a llevar siempre conmigo.

A mi compañera de piso María. No me ha hecho falta mucho tiempo para saber que eres una persona increíble y estoy segura de que estos meses no hubiesen sido lo mismo sin ti. Gracias por preocuparte por mí, por tu apoyo incondicional y por nuestras noches de Netflix. Espero que esto sea el comienzo de una bonita amistad.

A mis padres y a mi hermana. Gracias por confiar en mí, por apoyarme en todas mis decisiones y por darme alas para poder cumplir mi sueño. Sois lo más importante de mi vida.

A María, Azahara, Paula y Ernesto. Gracias por vuestra amistad durante todos estos años y por estar ahí incluso en la distancia. Volver a casa siempre es especial gracias a vosotros.

A Abel. Gracias por todo tu apoyo, por intentar entender lo que hago y por estar presente incluso a 4000 km. Nunca pensé que se podría sentir tan cerca a una persona que está tan lejos. No puedo estar más feliz por comenzar una nueva etapa contigo. Te quiero.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	I
RESUMEN	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El cartílago articular hialino	1
1.1.1. <u>Composición del cartílago articular hialino</u>	1
1.1.2. <u>Estructura del cartílago articular hialino</u>	2
1.1.3. <u>Mantenimiento del cartílago</u>	3
1.2. Artrosis	3
1.2.1. <u>Tratamiento de la artrosis</u>	5
1.3. Fuentes celulares en el estudio de la artrosis	6
1.3.1. <u>Condrocitos</u>	6
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1. Material biológico	9
3.2. Condiciones de cultivo	9
3.3. Medios, soluciones y reactivos	9
3.4. Cultivo y expansión celular en monocapa	10
3.4.1. <u>Recuento celular</u>	11
3.4.2. <u>Subcultivo y congelación celular</u>	11
3.5. Cultivo celular en micromasas empleando distintos medios de diferenciación condrogénica	12
3.6. Estudio de la expresión de marcadores típicos de condrocitos primarios	12
3.6.1. <u>Análisis histológico</u>	12
3.6.2. <u>Análisis de la concentración de glucosaminoglicanos en la matriz extracelular</u>	13
3.6.3. <u>Extracción de ARN, PCR con transcriptasa inversa y PCR cuantitativa</u>	13
3.6.3.1. <i>Extracción de ARN</i>	14
3.6.3.2. <i>PCR con transcriptasa inversa</i>	14
3.6.3.3. <i>PCR cuantitativa</i>	15
4. RESULTADOS	17
4.1. Cultivo y expansión celular en monocapa	17

4.2. Cultivo celular en micromasas empleando diferentes medios de diferenciación condrogénica	17
4.3. Estudio de la expresión de marcadores típicos de condrocitos primarios	18
4.3.1. <u>Análisis histológico</u>	18
4.3.2. <u>Análisis de la concentración de glucosaminoglicanos</u>	21
4.3.3. <u>Análisis de la expresión génica de los marcadores típicos de condrocitos primarios</u>	22
5. DISCUSIÓN	26
6. CONCLUSIONES	30
7. BIBLIOGRAFÍA	31
8. ANEXOS	35
8.1. Anexo I: Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol	35

LISTADO DE ABREVIATURAS

260TT: línea inmortalizada de condrocitos artrósicos

2D: dos dimensiones

3D: tres dimensiones

Acan / *ACAN*: agrecano

ACI: *Autologous chondrocyte implantation*; Implantación de Condrocitos Autólogos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

ARN: ácido ribonucleico

BMP-7: proteína morfogénica ósea 7

CAS: muestra correspondiente a la micromasa formada en el medio de diferenciación condrogénica casero

CD105: endoglina

CD34: antígeno 1 de célula progenitora hematopoyética

CD45: antígeno leucocitario común

CD73: 5'-nucleotidasa

CD90: antígeno 1 de diferenciación de timocitos

CO₂: dióxido de carbono

Col II / *COL II*: colágeno tipo II

COM: muestra correspondiente a la micromasa formada en el medio de diferenciación condrogénica comercial

CT: Crossing Thresold; ciclo umbral

D10: muestra correspondiente a la micromasa formada en DMEM 10%

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

G+C: guanina + citosina

GAG: glucosaminoglicanos

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

H-E: hematoxilina-eosina

HIF-1 α : subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia

HOXD9: Homeobox D9

hTERT: transcriptasa reversa de la telomerasa humana

INIBIC: Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

ITS: insulina-transferrina-selenio

KO-SR: suero *knockout*

MEC: matriz extracelular

ml: mililitros

mm: milímetros

MMP13: metaloproteinasa de matriz 13

MSCs: Mesenchymal Stromal Cells; células mesenquimales estromales

NaH₂PO₄: fosfato monosódico

Na₂HPO₄: fosfato disódico

NKX3.2: Homeobox 2 NK3

ng: nanogramos

nm: nanómetros

OARSI: *Osteoarthritis Reseach Society International*; Sociedad Internacional de Investigación de la Artrosis

P/E: penicilina/estreptomicina

p53: antígeno de tumor celular p53

pb: pares de bases

PBS: *Phosphate Buffer Saline*; tampón fosfato salino

PCR: *Polymerase Chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*; PCR cuantitativa

Rb: proteína del retinoblastoma

RNA 18S: ARN ribosomal 18S

RPL13: proteína ribosomal L13

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*; PCR con transcriptasa inversa

SBF: suero bovino fetal

SO: safranina O

Sox9 / SOX9: región determinante del sexo del cromosoma Y – caja 9

SV40: *simian virus 40*; virus simio 40

t0: control de condrocitos a tiempo 0 para los experimentos de biología molecular

TGF- β : *transforming growth factor beta*; factor de crecimiento transformante beta

TGF- β 1: *transforming growth factor beta 1*; factor de crecimiento transformante beta 1

TGF- β 3: *transforming growth factor beta 3*; factor de crecimiento transformante beta 3

TM: tricrómico de Masson

Tm: *Melting Temperature*; temperatura de fusión

YWHAZ: proteína zeta de activación de tirosina 3-monooxigenasa / triptófano 5-monooxigenasa

μm : micrómetros

μl : microlitros

RESUMEN

La artrosis es una enfermedad heterogénea que afecta a las articulaciones móviles y se caracteriza por estrés celular y degradación de la matriz extracelular (MEC) y del hueso subcondral. Afecta a más de 250 millones de individuos mundialmente y es la principal causa de dolor crónico y limitaciones de movilidad, sobre todo, en personas mayores. Sin embargo, a pesar de todos los avances en investigación, hasta la fecha no existe ningún tratamiento efectivo capaz de curar la artrosis, debido a la falta de conocimiento de la patogénesis de la enfermedad. Existen diferentes tratamientos paliativos e incluso técnicas de terapia celular, pero todavía son incapaces de restaurar el cartílago dañado y devolver la función normal a la articulación. Por tanto, los retos en investigación se centran en estudiar la fisiopatología de la artrosis para encontrar, en última instancia, un tratamiento definitivo.

El objetivo de este estudio consistió en optimizar las condiciones de cultivo de una línea inmortalizada de condrocitos artrósicos que se pudiese utilizar como modelo *in vitro* para estudiar la fisiopatología de la artrosis. Los condrocitos fueron previamente inmortalizados en el laboratorio mediante la transducción del antígeno T grande del virus simio 40 (SV40) y la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT). Estas células se cultivaron y expandieron en monocapa para después cultivarlas en tres dimensiones (3D) formando micromasas en diversos medios de cultivo.

Se realizó un análisis histológico, un análisis de la concentración de glucosaminoglicanos (GAGs) y la medición de la expresión de los marcadores de condrocitos primarios [región determinante del sexo del cromosoma Y – caja 9 (*SOX9*), colágeno tipo II (*COL II*) y agrecano (*ACAN*)] mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*qPCR*). Estos resultados confirmaron que no se detectó expresión de *COL II* y *ACAN* en las micromasas formadas en los medios de diferenciación condrogénica, mientras que sí se detectó expresión de *SOX9*, un marcador temprano de condrogénesis, en todas las muestras.

La conclusión principal de este trabajo es que no se han conseguido determinar correctamente las condiciones de cultivo idóneas de la línea inmortalizada de condrocitos artrósicos que puedan favorecer la expresión de los marcadores típicos de condrocitos primarios, ya que solo se detectó expresión de un marcador de condrocitos.

Palabras clave: artrosis, inmortalización, modelo *in vitro*, micromasa, diferenciación

RESUMO

A artrose é unha enfermidade heteroxénea que afecta ás articulacións móbiles e caracterízase por estrés celular e degradación da matriz extracelular (MEC) e do óso subcondral. Afecta a máis de 250 millóns de individuos en todo o mundo e é a principal causa de dor crónica e limitacións de mobilidade, especialmente en persoas maiores. Non obstante, a pesar de todos os avances na investigación, ata a data non existe un tratamento eficaz capaz de curar a artrose, debido ao descoñecemento da patoxénese da enfermidade. Existen diferentes tratamentos paliativos e incluso técnicas de terapia celular, pero aínda así son incapaces de restaurar a cartilaxe danada e devolver a función normal á articulación. Polo tanto, os retos da investigación céntranse en estudar a fisiopatoloxía da artrose para atopar, en definitiva, un tratamento definitivo.

O obxectivo deste estudo foi optimizar as condicións de cultivo dunha liña inmortalizada de condrocitos artrósicos que se poderían empregar como modelo *in vitro* para estudar a fisiopatoloxía da artrose. Os condrocitos foron inmortalizados previamente no laboratorio polo antixeno T grande 40 do virus simiano (SV40) e a transcriptase inversa da telomerasa humana (hTERT). Estas células cultiváronse e expandíronse nunha monocapa e despois cultiváronse en tres dimensións (3D) formando micromasa en varios medios.

Realizouse unha análise histolóxica, unha análise da concentración de glicosaminoglicanos (GAGs) e a medición da expresión dos marcadores condrocitarios primarios [rexión determinante do sexo do cromosoma Y - caixa 9 (*SOX9*), coláxeno tipo II (*COL II*) e aggrecano (*ACAN*)] por reacción en cadea cuantitativa a tempo real da polimerasa (*qPCR*). Estes resultados confirmaron que non se detectou ningunha expresión de *COL II* e *ACAN* nas micromasas formadas nos medios de diferenciación condroxénicos, mentres que se detectou a expresión de *SOX9*, un marcador inicial da condroxénese, en todas as mostras.

A principal conclusión deste traballo é que non foi posible determinar correctamente as condicións de cultivo ideais da liña inmortalizada de condrocitos artrósicos que poden favorecer a expresión dos marcadores típicos dos condrocitos primarios, xa que só se detectou unha expresión de marcador.

Palabras chave: artrose, inmortalización, modelo *in vitro*, micromasa, diferenciación

ABSTRACT

Osteoarthritis is a heterogeneous illness that affects mobile joints and is characterised by cellular stress and degradation of the extracellular matrix (ECM) and subchondral bone. It affects more than 250 million people worldwide and is the main cause of chronic pain and mobility limitations, especially in older people. Nevertheless, despite the advances in research, nowadays there are not effective treatments capable of treating osteoarthritis, due to the lack of knowledge of its pathogenesis. There are different palliative treatments and even cell therapy techniques, but they are still unable to regenerate damaged cartilage and restore normal function to the joint. Therefore, research challenges focus on studying the pathophysiology of osteoarthritis to find a definitive treatment.

The objective of this study was to optimize the culture conditions of an immortalized osteoarthritic chondrocytes line that could be used as an *in vitro* model to study the pathophysiology of osteoarthritis. Chondrocytes were previously immortalized in the laboratory by the transduction of simian virus 40 large T antigen (SV40) and human telomerase reverse transcriptase (hTERT). We cultured and expanded these cells in a monolayer culture and then cultured them in three dimensions (3D) by forming micromasses in different media.

