



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico 2011-2012

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA DIFERENCIACIÓN
CONDROGÉNICA DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES, PROCEDENTES DE
MÉDULA ÓSEA HUMANA, SOBRE
BIOMATERIALES DE COLÁGENO**

Adela Helvia Martínez Sánchez

30 de Mayo de 2012

DIRECTORA: Dra. Silvia María Díaz Prado

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2-8
a. La osteoartritis.	2-3
b. Empleo de células madre mesenquimales en la regeneración de cartílago.	4-5
c. Ingeniería tisular: empleo de biomateriales o <i>scaffolds</i> en la regeneración de cartílago.	5-8
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10-22
a. Obtención de muestras, aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea humana.	10-11
b. Cultivo de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana sobre los biomateriales.	11-13
c. Caracterización de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana.	13-16
<i>i. Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo.</i>	13-15
<i>ii. Estudio de la multipotencialidad de las células madre mesenquimales de médula ósea humana mediante diferenciación celular in vitro.</i>	16-16
d. Estudio de la diferenciación condrogénica sobre los biomateriales.	16-22
<i>i. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico de los biomateriales.</i>	16-17
<i>ii. Evaluación histoquímica e inmunohistoquímica de los biomateriales.</i>	17-18
<i>iii. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión.</i>	18-19
<i>iv. Análisis morfométrico mediante microscopía electrónica de barrido.</i>	19
<i>v. Extracción de ARN, síntesis de ADNc, y PCR cuantitativa.</i>	20-21
<i>vi. Medición de colágeno y glicosaminoglicanos liberados al medio de cultivo.</i>	22

e. Análisis estadístico de los resultados.	22
5. RESULTADOS	23-44
a. Cultivo en monocapa de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana.	23
b. Cultivo de las células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana sobre los biomateriales.	23
c. Caracterización de las células aisladas de médula ósea humana.	24-29
<i>i. Caracterización mediante citometría de flujo.</i>	24-25
<i>ii. Potencial de diferenciación in vitro.</i>	26-27
<i>iii. Análisis molecular de la diferenciación celular.</i>	27-30
d. Estudio de la diferenciación condrogénica sobre los biomateriales.	30-41
<i>iv. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico.</i>	30-38
<i>v. Análisis molecular de la diferenciación celular.</i>	38-39
<i>vi. Medición de colágeno liberado al medio de cultivo.</i>	40-41
e. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido.	41-43
f. Análisis morfométrico mediante microscopía electrónica de transmisión	43-44
6. DISCUSIÓN	45-49
7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFÍA	51-57
9. AGRADECIMIENTOS	58
10. ANEXOS	59-65
a. Consentimiento informado	59-64
b. Acta de la defensa y evaluación	64-65

1. RESUMEN-

Introducción: La osteoartritis es una enfermedad degenerativa caracterizada por la degradación del cartílago y el hueso subcondral. En la actualidad no existen tratamientos eficaces que la curen, siendo la terapia celular una herramienta prometedora para la formación de cartílago hialino. Las células madre mesenquimales (CMMs) se obtienen con facilidad de multitud de tejidos, entre ellos la médula ósea (CMMs-MOh). La combinación de terapia celular empleando CMMs-MOh con *scaffolds* que aporten un sustrato adecuado para su proliferación y diferenciación hacia condrocitos, favorece la formación de cartílago funcional que podría ser empleado posteriormente para la regeneración de las zonas dañadas.

Objetivos: Evaluar la capacidad de diferenciación condrogénica *in vitro* de CMMs-MOh cuando son cultivadas sobre biomateriales de colágeno.

Material y métodos: Las células se aislaron de MOh y se caracterizaron. Posteriormente se sembraron sobre los biomateriales constituidos por colágeno y heparán sulfato (HS) en distintas proporciones, cultivándose en medio de inducción condrogénico durante 30 días. Transcurridos 15 y 30 días de cultivo, se evaluó el grado de diferenciación condrogénica de las células, así como la calidad del tejido neo-sintetizado *in vitro*. Para ellos se emplearon técnicas de biología molecular, microscopía electrónica, histológicas e inmunohistoquímicas.