We performed a histological analysis, an analysis of the glycosaminoglycans (GAGs) concentration and the measurement of the expression of primary chondrocyte markers [SRY-box transcription factor 9 (*SOX9*), type II collagen (*COL II*) and aggrecan (*ACAN*)] by real time quantitative polymerase chain reaction (*qPCR*). These results confirmed that *COL II* and *ACAN* were not expressed in the micromasses formed in the chondrogenic differentiation media. On the other hand, we detected the expression of *SOX9*, an early marker of chondrogenesis, in all samples.

The main conclusion of this study is that it has not been possible to correctly determine the ideal culture conditions of the immortalized osteoarthritic chondrocytes line that can benefit the expression of the typical markers of primary chondrocytes, since we could only detect the expression of one marker.

Key words: osteoarthritis, immortalization, *in vitro* model, micromass, differentiation

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cartílago articular hialino

El cartílago articular hialino es un tejido conjuntivo especializado que se localiza en la superficie de articulaciones sinoviales como son la rodilla o la cadera (Carballo et al., 2017; Armiento et al., 2019). La función principal del cartílago es proporcionar una superficie de deslizamiento capaz de resistir la compresión sin forzar el hueso subcondral subyacente (Palukuru et al., 2014; Vinod et al., 2019). Este tejido se caracteriza por ser avascular, aneural y alinfático (Mobasheri et al., 2014).

1.1.1. Composición del cartílago articular hialino

El cartílago hialino está compuesto por matriz extracelular (MEC) y por condrocitos que se encargan de sintetizar dicha MEC y de mantener la homeostasis del cartílago (Zuliani et al., 2018).

La MEC está compuesta principalmente por un 15-25% de fibras de colágeno tipo II (Col II), un 5-10% de proteoglicanos y un 70-80% de agua (Palukuru et al., 2014). En menor proporción existen otros tipos de colágeno, como son los de tipo VI, IX, X y XI, que aseguran la resistencia a la tensión y la organización estructural del cartílago. Por otra parte, los proteoglicanos son proteínas hidrofílicas que presentan una o más cadenas de glucosaminoglicanos (GAG) unidas. El agrecano (Acan) es el proteoglicano más abundante de la MEC del cartílago y presenta varias cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato unidas. Esta unión hace que la proteína retenga agua, proporcionando flexibilidad y elasticidad al cartílago, permitiéndole amortiguar golpes (Demoor et al., 2014; Carballo et al., 2017).

Los condrocitos son células especializadas que representan el 2% del volumen total del cartílago y se encuentran embebidos en su MEC. Estas células reciben oxígeno y nutrientes por difusión desde el líquido sinovial y del hueso subcondral, ya que el cartílago es un tejido avascular. Aun así, la concentración de oxígeno en el tejido es baja por lo que los condrocitos dependen también de un metabolismo anaerobio. Principalmente, estas células se encargan de producir Col II y Acan, que son algunos de los marcadores fenotípicos característicos del cartílago articular (Demoor et al., 2014).

1.1.2. Estructura del cartílago articular hialino

El cartílago hialino presenta una estructura única en la que los condrocitos organizan el colágeno, los proteoglicanos y otras proteínas para formar la MEC. La composición, estructura y función de los condrocitos varía en función de la localización que presentan en el cartílago (Mobasheri et al., 2014).

Morfológicamente, existen diferentes capas en el cartílago que se diferencian entre sí por la densidad celular, la composición de la MEC y la orientación de las fibras de colágeno respecto a la superficie articular y el hueso subcondral (Mobasheri et al., 2014). Así, la capa superficial es la más delgada y presenta las fibras de colágeno paralelas a la superficie. En esta capa, los condrocitos son aplanados y la concentración de proteoglicanos es baja. A continuación, en la capa media la densidad celular es menor y los condrocitos son redondos. Aquí, las fibras de colágeno se disponen de manera aleatoria y la concentración de Acan es elevada. En la capa radial las fibras de colágeno se disponen perpendicularmente a la superficie y los condrocitos forman columnas verticales. Esta capa se caracteriza por ser la zona con mayor contenido en colágeno y proteoglicanos, mientras que la densidad celular es la más baja. Por último, la zona calcificada se caracteriza por una matriz rica en colágeno tipo X, responsable de la integridad estructural del cartílago, y por un número escaso de condrocitos con baja actividad metabólica (Bhosale et al., 2008; Mobasheri et al., 2014) (**figura 1**).

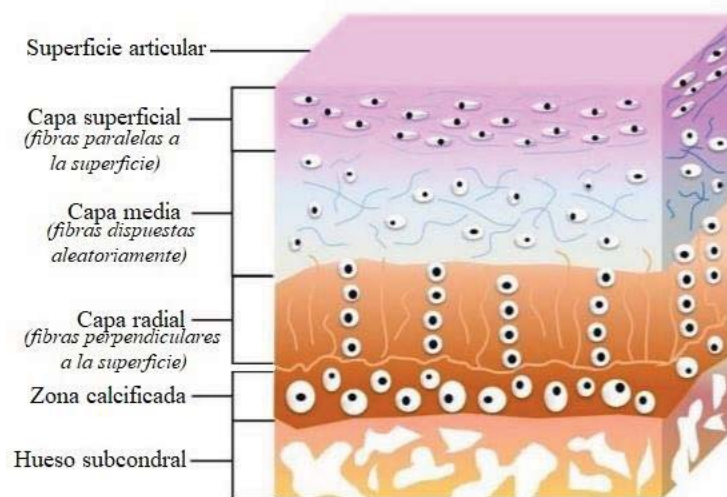


Figura 1. Esquema de las diferentes capas del cartílago hialino en el que se muestra la disposición de las fibras de colágeno y de los condrocitos. (Figura modificada de: Ng et al., 2017).

1.1.3. Mantenimiento del cartílago

Los condrocitos regulan la composición del cartílago en respuesta a señales mecánicas y químicas. La habilidad de estas células para detectar alteraciones en la composición macromolecular y la organización de la MEC es importante para su remodelación (Mobasheri et al., 2014). La renovación del cartílago resulta del equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos de los condrocitos (Armiento et al., 2019), de manera que cualquier daño o proceso degenerativo que interrumpa este equilibrio puede dar lugar a la activación aberrante de genes catabólicos y pro-inflamatorios como citoquinas, óxido nítrico o prostaglandinas (Carballo et al., 2017).

Aunque el cartílago articular puede tolerar un estrés físico continuo, presenta una capacidad limitada de regeneración (Mobasheri et al., 2014). Por tanto, tras producirse un daño en la articulación no se produce una respuesta típica de reparación del tejido, que consiste en una cascada de necrosis, inflamación, reparación y remodelación de la cicatriz (Bhosale et al., 2008). Todo esto, a largo plazo, puede dar lugar a una inestabilidad y a una pérdida de movilidad en la articulación, produciéndose lo que se conoce como una artrosis secundaria (Byers Kraus et al., 2016; Yang et al., 2020).

1.2. Artrosis

Según la Sociedad Internacional de Investigación de la Artrosis (*OARSI*), la artrosis se puede definir como un trastorno heterogéneo que involucra las articulaciones móviles y se caracteriza por estrés celular y degradación de la MEC. La enfermedad se manifiesta primero como un trastorno molecular producido por un metabolismo anormal del tejido articular, seguido de trastornos anatómicos y/o fisiológicos como la degradación del cartílago, la remodelación ósea, la formación de osteofitos, etc. y, finalmente, la pérdida de la función articular normal (Byers-uKras et al., 2016) (**figura 2**).

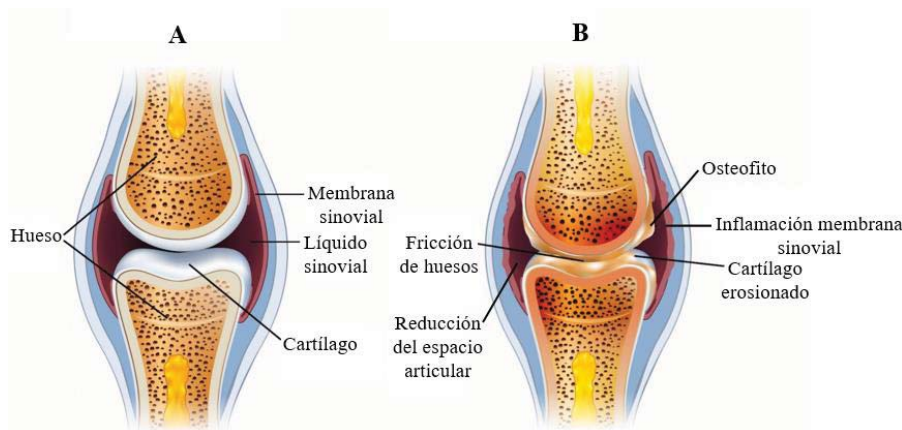


Figura 2. Esquema de una articulación sana (A) frente a una articulación con artrosis (B). (Figura modificada de: <https://www.the-rheumatologist.org/article/new-research-shows-knee-osteoarthritis-prevalence-is-rising/>).

Esta enfermedad afecta a más de 250 millones de individuos mundialmente y es la principal causa de dolor crónico y limitaciones de movilidad, sobre todo, en personas mayores (Yang et al., 2020). Los factores de riesgo más relevantes asociados a la artrosis son: edad, género, daños en la articulación, factores genéticos, obesidad y diabetes (Charlier et al., 2019; Mehana et al., 2019).

Como ya se mencionó anteriormente, la degradación de la MEC se produce debido a una alteración del equilibrio homeostático de los condrocitos. Los productos originados de dicha degradación se liberan al líquido sinovial, generando la producción de mediadores pro-inflamatorios como proteínas plasmáticas o citoquinas por parte de células sinoviales, macrófagos infiltrados, osteoblastos y/o condrocitos (Mathiessen et al., 2017; Charlier et al., 2019). La presencia de estas citoquinas ocasiona un ambiente catabólico en el cartilago dando lugar a la degradación de la MEC, creando un lazo de retroalimentación positiva (Freitag et al., 2016). Todo este proceso juega un papel clave en la patogénesis de la artrosis (Abramoff et al., 2020).

Principalmente, la degeneración de la MEC se produce por la metaloproteinasa de matriz 13 (MMP13), producida por los condrocitos. Esta enzima está involucrada en la degradación de la MEC durante procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario o la reparación de heridas, pero también durante procesos patológicos como la metástasis o la artrosis. (Troeborg et al., 2012; Mehana et al., 2019). La expresión de esta proteínasa se encuentra elevada en procesos artrósicos y puede degradar tanto el Col II como el Acan (Carballo et al., 2017).

La destrucción del cartílago lo hace más susceptible al estrés y menos capaz de reducir la fricción dentro del espacio articular. Estos cambios son irreversibles y reducen el espacio articular, permitiendo el contacto entre los huesos subcondrales y alterando la función normal de la articulación (Ashford et al., 2014).

1.2.1. Tratamiento de la artrosis

Hasta la fecha no existe ningún tratamiento eficaz capaz de curar la artrosis. Además, el diagnóstico temprano de la enfermedad sigue siendo un reto ya que los cambios en el cartílago en las primeras etapas no causan dolor, debido a que el tejido es aneural. Los pacientes no presentan síntomas hasta un estadio más avanzado en el que el daño en la articulación es irreparable (Krishnan et al., 2018).

Entre las opciones terapéuticas que existen para paliar los síntomas de la artrosis se encuentran los tratamientos farmacológicos, la cirugía o la terapia celular (Taruc-Uy et al., 2013). Entre los primeros se encuentran los analgésicos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los opiodes, que tienen como objetivo disminuir el dolor y la inflamación (Taruc-Uy et al., 2013; Vargas-Negrín et al., 2014).

Por otra parte, una de las opciones de terapia celular de cartílago consiste en la implantación de condrocitos autólogos (*ACI*), que tiene como objetivo reparar el cartílago para devolverle sus propiedades físico-químicas y su funcionalidad (Demoor et al., 2014; Freitag et al., 2016). Sin embargo, aunque existen diferentes generaciones de esta técnica, incluso la más novedosa presenta ciertas limitaciones. Algunos estudios han indicado que en ciertos casos se puede producir la desdiferenciación o la muerte de condrocitos una vez implantados, que puede deberse a una desregulación al cultivarlos *in vitro* en monocapa. Además, estas células comienzan a expresar marcadores típicos de fibrocartílago, como el colágeno tipo I, en lugar de expresar el *COL II* propio del cartílago hialino (Freitag et al., 2016; Zuliani et al., 2018).

Debido a la falta de conocimiento del desarrollo de la enfermedad, así como de un tratamiento efectivo, los retos en investigación se centran en el estudio de la fisiopatología de la enfermedad con el objetivo de desarrollar un tratamiento definitivo (Abramoff et al., 2020).

1.3. Fuentes celulares en el estudio de la artrosis

Para estudiar la fisiopatología de la artrosis es necesario modelar la enfermedad. *In vitro* se utilizan diferentes fuentes celulares como son: las células mesenquimales estromales (MSCs) y los condrocitos (Wang et al., 2017; Vinod et al., 2019). Para la realización de este trabajo nos centraremos en los condrocitos.

1.3.1. Condrocitos

Los condrocitos son las únicas células presentes en el cartílago y juegan un papel importante en la homeostasis y metabolismo de dicho tejido (Yang et al., 2020). Los condrocitos humanos son un modelo crucial para el estudio tanto de la fisiología como de la patología de cartílago (Dehne et al., 2010). Como ya se mencionó anteriormente, estas células se usan para el tratamiento de la artrosis, pero la poca capacidad de expansión celular *in vitro* limita este proceso (Vinod et al., 2019).

Diversos estudios han demostrado que los condrocitos se desdiferencian *in vitro* al expandirlos en monocapa, independientemente de la edad y del estado de salud de los donantes. Los condrocitos desdiferenciados se caracterizan por cambios morfológicos, un descenso de proliferación y la entrada en senescencia (Charlier et al., 2019). Estas células dejan de expresar *COL II* y *ACAN* y comienzan a expresar colágeno tipo I, típico de fibroblastos (Parreno et al., 2017; Zuliani et al., 2018). La región determinante del sexo del cromosoma y – caja 9 (*Sox9*) es un factor de transcripción y su expresión es esencial para la diferenciación condrogénica y, por tanto, para la rediferenciación, ya que regula la expresión de los marcadores típicos de condrocitos: *COL II* y *ACAN*. *SOX9* se puede inducir por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), tanto 1 (TGF- β -1) como 3 (TGF- β -3) (Coricor et al., 2016; Parreno et al., 2017). El TGF- β juega un papel fundamental en la biología de los condrocitos y del cartílago, siendo esencial en todas las fases de la condrogénesis, ya que estimula la proliferación celular y previene la hipertrofia (Charlier et al., 2019).

Por otra parte, resulta complejo aislar un número suficiente de condrocitos ya que la densidad celular en el cartílago es muy baja (Muhammad et al., 2019).

Todo lo explicado anteriormente supone una desventaja para el estudio del cartílago y, por tanto, de las patologías asociadas como la artrosis. Además, prevenir que los condrocitos se desdiferencien en monocapa es muy difícil, ya que entran en senescencia envejeciendo rápidamente (Yang et al., 2020). Por esta razón, se han desarrollado algunas técnicas de cultivo que permiten obtener un gran número de condrocitos y evitar la entrada en senescencia. Entre ellas, una estrategia que se puede seguir es la inmortalización celular para conseguir un mayor número de células y poder usarlas como modelo *in vitro* que permita el estudio del cartílago, así como de la artrosis. Diversos estudios han conseguido inmortalizar células *in vitro* mediante la transducción de diferentes genes como pueden ser el antígeno T grande del virus simio 40 (SV40) o la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT) (Piñeiro-Ramil et al., 2020; Yang et al., 2020). El antígeno T grande de SV40 inactiva los genes supresores de tumores: antígeno de tumor celular p53 (p53) y proteína del retinoblastoma (Rb), promoviendo la progresión del ciclo celular, mientras que hTERT impide el acortamiento de los telómeros durante el ciclo celular, evitando la senescencia (Yang et al., 2020).

Por otra parte, para evitar la desdiferenciación en monocapa, los condrocitos se pueden cultivar en tres dimensiones (3D) formando micromasas. Este modelo permite mimetizar la biología del cartílago para estudiar la diferenciación, la hipertrofia y la degradación, la influencia del ambiente y las condiciones de cultivo (Dehne et al., 2010; Schlichting et al., 2014). Las micromasas proporcionan un ambiente que permite la interacción celular y son un buen modelo para la rediferenciación condrogénica (Zuliani et al., 2018).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio consiste en determinar las condiciones de cultivo idóneas de una línea celular inmortalizada de condrocitos que permitan a estas células el mantenimiento de su fenotipo condrocítico, mediante la expresión de marcadores típicos de condrocitos primarios.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo de fin de máster forma parte del proyecto titulado "Generación y caracterización de líneas celulares mesenquimales para la investigación en enfermedades reumáticas" que cuenta con el informe favorable del Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol con código de Registro 2016/588 (ver anexo I).

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

3.1. Material biológico

La línea celular empleada en este trabajo corresponde a una línea inmortalizada de condrocitos artrósicos (260TT) (Piñeiro-Ramil et al., 2020). Esta se ha conseguido mediante la transducción del antígeno T grande de SV40 y hTERT. Los condrocitos fueron donados por un paciente con artrosis de cadera.

3.2. Condiciones de cultivo

En general, la condición de cultivo idónea para células humanas es en un incubador a 37 °C con una atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ (Sanyo MCO-18AIC CO₂ Incubator, Japón). Las células se han cultivado tanto en placas de cultivo adherentes (Corning Inc., EEUU) para cultivos en dos dimensiones (2D), como en tubos de 1,5 ml de polipropileno para cultivos 3D. Todos los procesos de cultivo celular se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar (Telstar™ AV-30/70, España).

3.3. Medios, soluciones y reactivos

- El medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco® ThermoFisher Scientific, España) se usó como medio de cultivo para las células con un 10% de suero bovino fetal (SBF; LabClinics, España) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/E; Sigma-Aldrich, España). Se trata de un medio rico en D-glucosa y L-glutamina (4,5 g/L) y piruvato sódico (110 mg/L). Para simplificar, este medio se nombrará como DMEM 10%.
- La tripsina al 2X se usó para levantar las células de la superficie de la placa. Esta se diluyó a partir de un stock de tripsina al 10X (2,5%; Gibco® ThermoFisher Scientific).

- El tampón fosfato salino (*PBS*; Oxoid™, Inglaterra) se usó para lavar las células al 1 % en agua destilada, que posteriormente se esterilizó mediante un sistema de vacío usando un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm.
- El dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) se usó al 10% en DMEM para la preparación del medio de congelación.
- El medio de diferenciación condrogénica comercial (*hMSC Commercial Chondrogenic Differentiation Medium*; Lonza Biowhittaker®, Bélgica) se usó para cultivar las células en 3D. A este medio se le añadió TGF-β3 (10 ng/ml; ProSpec-Tany TechnoGene Ltd, Israel).
- El medio de diferenciación condrogénica casero se usó para cultivar las células en 3D. Está compuesto por medio base de DMEM 10%, suero *knockout* al 10% (*KO-SR*; Gibco® ThermoFisher Scientific), insulina-transferrina-selenio al 1% (ITS, Sigma-Aldrich) y P/E al 1%. Al medio base se le añadió dexametasona (100 nM; Sigma-Aldrich), ácido ascórbico (100 nM; Sigma-Aldrich), prolina (40 µg/ml; Sigma-Aldrich) y TGF-β3 (10 ng/ml).
- El TRIzol® (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific), el cloroformo (Sigma-Aldrich), el glicógeno (ThermoFisher Scientific), el isopropanol (Sigma-Aldrich) y el etanol 70% se usaron para la extracción de ácido ribonucleico (ARN) de las micromasas.
- El reactivo de extracción de papaína se usó para la realización del estudio de la concentración de GAGs. El reactivo está compuesto por fosfato disódico (Na₂HPO₄, Sigma-Aldrich), fosfato monosódico (NaH₂PO₄, Sigma-Aldrich), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma-Aldrich), cisteína (Sigma-Aldrich), acetato de sodio (Emsure, Alemania) y papaína (Sigma-Aldrich).

3.4. Cultivo y expansión celular en monocapa

La línea inmortalizada de condrocitos artrósicos 260TT se ha obtenido previamente en el laboratorio mediante la transducción del antígeno T grande de SV40 y hTERT. Para la realización de este trabajo, las células se comenzaron a usar a partir del subcultivo 18, es decir, se encontraban en el pase 18. Durante el cultivo, se hicieron fotos a las células con una cámara (MicroCopia Digital, España) incorporada al microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100 Japón).

Cada tres días se les cambió el medio DMEM 10% y cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, se procedió a levantarlas y subcultivarlas para obtener un mayor número de células.

En primer lugar, antes de subcultivar las células, se comprobó su estado confluyente en un microscopio óptico invertido. A continuación, en una cabina de flujo laminar se procedió a la retirada de DMEM 10% de la placa de cultivo. Las células adheridas en la superficie de la placa se lavaron dos veces con *PBS* y se añadió tripsina al 2X. La placa se incubó a 37 °C durante dos minutos para que la tripsina levantara las células de la superficie de la placa. Finalmente, se añadió DMEM 10% para inactivar la tripsina.

3.4.1. Recuento celular

Para conocer el número de células presentes en la placa de cultivo, se procedió a su recuento. Para ello, una vez que se añadió medio DMEM 10% para inactivar la tripsina, el contenido de la placa se recogió en un Falcon™. Las células se centrifugaron 5 minutos a 1.500 rpm en una centrífuga de mesa (Beckman Coulter™ Allegra X22R Centrifuge, EEUU). El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en medio DMEM 10%. Estas se diluyeron con una solución azul de tripán (Gibco® ThermoFisher Scientific), el cual tiñe células muertas, y se añadieron 15 µl de dicha dilución a una cámara Neubauer (Labor Optik®, Reino Unido) para proceder al recuento bajo un microscopio óptico invertido.

3.4.2. Subcultivo y congelación celular

Una vez que las células de la línea 260TT fueron contadas, se procedió a resembrarlas para su subcultivo y a congelarlas para realizar un *stock*. A partir del Falcon™ en el que se encontraban las células, se tomó una parte para subcultivarlas de nuevo en una placa a la que previamente se había añadido medio DMEM 10% fresco. Además, para alcanzar la densidad celular necesaria para poder cultivarlas en 3D, se subcultivaron en placas de mayor superficie.

Para congelar las células para la realización de un *stock* estas se volvieron a centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm en una centrífuga de mesa. Se retiró el sobrenadante y se añadió medio de congelación en frío. Las células se resuspendieron y se repartieron en diferentes viales de congelación. Estos se introdujeron en un contenedor de viales de congelación (CoolCell®, Biocision, EEUU) y se congelaron a -80 °C.