Resultados: Las células aisladas de la MOh mostraban capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica, además de un perfil de marcadores de membrana característico de CMMs-MOh. Transcurridos los 30 días de cultivo, en todos los biomateriales se observó un elevado porcentaje celular y gran cantidad de matriz extracelular, distribuidos homogéneamente por la totalidad del biomaterial. En la MEC secretada por las células se detectó expresión de marcadores característicos de cartílago hialino. El ARN de las células diferenciadas expresó marcadores específicos de linaje condrogénico. Por último, se produjo liberación de colágeno al medio de cultivo por parte de las células.

Conclusiones: Los biomateriales de colágeno son un soporte adecuado para permitir la diferenciación condrogénica de CMMs-MOh y la neoformación de un tejido cartilaginoso.

2. INTRODUCCIÓN

a. La osteoartritis

La osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa caracterizada por el deterioro en la integridad del cartílago hialino y el hueso subcondral (figura 1) (Ishiguro *et al.*, 2002), debido a la interacción de factores genéticos, metabólicos y físicos (Tardif *et al.*, 2009).

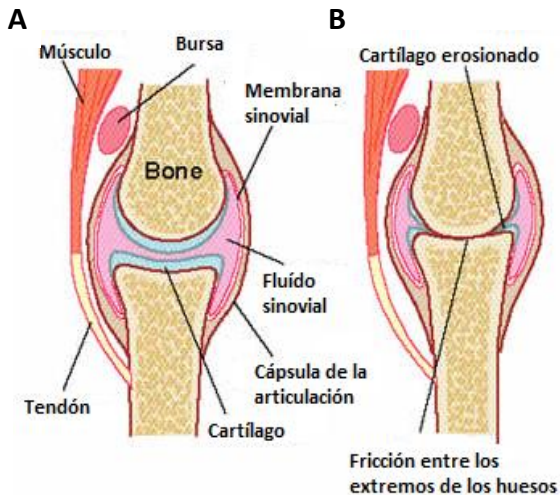


Figura 1. Articulación con cartílago normal (A). Articulación con cartílago artrósico (B). Extraída y modificada de <http://www.southerncross.co.nz/aboutthegroup/healthresources/medicallibrary/tabid/178/vw/1/itemid/132/osteoarthritis-symptoms-diagnosis-treatment.aspx>

La OA es la patología articular prevalente en la sociedad y la causa más frecuente de invalidez. Su incidencia está directamente relacionada con la edad y aumenta con la edad media de la población (Brooks, 2002). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la OA afecta al 80% de la población mayor de 65 años en los países industrializados.

El cartílago hialino o articular es un tejido especializado derivado del mesénquima durante el desarrollo embrionario. Está compuesto por un solo tipo de células, los condrocitos (Grigoloa *et al.*, 2002) y por matriz extracelular (MEC). Los condrocitos se encuentran diseminados a través de la estructura del cartílago (figura 2A), en un porcentaje muy reducido (2-3 por 100 de su volumen total). Son células especializadas en la biosíntesis y mantenimiento de los componentes de la matriz.

La MEC está constituida por un 70-80% de agua, un 20-30% de colágeno de tipo II (Col II), un 30-35 % de proteoglicanos y el 15-20 % restante, por otras proteínas de matriz. La mayor parte del colágeno del cartílago es de tipo II, con cierta contribución de los tipos VI, IX, XI, XII, y XIV. La

disposición de la red de fibrillas de colágeno (figura 2B) proporciona a este tejido resistencia a la tensión. Los proteoglicanos confieren al cartílago sus propiedades mecánicas de elasticidad y resistencia a la presión (Blanco FJ, 2002).