3.5. Cultivo celular en micromasas empleando distintos medios de diferenciación condrogénica

Para cultivar las células formando micromasas se utilizaron tres medios de cultivo diferentes: como control se usó el medio de cultivo DMEM 10% y como medios de diferenciación condrogénica se usaron un medio casero y un medio comercial, ambos suplementados con TGF- β 3. Para cada condición de cultivo se formaron siete micromasas de las cuales dos fueron destinadas al estudio histológico, una, al estudio de la concentración de GAG y cuatro, a la extracción de ARN.

Una vez realizado el recuento celular y obtener un número de células adecuado, para la formación de las micromasas se añadieron 200.000 células por cada tubo de polipropileno y se pusieron 7 réplicas para cada condición, es decir, para cada medio de cultivo empleado. Los tubos se centrifugaron 5 minutos a 1.500 rpm en una microcentrífuga de mesa (Beckman Coulter™ Microfuge 22R Centrifuge, EEUU) para favorecer la formación de las micromasas. Finalmente, se incubaron a 37 °C con los tapones ligeramente abiertos para favorecer la entrada de oxígeno a los tubos. Las micromasas formadas se incubaron durante dos semanas para favorecer la formación de matriz propia de cartílago. Durante este periodo de tiempo, el medio de diferenciación se cambió dos veces por semana.

Por otra parte, se añadieron 200.000 células a un tubo *ependorf* y se centrifugaron 5 minutos a 1.500 rpm, se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados con *PBS*. Después de cada lavado, las células se volvieron a centrifugar. Finalmente, tras la última centrifugación, se retiró el sobrenadante y el pellet se congeló en seco a -80 °C. Estas células se usaron como control de condrocitos cultivados en monocapa para la extracción de ARN, para estudiar la expresión de los marcadores típicos de condrocitos primarios.

3.6. Estudio de la expresión de marcadores típicos de condrocitos primarios

Transcurridas las dos semanas de cultivo de las micromasas, se realizaron diferentes técnicas para analizar la expresión de los marcadores típicos de condrocitos primarios.

3.6.1. Análisis histológico

El análisis histológico se realizó en el Servicio de Histomorfología del INIBIC. Las micromasas destinadas a este estudio fueron cortadas y teñidas con las siguientes tinciones histológicas:

- Hematoxilina-eosina (H-E): permite realizar una evaluación general de la morfología celular. Los núcleos se tiñen de azul-púrpura y los citoplasmas, de rosa.
- Tricrómico de Masson (TM): permite detectar las fibras de colágeno. Los núcleos se tiñen de negro, los citoplasmas, de rosa y el colágeno, de azul.
- Safranina O (SO): permite detectar la presencia de proteoglicanos. El naranja indica presencia y el rojo, ausencia.

Todas las tinciones se observaron en un microscopio Olympus BX61 (Olympus, España) equipado con una cámara Olympus DP70 (Olympus). Para el análisis y la realización de fotografías de las muestras se usó el *software* cellSens (Olympus). Las imágenes se editaron con el programa ImageJ (*National Institutes of Health*, EEUU).

3.6.2. Análisis de la concentración de glucosaminoglicanos en la matriz extracelular

Para la realización del análisis de la concentración de glucosaminoglicanos, en primer lugar las micromasas destinadas para este estudio se digirieron con un reactivo de extracción de papaína y se incubaron a 65 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la determinación de la concentración de GAGs se realizó usando el ensayo colorimétrico del kit *BlyscanTM Sulfated Glycosaminoglycan Assay* (Biocolor, Reino Unido) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Por último, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Tecan Infinite® 200 PRO NanoQuant, Suiza) y con los datos obtenidos se realizó una recta de calibración a partir de la cual se obtuvo la concentración de GAGs de cada una de las muestras, empleando Microsoft Excel (2013). Finalmente, los datos se representaron en una gráfica empleando el *software* Prism (GraphPad, EEUU).

3.6.3. Extracción de ARN, PCR con transcriptasa inversa y PCR cuantitativa

Para la realización de la extracción de ARN, las micromasas destinadas para este estudio se lavaron dos veces con *PBS*. A continuación, con ayuda de una pipeta se procedió a la recuperación de las micromasas, que se introdujeron en *ependorfs* estériles. Finalmente, a cada *ependorf* se le añadió 500 µl de TRIzolTM y se congelaron a -80 °C hasta la realización del protocolo de extracción.

3.6.3.1. Extracción de ARN

El protocolo de extracción de ARN se realizó en una campana de aspiración química (Cruma, España). En primer lugar, los *ependorfs* con las micromasas en TRIzol™ se descongelaron y con ayuda de una aguja y una jeringa se procedió a la rotura de las micromasas. A continuación, a cada *ependorf* se añadieron otros 500 μ l TRIzol™ y 300 μ l de cloroformo que se mezclaron con ayuda de un vórtex (ZX3 Advanced Vortex Mixer, VELP científica, Italia). Todos los tubos se centrifugaron 5 minutos a 12.000 rpm en una microcentrífuga de mesa. Al centrifugar, las diferentes fases se separaron quedando el TRIzol™ en la parte inferior, el ácido desoxirribonucleico (ADN) formando una nube en la parte media y el ARN con el cloroformo en la parte superior.

El ARN con cloroformo se recuperó en un nuevo *ependorf* estéril para cada muestra y se añadió glicógeno y la misma cantidad de isopropanol que de fase acuosa recogida. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y los tubos se secaron con un pañuelo para eliminar los restos de alcohol. Tras secar todos los tubos, se añadió etanol 70 % y se volvieron a centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm. Igual que en el paso anterior, se eliminó el sobrenadante y los *ependorfs* se secaron para retirar todo el alcohol. Finalmente se añadió agua a todas las muestras y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Este protocolo de extracción de ARN también se realizó para el control de condrocitos cultivados en monocapa.

3.6.3.2. PCR con transcriptasa inversa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN. En primer lugar, se realizó la cuantificación de ARN a 260 nm utilizando un NanoDrop ND100 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, España) y se midieron las absorbancias, de las cuales los cocientes A260/A280 y A260/A230 indicaron la pureza de las muestras.

Para la síntesis de ADNc se usó el *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este proceso se realizó en un termociclador Veriti™ 96-Well (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific).

3.6.3.3. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (*qPCR*) se realizó para estudiar la expresión génica de los marcadores típicos de condrocitos primarios: *SOX9*, *COL II* y *ACAN*. Para medir la expresión de estos marcadores se necesitó un gen *housekeeping* o de referencia, cuya expresión es constante en las células, de manera que actúa como control interno. Por tanto, en primer lugar, se realizó una *qPCR* para comprobar cuál de ellos se expresaba de manera más estable en las diferentes muestras de estudio.

Se midió la expresión de los genes: proteína zeta de activación de tirosina 3-monooxigenasa /triptófano 5-monooxigenasa (*YWHAZ*), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), ARN ribosomal 18S (*RNA 18S*), β -ACTINA, proteína ribosomal L13 (*RPL13*) y β -TUBULINA usando los cebadores que se muestran en la **Tabla 1** y el kit *SYBR Green I Master* (Roche, Suiza) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La amplificación se llevó a cabo en un LightCycler® 480 Instrument II (Roche) y los datos de fluorescencia y temperatura de fusión (*T_m*) se analizaron utilizando el *software* LightCycler® 480 (Roche).

Los datos de fluorescencia fueron analizados y se obtuvo el valor del ciclo umbral (*CT*), que se refiere al ciclo en el cual la fluorescencia sobrepasa un umbral determinado y, por tanto, dicho gen se expresa. Por otra parte, la *T_m* indica la temperatura óptima específica a la que los cebadores hibridan con el ADN y depende del contenido guanina + citosina (G+C). Para determinar qué gen de referencia era el más estable se usó el algoritmo estadístico geNorm integrado en el *software* qbase⁺ (Biogazelle, Bélgica).

Tras conocer el gen *housekeeping* más estable en el conjunto de las muestras, se procedió a la realización de la *qPCR* para medir la expresión de los marcadores de condrocitos primarios (*SOX9*, *COL II* y *ACAN*) en las muestras. Se usaron los cebadores que se muestran en la **Tabla 1** y el kit *SYBR Green I Master* siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La amplificación se llevó a cabo en un LightCycler® 480 Instrument II y los datos de fluorescencia y *T_m* se analizaron utilizando el *software* LightCycler® 480. Para medir la expresión relativa de los marcadores analizados, se usó el *software* qbase⁺ y los datos se representaron usando el *software* Prism.

	Cebadores (5' → 3')		Contenido G+C	Pb del amplicón
<i>YWHAZ</i>	Sentido	GATCCCCAATGCTTCACAAG	50,00 %	130
	Antisentido	TGCTTGTGTGACTGATCGAC	47,62 %	
<i>GAPDH</i>	Sentido	GGAGTCAACGGATTTGGTCGTA	50,00 %	78
	Antisentido	GGCAACAATATCCACTTACCAGAGT	42,31 %	
<i>RNA 18S</i>	Sentido	GGAGAGGGAGCCTGAGAAAC	60,00%	70
	Antisentido	TCGGGAGTGGGTAATTTGC	52,63%	
β-ACTINA	Sentido	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	60,00 %	111
	Antisentido	GGATGCCACAGGACTCCA	61,11 %	
<i>RPL13</i>	Sentido	CAAGCGGATGAACACCAAC	52,63 %	95
	Antisentido	TGTGGGGCAGCATACTC	61,11 %	
β-TUBULINA	Sentido	ATACCTTGAGGCGAGCAAAA	45,00 %	110
	Antisentido	CTGATCACCTCCCAGAACTTG	52,38 %	
<i>SOX9</i>	Sentido	GTACCCGCACTTGACAAC	57,89 %	72
	Antisentido	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC	52,38 %	
<i>COL II</i>	Sentido	CCTGGCAAAGATGGTGAGAC	55,00 %	109
	Antisentido	GAAGTCCCTGGAACCCAGAT	55,00 %	
<i>ACAN</i>	Sentido	GCCTACGAAGCAGGCTATGA	55,00 %	136
	Antisentido	GCACGCCATAGGTCCTGA	61,11 %	

Tabla 1. Secuencias de los cebadores usados para la realización de *qPCR* para determinar el gen *housekeeping* más estable y la expresión de marcadores típicos de condrocitos primarios. Pb: pares de bases.

4. RESULTADOS

4.1. Cultivo y expansión celular en monocapa

Para la realización de este estudio, la línea 260TT se comenzó a expandir a partir del pase 18 hasta que se consiguió un número suficiente de células para poder cultivarlas en 3D.

En la **figura 3** se pueden observar las células en cultivo en el pase 20. Estas se adhirieron a la superficie de la placa al cultivarlas en monocapa y presentaron una morfología alargada, típica de fibroblastos. Estas imágenes se realizaron con una cámara equipada en el microscopio óptico invertido.

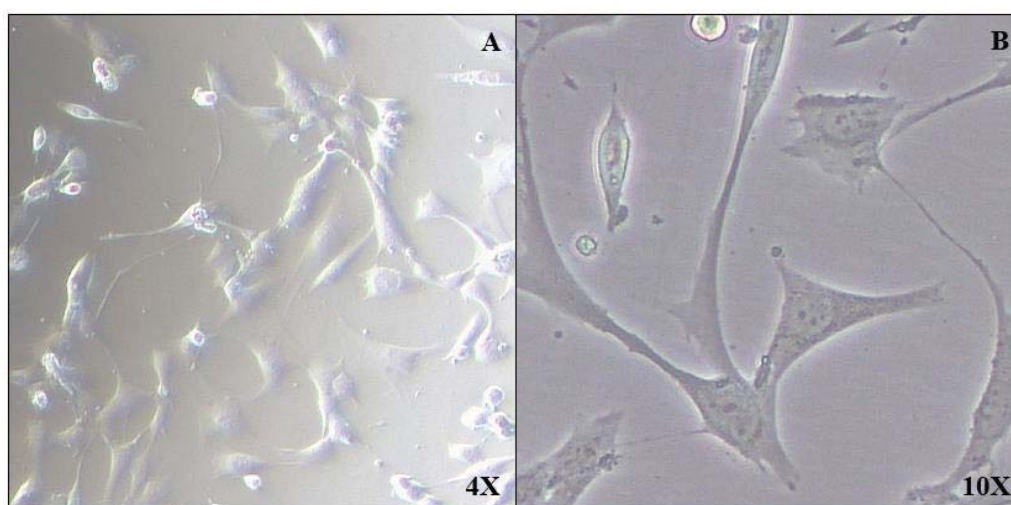


Figura 3. Imagen obtenida en microscopio óptico invertido de la línea celular inmortalizada de condrocitos artrósicos 260TT en el pase 20, cultivada en monocapa.

4.2. Cultivo celular en micromasas empleando diferentes medios de diferenciación condrogénica

Para cultivar las células formando micromasas se usaron tres medios de cultivo diferentes: como control se usó DMEM 10% y como medios de diferenciación condrogénica, un medio casero y uno comercial, ambos suplementados con TGF- β 3.

En la **figura 4** se pueden observar las micromasas formadas. La imagen 4A corresponde al pellet celular después de centrifugar para favorecer la formación de las micromasas y las imágenes 4B y 4C corresponden a las micromasas formadas tras 24 h en los medios de diferenciación condrogénica comercial y casero, respectivamente. Las flechas rojas indican dónde se encuentran el pellet y las micromasas.

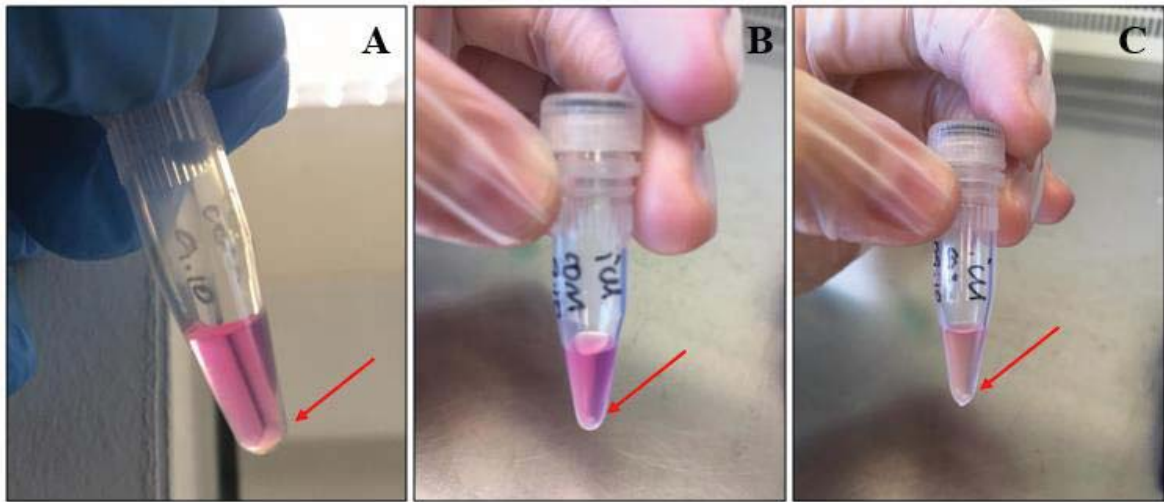


Figura 4. Formación de micromasas. A) Pellet celular formado después de centrifugar para favorecer la formación de las micromasas. B) Micromasa formada tras 24 horas en el medio de diferenciación condrogénica comercial. C) Micromasa formada tras 24 horas en el medio de diferenciación condrogénica casero.

4.3. Estudio de la expresión de marcadores típicos de condrocitos primarios

Transcurridas las dos semanas de cultivo en sus correspondientes medios, las micromasas se recogieron para estudiar la expresión de marcadores típicos de condrocitos primarios. Se realizó un análisis histológico de las micromasas, un análisis de la concentración de GAGs y se extrajo el ARN para medir la expresión de los marcadores típicos de condrocitos primarios.

4.3.1. Análisis histológico

La tinción H-E se realizó para observar la morfología celular en general. En la **figura 5** se observan las diferentes micromasas para cada condición teñidas con H-E. Las imágenes 5A y 5D corresponden a una micromasa formada en medio DMEM 10%, las imágenes 5B y 5E, a una micromasa formada en el medio de diferenciación condrogénica comercial y las imágenes 5C y 5F, a una micromasa formada en el medio de diferenciación condrogénica casero. Se puede observar que los núcleos están teñidos de azul-púrpura y los citoplasmas de rosa. Además, se puede apreciar en general la morfología redondeada de las células, así como agrupaciones celulares, sobre todo, en la zona externa de las micromasas.

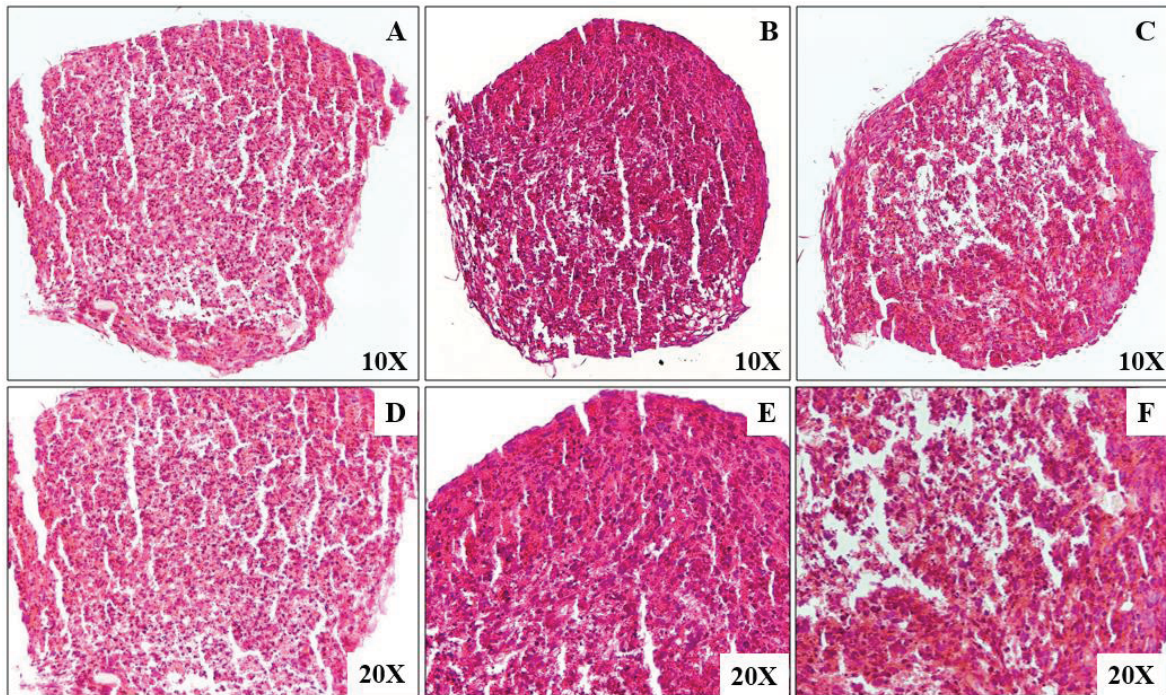


Figura 5. Tinción H-E de las micromasas. A y D) micromasa formada en DMEM 10%. B y E) Micromasa formada en medio de diferenciación condrogénica comercial. C y F) Micromasa formada en medio de diferenciación condrogénica casero.

La tinción TM se realizó para evaluar la presencia o ausencia de colágeno en la que los núcleos se tiñen de negro, los citoplasmas, de rosa y el colágeno, de azul. En la **figura 6** se observan las diferentes micromasas teñidas con TM. Las imágenes 6A y 6D corresponden a una micromasa formada en DMEM 10%, las imágenes 6B y 6E, a una micromasa formada en el medio de diferenciación condrogénica comercial y las imágenes 6C y 6F, a una micromasa formada en el medio de diferenciación condrogénica casero. En las imágenes 6B, 6C, 6E y 6F se aprecia un tono violeta por la zona externa de las micromasas, lo que indica la presencia de colágeno en ellas, y que no aparece en las imágenes 6A y 6D.

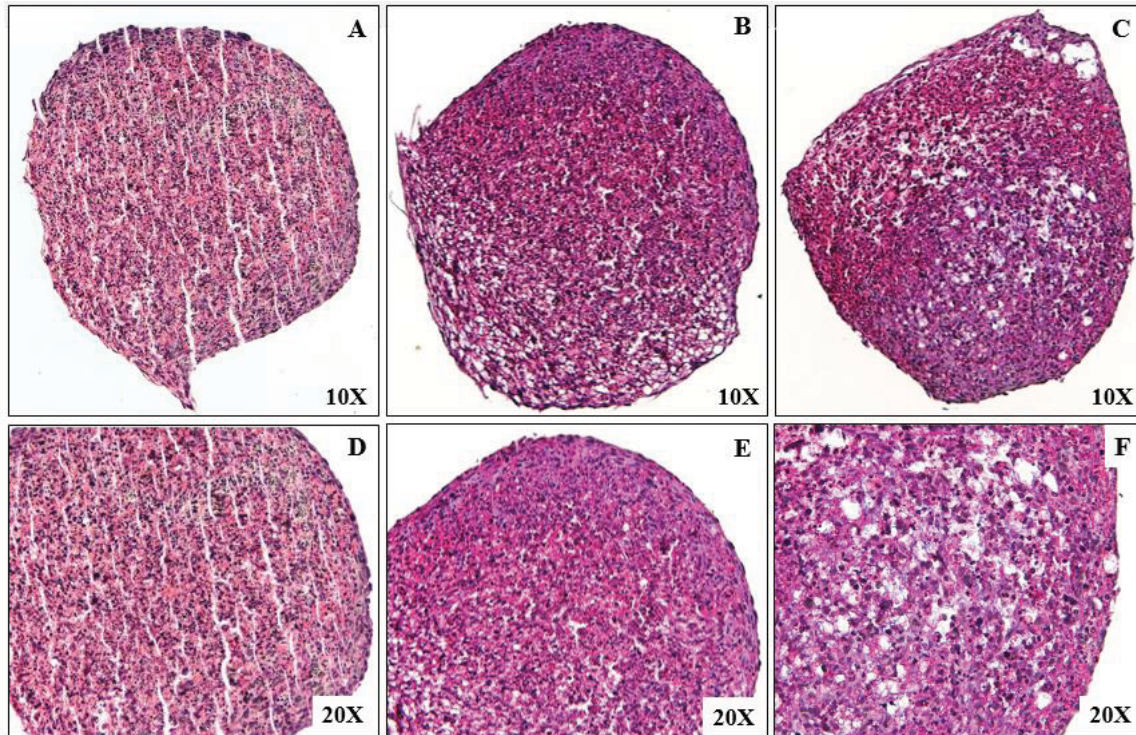


Figura 6. Tinción TM. A y D) Micromasa formada en DMEM 10%. B y E) Micromasa formada en medio de diferenciación condrogénica comercial. C y F) Micromasa formada en medio de diferenciación condrogénica casero.

La tinción SO se realizó para detectar la presencia de proteoglicanos indicada en color anaranjado. En la **figura 7** se observan las diferentes micromasas teñidas con SO. Las imágenes 7A y 7D corresponden a una micromasa formada en DMEM 10%, las imágenes 7B y 7E, a una micromasa formada en el medio de diferenciación condrogénica comercial y las imágenes 7C y 7F, a una micromasa formada en el medio de diferenciación condrogénica casero. Todas las micromasas presentan coloración rojiza, lo que indicaría una baja presencia de proteoglicanos. Además, en las imágenes 7C y 7F se observan unas estructuras similares a cristales que se podrían haber formado debido a algún componente del medio de diferenciación casero.

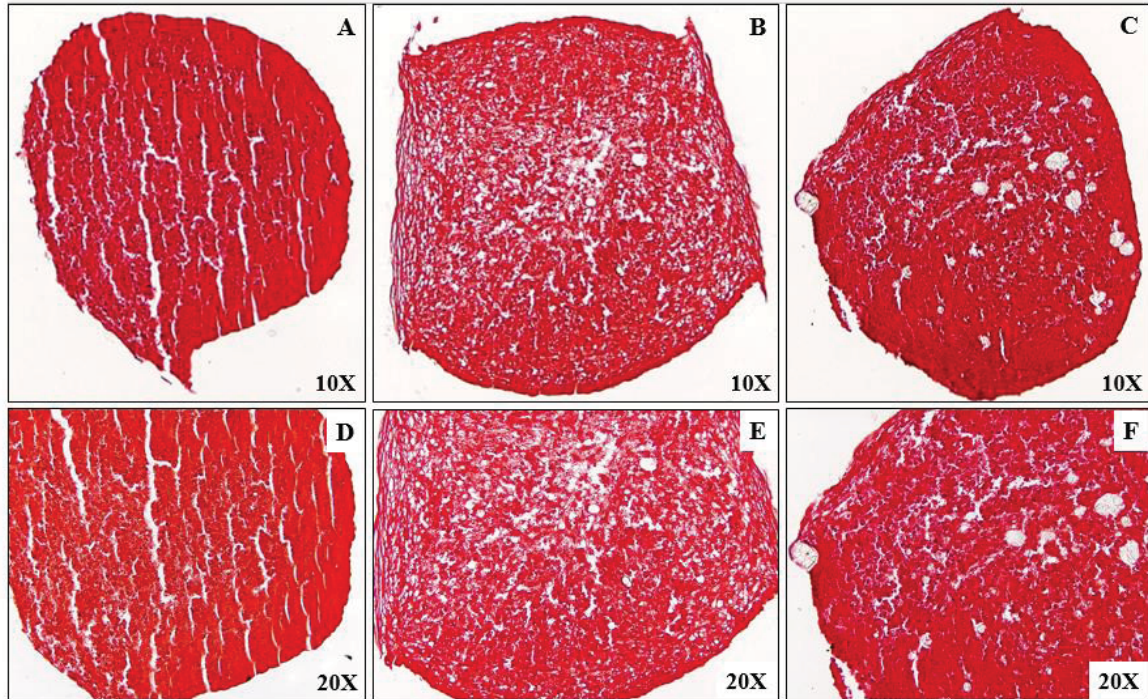


Figura 7. Tinción SO. A y D) micromasa formada en DMEM 10%. B y E) Micromasa formada en medio de diferenciación condrogénica comercial. C y F) Micromasa formada en medio de diferenciación condrogénica casero.

4.3.2. Análisis de la concentración de glucosaminoglicanos

Para determinar la concentración de GAGs, tras la realización del ensayo colorimétrico de las micromasas, se midió su absorbancia y se realizó una recta de calibración a partir de los datos obtenidos. Finalmente, a partir de esta recta se obtuvieron las concentraciones de los GAGs presentes en las micromasas.

En la **figura 8** se ha representado la concentración de GAGs de cada una de las muestras en $\mu\text{g/ml}$. Se puede observar que la concentración de GAGs de las micromasas formadas tanto en el medio comercial como en el casero es pequeña y que, en el caso del DMEM 10% la concentración de GAGs de la micromasa es mayor.

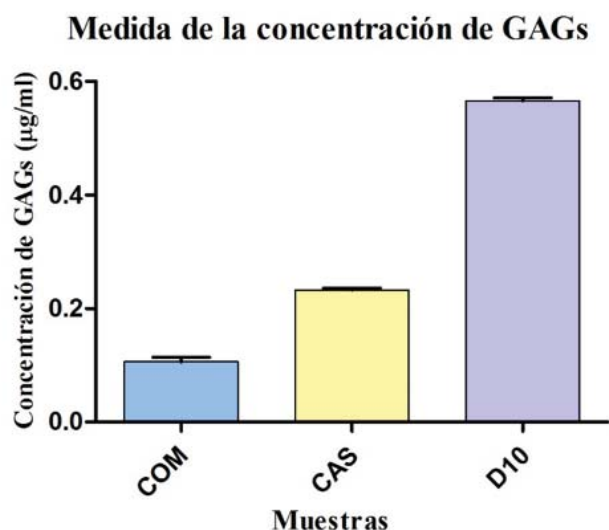


Figura 8. Concentración de GAGs (µg/ml) de las micromasas formadas en los medios de diferenciación condrogénica comercial (COM) y casero (CAS) y en DMEM 10% (D10).

4.3.3. Análisis de la expresión génica de los marcadores típicos de condrocitos primarios

Transcurridas las dos semanas de cultivo, se realizó la *qPCR* para medir la expresión de los marcadores típicos de condrocitos primarios en las micromasas.

En primer lugar, se realizó una *qPCR* para comprobar qué gen *housekeeping* se expresaba de manera más estable en las micromasas cultivadas en los tres medios de cultivo empleados, así como en el control de condrocitos cultivados en monocapa.

Tras analizar los *CT* y las *Tm* de los genes, la β -TUBULINA se descartó ya que aparecían dos valores de *Tm* en todas las muestras: uno específico del amplicón y otro inespecífico. Este segundo valor de *Tm* inespecífico corresponde a un dímero de cebadores, es decir, a un producto de *PCR* amplificado formado por la hibridación de los dos cebadores y por tanto, este gen fue descartado.

Por otra parte, el gen *RNA 18S* también se descartó ya que los valores de *CT* fueron muy pequeños (entre 9 y 13), es decir, la fluorescencia llegaba al umbral de detección en pocos ciclos por lo que no se consideró fiable usar este gen como control para medir la expresión de los marcadores de condrocitos primarios.

Por tanto, para conocer qué gen se expresaba de manera más estable en las muestras de estudio, los *CT* se analizaron con el algoritmo estadístico geNorm integrado en el *software* qbase⁺. En la **figura 9** se observa la expresión media de los genes de referencia en todas las muestras de estudio. En el eje X aparecen representados los diferentes genes y en el eje Y, el valor M. Este valor lo calcula el algoritmo geNorm y determina la variación de expresión de cada gen *housekeeping* comparándolo por pares con los valores de expresión de los otros genes *housekeeping* que se están analizando. El valor M es inversamente proporcional a la estabilidad, de manera que cuanto menor sea, mayor estabilidad tendrá el gen (Vandesompele et al., 2002).

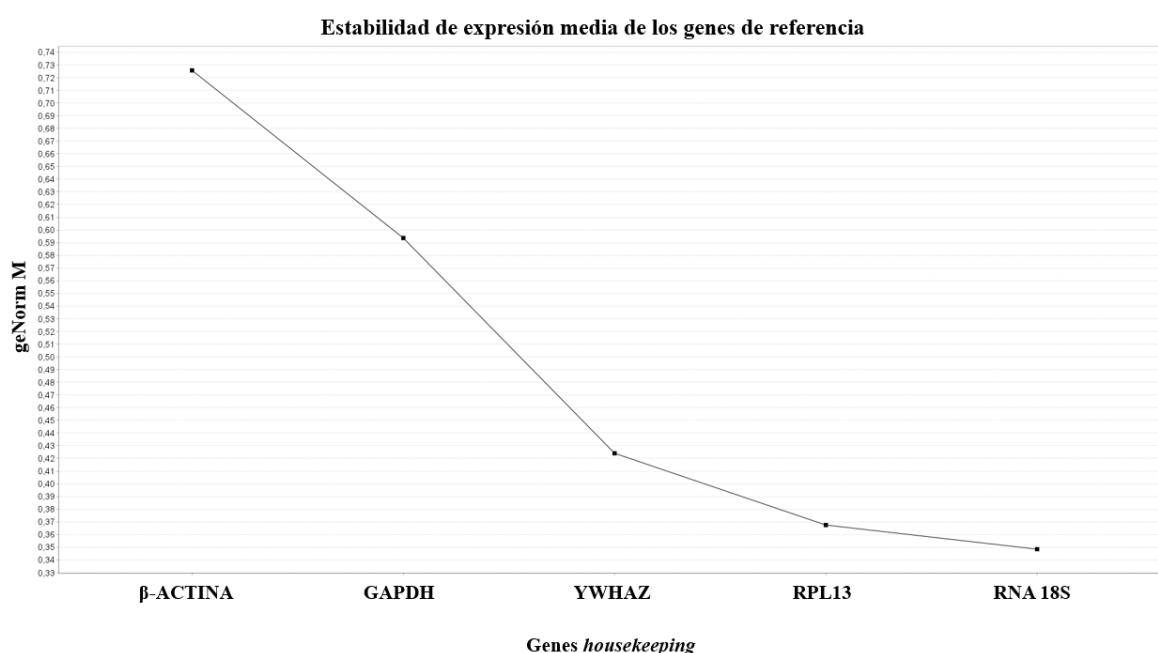


Figura 9. Estabilidad de expresión media de los genes de referencia. En el eje X aparecen los genes medidos y en el eje Y el valor M calculado por el algoritmo estadístico geNorm integrado en el *software* qbase⁺.

Por tanto, según los resultados obtenidos y tras descartar los genes β -TUBULINA y *RNA18S*, el gen *housekeeping* usado como control para medir la expresión de los marcadores de condrocitos primarios fue el gen *RPL13*.

Finalmente, se realizó una *qPCR* para medir la expresión de los marcadores típicos de condrocitos primarios en las micromasas cultivadas en los tres medios de cultivo empleados, así como en el control negativo de condrocitos cultivados en monocapa. Una vez terminada la *qPCR* se calcularon los valores de *CT* y *Tm* para determinar la expresión de dichos marcadores, normalizados a la expresión del gen *RPL13*.

Los marcadores *COL II* y *ACAN* no se expresaron en ninguna de las muestras de estudio, mientras que *SOX9* se expresó en todas.

En la **figura 10** se puede observar la expresión relativa de *SOX9*, cuyos datos se obtuvieron con el *software* qbase⁺ y se representaron con el *software* Prism. La expresión de las diferentes muestras se relativizó frente al valor de expresión de t0, al que se le asignó el valor 1. La muestra t0 corresponde al control de condrocitos a tiempo 0 utilizado para los experimentos de biología molecular, que proviene del mismo cultivo celular en 2D a partir del cual se formaron las micromasas. Así, se puede observar que la expresión de *SOX9* de las micromasas formadas en los diferentes medios de cultivo es menor en comparación con la expresión en el control de condrocitos cultivados en monocapa.

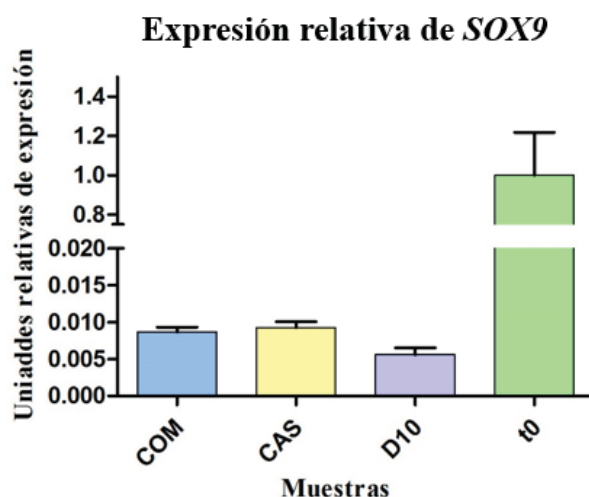


Figura 10. Expresión relativa de *SOX9* en relación a la muestra t0. En el eje X aparecen las diferentes muestras de estudio y en el eje Y las unidades relativas de expresión. COM: micromasas formadas en el medio de diferenciación condrogénica comercial; CAS: micromasas formadas en el medio de diferenciación condrogénica casero; D10: micromasa formada en DMEM 10%; t0: control de condrocitos a tiempo 0 para los experimentos de biología molecular.

En la **figura 11** aparece representada la expresión relativa de *SOX9* en las micromasas formadas en los tres medios de cultivo en 3D. En esta gráfica, la expresión de las micromasas formadas en los dos medios de diferenciación condrogénica se representan en relación a D10, cuya expresión relativa es 1. Se puede observar cómo la expresión de *SOX9* es mayor en los medios comercial y casero, en comparación con el medio DMEM 10%.

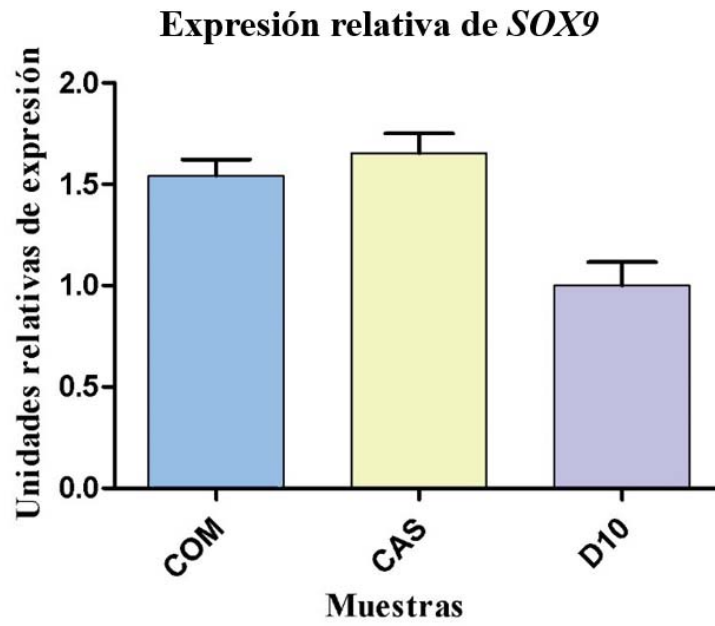


Figura 11. Expresión relativa de *SOX9* en relación a D10. En el eje X aparecen las diferentes muestras de estudio y en el eje Y las unidades relativas de expresión. COM: micromasas formadas en el medio de diferenciación condrogénica comercial; CAS: micromasas formadas en el medio de diferenciación condrogénica casero; D10: micromasa formada en DMEM 10%.

5. DISCUSIÓN

La artrosis es la enfermedad articular más común en todo el mundo, cuya incidencia y prevalencia se prevé que se disparen en las próximas décadas debido al envejecimiento de la población, el aumento de las tasas de obesidad y de las lesiones traumáticas de rodilla (Mandl, 2019). Es por esto que la investigación de la fisiopatología de la artrosis resulta crucial para intentar entender esta enfermedad heterogénea y poder encontrar, en última instancia, un tratamiento definitivo (Sacitharan, 2019). A pesar de todos los avances en investigación, a día de hoy no existe ningún tratamiento efectivo capaz de curar la artrosis, debido a la falta de conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad.

En este trabajo se ha testado un modelo *in vitro* que puede permitir estudiar la fisiopatología de la artrosis y comprender los mecanismos involucrados en su progresión. Para ello, se ha usado una línea de condrocitos artrósicos inmortalizada previamente en el laboratorio mediante la transducción del antígeno T grande de SV40 y hTERT (Piñeiro-Ramil et al., 2020). La ventaja principal de usar la línea 260TT en lugar de condrocitos primarios es que se evita el envejecimiento celular al cultivarlas *in vitro*, ya que el antígeno T grande de SV40 promueve la progresión del ciclo celular al inhibir p53 y Rb, y hTERT evita la senescencia al inhibir el acortamiento de los telómeros (Piñeiro-Ramil et al., 2020; Yang et al., 2020).

Sin embargo, una desventaja que presentan los condrocitos, tanto primarios como la línea 260TT, es que se desdiferencian al cultivarlos *in vitro* en monocapa. Esta desdiferenciación se produce independientemente de la edad o del estado de salud del donante y se caracteriza por una desregulación en diversas vías de señalización, dando lugar a un desequilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos de los condrocitos (Duan et al., 2015; Mao et al., 2018). Estas células cultivadas en monocapa dejan de expresar *ACAN* y *COL II* y comienzan a expresar colágeno tipo I, típico de fibroblastos, tras uno o dos pases *in vitro* (Duan et al., 2015; Parreno et al., 2017). En este trabajo se observa que la línea 260TT estaba desdiferenciada, ya que las células presentaban una forma alargada al cultivarlas en monocapa, al adquirir un fenotipo típico de fibroblastos.

Para intentar rediferenciar los condrocitos en monocapa, estos se cultivaron formando micromasas. Diversos estudios han demostrado que el cultivo celular formando micromasas es un buen modelo 3D ya que mimetiza aspectos esenciales de la biología del cartílago, permitiendo estudiar la diferenciación, las condiciones de cultivo y la interacción celular, entre otros (Schlichting et al., 2014; Zuliani et al., 2018).

Estas micromasas fueron cultivadas en diferentes medios de cultivo para intentar favorecer su rediferenciación y que volviesen a expresar los marcadores típicos de condrocitos.

La diferenciación condrogénica de la línea 260TT se realizó con medios de diferenciación suplementados con TGF- β 3. Se realizaron análisis histológicos empleando diferentes tinciones que permitieron estudiar la morfología celular y la presencia de colágeno y proteoglicanos. En primer lugar, en las micromasas formadas en el medio de diferenciación condrogénica casero se formaron unos cristales, que podría deberse a algún componente del medio de diferenciación. Se cree que podrían haberse formado por el ácido ascórbico ya que es un suplemento bioactivo que se oxida y pierde estabilidad rápidamente (Asnaghi et al., 2018), lo que podría haber dado lugar a la formación de estos agregados. En general, los condrocitos inmortalizados cultivados en micromasa presentaban una morfología redondeada, lo que indicaría que recuperaron su morfología típica que perdieron al expandirlas en monocapa. Por último, las tinciones TM y SO indicaron escasa presencia de colágeno y proteoglicanos, respectivamente.

Por otra parte, también se midió la concentración de GAGs presentes en las micromasas. Teniendo en cuenta que no se detectó presencia de proteoglicanos, cabría esperar una concentración baja de GAGs. Esto se cumplió en las micromasas formadas en los medios de diferenciación condrogénica comercial y casero. Aunque en la micromasa formada en DMEM 10% la concentración de GAGs fue ligeramente superior, se pudo detectar presencia de GAGs en todas las muestras.

El TGF- β es una familia de factores de crecimiento que juega un papel fundamental en el desarrollo y la homeostasis del cartílago articular, y son esenciales para la diferenciación condrogénica de *MSCs* ya que inducen la expresión de *SOX9* (Coricor et al., 2016; Bianchi et al., 2017). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la familia TGF- β está involucrada en la degeneración del cartílago articular en pacientes con artrosis o de avanzada edad en función de las vías de señalización que se activen (Mariani et al., 2014). Mientras tanto, otros estudios sostienen que la función de esta familia no está clara en procesos artrósicos, ya que también se ha visto que la delección del receptor TGF- β tipo II promueve la progresión de un fenotipo artrósico en ratones (Sacitharan, 2019).

Por tanto, teniendo en cuenta que la línea 260TT es una línea de condrocitos artrósicos, para intentar mejorar la expresión de proteoglicanos y *COL II* se podrían usar otros factores de crecimiento como la proteína morfogénica ósea 7 (*BMP-7*), ya que se ha visto que es capaz de aumentar la concentración de proteoglicanos en cultivos en 3D de condrocitos artrósicos (Stöve et al., 2006). Además, un ensayo clínico en fase I demostró que la administración de *BMP-7* en pacientes con artrosis mejoró sus síntomas y tuvo efectos reparadores en el cartílago (Hunter et al., 2010; Zhang et al., 2019). Por tanto, se podría usar este factor de crecimiento para estimular la expresión de proteoglicanos e incluso en combinación con el TGF- β 3 para favorecer también la expresión de *COL II*.

Por último, se midió la expresión de los marcadores típicos de condrocitos primarios (*SOX9*, *COL II* y *ACAN*) en las micromasas formadas en los tres medios de cultivo, así como en el control de condrocitos cultivados en monocapa. Tras analizar los datos de *CT* y *Tm*, se detectó la expresión de *SOX9* en todas las muestras, mientras que *COL II* y *ACAN* no se detectaron en ninguna, confirmando los resultados anteriores. Se ha visto que la expresión de *SOX9* en 2D es mayor que en las micromasas formadas en DMEM 10% y en los medios de diferenciación condrogénica en 3D. Esto puede deberse a que *SOX9* es un gen de expresión temprana que induce la expresión de *COL II* y *ACAN*, de manera que, si las micromasas se cultivan en dichos medios de diferenciación durante más de dos semanas, se podría llegar a detectar la expresión de dichos marcadores.

Lin y colaboradores (2008) demostraron que la expresión de *SOX9* en condrocitos primarios artrósicos cultivados en monocapa no disminuía tras, al menos, cuatro pases, por lo que este factor no estaría relacionado con la desdiferenciación que sufren los condrocitos al cultivarlos en monocapa (Lin et al., 2008). Esto explicaría por qué su expresión no está disminuida en t_0 , es decir, en el control de condrocitos a tiempo 0 utilizado para los experimentos de biología molecular. Recordemos que tanto este control a tiempo 0 como los condrocitos empleados para la formación de las micromasas provenían del mismo cultivo celular en 2D. Puede que otros factores de transcripción sean los responsables de esta desdiferenciación celular y de la ausencia de expresión de *COL II* y *ACAN* en los condrocitos cultivados en monocapa (Lin et al., 2008).

Los factores de transcripción: subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (*HIF-1 α*), homeobox D9 (*HOXD9*) y homeobox 2 NK3 (*NKX3.2*), entre otros, están relacionados con la diferenciación condrogénica, de manera que también podrían estar relacionados con la desdiferenciación de condrocitos en monocapa (Almalki & Agrawal, 2016; Carballo et al., 2017).

Por otra parte, puede que alguna vía de señalización o los genes *COL II* y *ACAN* estén mutados en la línea 260TT y por eso no se detecte expresión. En la muestra t0 en 2D puede que no hubiera expresión de *COL II* y *ACAN* debido a que los condrocitos cultivados en monocapa se desdiferencian y dejan de expresar dichos marcadores; así como en las micromasas cultivadas en DMEM 10% tampoco hubo expresión debido a que estas solo se cultivaron en medio de crecimiento sin factores de estimulación condrogénica.

Sin embargo, se puede observar cómo la expresión de *SOX9* es mayor en las micromasas formadas en los medios de diferenciación condrogénica con TGF- β 3, al compararla con la expresión en las micromasas formadas en DMEM 10%. Como ya se ha explicado anteriormente, la función de TGF- β 3 no está clara en procesos artrósicos, de manera que podría haber contribuido a la expresión de *SOX9* en aquellas micromasas que fueron estimuladas.

Finalmente, hay que tener en cuenta que la línea 260TT es una línea de condrocitos artrósicos y por eso presenta tantas limitaciones para rediferenciarse. Aun así, los resultados obtenidos demuestran que esto se podría conseguir y, para ello, se deberían probar otras condiciones de cultivo, así como cultivar las micromasas durante más tiempo para favorecer la rediferenciación y utilizar una línea inmortalizada de condrocitos sanos para obtener un modelo *in vitro* de condrocitos útil para estudiar la fisiopatología de la artrosis.

6. CONCLUSIONES

La conclusión principal obtenida tras la realización de este trabajo es:

- Las diferentes condiciones de cultivo testadas no han resultado idóneas para mantener el fenotipo condrocítico de la línea celular inmortalizada 260TT, ya que no se ha conseguido detectar la expresión de todos los marcadores típicos de condrocitos primarios en las micromasas formadas en los dos medios de diferenciación condrogénica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff, B., & Caldera, F. E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin N Am*, *104*(2), 293–311. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>
- Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, *92*(1–2), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005>
- Armiento, A. R., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2019). Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv Drug Deliv Rev*, *146*, 289–305. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.015>
- Ashford, S., & Williard, J. (2014). Osteoarthritis: A review. *Nurse Pract*, *39*(5), 1–8. <https://doi.org/10.1097/01.NPR.0000445886.71205.c4>
- Asnaghi, M. A., Duhr, R., Quasnichka, H., Hollander, A. P., Kafienah, W., Martin, I., & Wendt, D. (2018). Chondrogenic differentiation of human chondrocytes cultured in the absence of ascorbic acid. *J Tissue Eng Regen Med*, *12*(6), 1402–1411. <https://doi.org/10.1002/term.2671>
- Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*, *87*(1), 77–95. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn025>
- Bianchi, V. J., Weber, J. F., Waldman, S. D., Backstein, D., & Kandel, R. A. (2017). Formation of hyaline cartilage tissue by passaged human osteoarthritic chondrocytes. *Tissue Eng Part A*, *23*(3–4), 156–165. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0262>
- Byers-Kraus V., Blanco F. J., Englund M., Karsdal M. A., & L. S. L. (2015). Call for Standardized Definitions of Osteoarthritis and Risk Stratification for Clinical Trials and Clinical Use. *Osteoarthritis Cartilage*, *23*(8), 1233–1241. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.036>
- Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., & Rodeo, S. A. (2017). Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med*, *36*(3), 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.001>
- Charlier, E., Deroyer, C., Ciregia, F., Malaise, O., Neuville, S., Plener, Z., ... de Seny, D. (2019). Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochem Pharmacol*, *165*(January), 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.036>
- Coricor, G., & Serra, R. (2016). TGF- β regulates phosphorylation and stabilization of Sox9 protein in chondrocytes through p38 and Smad dependent mechanisms. *Sci Rep*, *6*(August), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep38616>
- Dehne, T., Schenk, R., Perka, C., Morawietz, L., Pruss, A., Sittinger, M., ... Ringe, J. (2010). Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene*, *462*(1–2), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.04.006>
- Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., ... Galera, P. (2014). Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, *1840*(8), 2414–2440. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.030>

- Duan, L., Ma, B., Liang, Y., Chen, J., Zhu, W., Li, M., & Wang, D. (2015). Cytokine networking of chondrocyte dedifferentiation in vitro and its implications for cell-based cartilage therapy. *Am J Transl Res*, 7(2), 194–208.
- Freitag, J. Bates, D., Boyd, R., Shah, K., Barnard, A., Huguenin, L., & Tenen, A. (2016). Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: Reparative pathways, safety and efficacy - A review. *BMC Musculoskelet Disord*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1085-9>
- Hunter, D. J., Pike, M. C., Jonas, B. L., Kissin, E., Krop, J., & McAlindon, T. (2010). Phase 1 safety and tolerability study of BMP-7 in symptomatic knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*, 11(1), 232. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-232>
- Krishnan, Y., & Grodzinsky, A. J. (2018). Cartilage diseases. *Matrix Biol*, 71–72, 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.05.005>
- Lin, Z., Fitzgerald, J. B., Xu, J., Willers, C., Wood, D., Grodzinsky, A. J., & Zheng, M. H. (2008). Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J Orthop Res*, 26(9), 1230–1237. <https://doi.org/10.1002/jor.20523>
- Mandl, L. A. (2019). Osteoarthritis year in review 2018: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*, 27(3), 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.11.001>
- Mao, Y., Hoffman, T., Wu, A., & Kohn, J. (2018). An Innovative Laboratory Procedure to Expand Chondrocytes with Reduced Dedifferentiation. *Cartilage*, 9(2), 202–211. <https://doi.org/10.1177/1947603517746724>
- Mariani, E., Pulsatelli, L., & Facchini, A. (2014). Signaling pathways in cartilage repair. *Int J Mol Sci*, 15(5), 8667–8698. <https://doi.org/10.3390/ijms15058667>
- Mathiessen, A., & Conaghan, P. G. (2017). Synovitis in osteoarthritis: Current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1229-9>
- Mehana, E. S. E., Khafaga, A. F., & El-Blehi, S. S. (2019). The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sci*, 234(August), 116786. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116786>
- Mobasheri, A., Kalamegam, G., Musumeci, G., & Batt, M. E. (2014). Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas*, 78(3), 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.04.017>
- Muhammad, S. A., Nordin, N., Hussin, P., Mehat, M. Z., Tan, S. W., & Fakurazi, S. (2019). Optimization of Protocol for Isolation of Chondrocytes from Human Articular Cartilage. *Cartilage*. <https://doi.org/10.1177/1947603519876333>
- Ng, H. Y., Alvin Lee, K. X., & Shen, Y. F. (2017). Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. *JSM Bone and Joint Dis*, 1(2), 1010

- Palukuru, U. P., McGoverin, C. M., & Pleshko, N. (2014). Assessment of hyaline cartilage matrix composition using near infrared spectroscopy. *Matrix Biol*, 38, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.07.007>
- Parreno, J., Nabavi Niaki, M., Andrejevic, K., Jiang, A., Wu, P. H., & Kandel, R. A. (2017). Interplay between cytoskeletal polymerization and the chondrogenic phenotype in chondrocytes passaged in monolayer culture. *J Anat*, 230(2), 234–248. <https://doi.org/10.1111/joa.12554>
- Piñeiro-Ramil, M., Castro-Viñuelas, R., Sanjurjo-Rodríguez, C., Rodríguez-Fernández, S., Hermida-Gómez, T., Blanco-García, F. J., ... Díaz-Prado, S. (2020). Immortalizing Mesenchymal Stromal Cells from Aged Donors while Keeping Their Essential Features. *Stem Cells Int*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5726947>
- Sacitharan P.K. (2019) Ageing and Osteoarthritis. In: Harris J., Korolchuk V. (eds). *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science. Subcellular Biochemistry*, vol 91. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_6
- Schlichting, N., Dehne, T., Mans, K., Endres, M., Stuhlmüller, B., Sittinger, M., ... Ringe, J. (2014). Suitability of porcine chondrocyte micromass culture to model osteoarthritis in vitro. *Mol Pharm*, 11(7), 2092–2105. <https://doi.org/10.1021/mp5000554>
- Stöve, J., Schneider-Wald, B., Scharf, H. P., & Schwarz, M. L. (2006). Bone morphogenetic protein 7 (bmp-7) stimulates Proteoglycan synthesis in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Biomed Pharmacother*, 60(10), 639–643. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.09.001>
- Taruc-Uy, R. L., & Lynch, S. A. (2013). Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis. *Prim Care*, 40(4), 821–836. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.08.003>
- Troeberg, L., & Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1824(1), 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.06.020>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7), 1–12. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Vargas Negrín, F., Medina Abellán, M. D., Hermosa Hernán, J. C., & De Felipe Medina, R. (2014). Tratamiento del paciente con artrosis. *Aten Primaria*, 46(SUPPL 1), 39–61. [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(14\)70043-5](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(14)70043-5)
- Vinod, E., Kachroo, U., Ozbey, O., Sathishkumar, S., & Boopalan, P. R. J. V. C. (2019). Comparison of human articular chondrocyte and chondroprogenitor cocultures and monocultures: To assess chondrogenic potential and markers of hypertrophy. *Tissue Cell*, 57(January), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2019.01.007>
- Wang, Y., Yu, D., Liu, Z., Zhou, F., Dai, J., Wu, B., ... Liu, H. (2017). Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0632-0>

Yang, J., Tang, Y., Chen, W., Zhang, M., Hong, F., Yang, D., ... Ma, C. (2020). Establishment and characterization of an immortalized human chondrocyte cell line. *Biotechnol Lett*, 42(5), 707–716. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02827-y>

Zhang, W., Robertson, W. B., Zhao, J., Chen, W., & Xu, J. (2019). Emerging trend in the pharmacotherapy of osteoarthritis. *Front Endocrinol*, 10(JUL). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00431>

Zuliani, C. C., Bombini, M. F., de Andrade, K. C., Mamoni, R., Pereira, A. H., & Coimbra, I. B. (2018). Micromass cultures are effective for differentiation of human amniotic fluid stem cells into chondrocytes. *Clinics*, 73(7), 1–8. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e268>

Página web:

The Rheumatologist (2018). New Research Shows Knee Osteoarthritis Prevalence Is Rising. Recuperado el 28 de noviembre de 2020. <https://www.the-rheumatologist.org/article/new-research-shows-knee-osteoarthritis-prevalence-is-rising/>

8. ANEXOS

8.1. Anexo I: Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE



Rede Galega de Comités
Xerencia do Servizo Galego de Saúde
Edificio Administrativo San Lázaro s/n
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es



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

Natalia Cal Purriños, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 25/05/20 la modificación del estudio:

Título: Generación y caracterización de líneas celulares mesenquimales para la investigación en enfermedades reumáticas

Versión modificación: modificación marzo 2020

Promotor/a: Silvia María Díaz Prado, Isaac Manuel Fuentes Boquete

Investigador/a: Silvia María Díaz Prado, Isaac Manuel Fuentes Boquete

Código de Registro: 2016/588

Y que este Comité acepta de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha modificación sea incorporada al estudio de investigación mencionado.





Y HACE CONSTAR QUE:

1. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol cumple los requisitos legales vigentes
2. La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol es:

Carmen Mella Pérez (Presidenta). Médica especialista en Medicina Interna. Área de Gestión Integrada Ferrol.

Ángel Lopez-Silvarrey Varela. (Vicepresidente). Médico especialista en Pediatría. Área de Gestión Integrada A Coruña.

Natalia Cal Purriños. (Secretaria). Licenciada en Derecho. Fundación “Profesor Novoa Santos”. A Coruña.

Sonia Pértega Díaz. (Vicesecretaria). Matemática. Área de Gestión Integrada A Coruña.

Juana M^a Cruz del Río. Trabajadora social. Consellería de Sanidad.

María Ángeles Freire Fojo. Farmacéutica. Especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada Ferrol.

Portal González Lorenzo. Médica especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada Ferrol.

Isaac Martínez Bendayán. Médico especialista en Cardiología. Área de Gestión Integrada A Coruña.

María Otero Santiago. Médica especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada A Coruña.

Alejandro Pazos Sierra. Médico. Universidad de A Coruña.

Gonzalo Peña Pérez. Médico especialista en Cardiología. Hospital de San Rafael. A Coruña.

Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada Santiago.

José M^a Rumbo Prieto. Diplomado en Enfermería. Área de Gestión Integrada Ferrol.

María Isabel Sastre Gervás. Farmacéutica Atención Primaria. Área de Gestión Integrada A Coruña.

Para que conste donde proceda, y a petición de quien corresponda, en A Coruña.

La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de A Coruña – Ferrol,

Natalia Cal Purriños