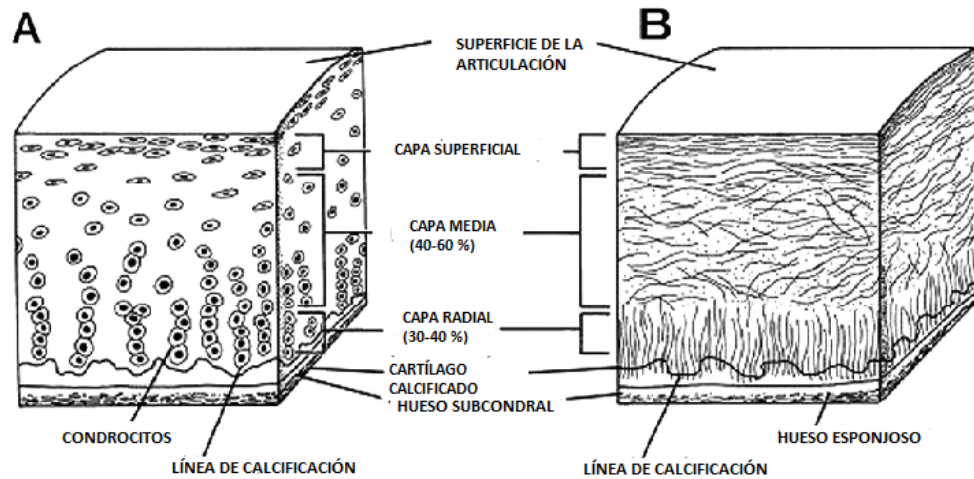


Figura 2. Estructura del cartílago articular. Distribución de condrocitos (A). Disposición de las fibras de colágeno (B). Extraída y modificada de <http://www.wsiat.on.ca/english/mlo/osteoarthritis.htm>

La capacidad de auto-regeneración del cartílago hialino o articular es muy limitada, debido a que es un tejido de naturaleza avascular y a la ausencia de inervación (Zhang *et al.*, 2005). Otros factores que explican la escasa capacidad de autoreparación del cartílago son la baja actividad metabólica, la incapacidad de los condrocitos de migrar debido a la presencia de MEC, y la baja celularidad (Negri *et al.*, 2007).

En la actualidad no existen herramientas quirúrgicas para tratar la OA. Los procedimientos disponibles para el tratamiento de la OA no curan esta enfermedad; son de tipo paliativo centrados en la eliminación del dolor y la inflamación que se produce durante el proceso patológico. En última instancia podría ser necesario proceder al implante de prótesis en la zona dañada.

b. Empleo de células madre mesenquimales en la regeneración de cartílago.

Para evitar el reemplazo de la articulación mediante cirugía, se ha propuesto en los últimos años la terapia celular como herramienta clínica para la reparación de tejidos dañados, entre ellos el cartílago. Se han desarrollado varias terapias, todas centradas en la formación de un nuevo tejido cuya estructura, bioquímica, composición y función fueran las mismas que en el cartílago articular endógeno (regeneración) (Fuentes-Boquete *et al.*, 2008).

Hasta el momento, ninguno de los tratamientos disponibles ha conseguido la regeneración de cartílago hialino normal. En su lugar, generan un tejido fibrocartilaginoso que difiere estructural y funcionalmente del cartílago hialino (Szerb *et al.*, 2005). El empleo de tipos celulares maduros, tales como condrocitos, aportan un tejido de reparación de mayor calidad, por lo que el implante de condrocitos autólogos supone una buena alternativa para el tratamiento de lesiones focales. Sin embargo, lleva asociado varios inconvenientes: baja disponibilidad, des-diferenciación, y capacidad de proliferación limitada, de modo que no son adecuados para el tratamiento de la osteoartritis. Por ello las investigaciones comenzaron a centrarse en otros tipos celulares, como las CMMs (Facchini *et al.*, 2006).

Las CMMs son células pluripotentes, que se renuevan a sí mismas, y que poseen la capacidad de regenerar la mayoría de los tejidos esqueléticos (cartílago, hueso, grasa, tendón y músculo), cuando se cultivan en condiciones apropiadas *in vitro* (figura 3) o *in vivo* (Majumdar *et al.*, 1998). La diferenciación condrogénica *in vitro* de CMMs requiere el empleo de factores de crecimiento e interacciones célula-célula y célula-matriz. Los soportes tridimensionales o *scaffolds* mejoran este proceso de diferenciación y ayudan a las células a mantener su fenotipo diferenciado *in vitro*.

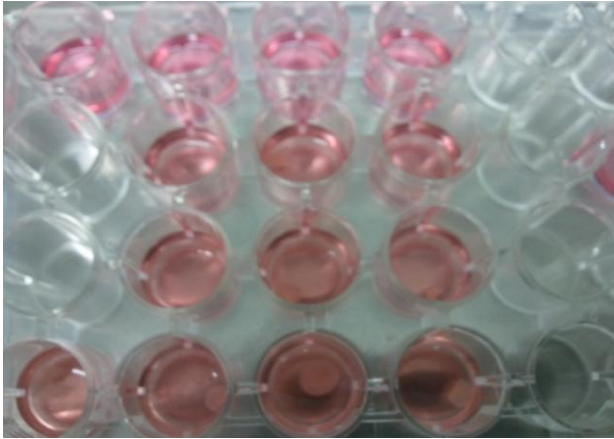


Figura 3. Cultivo *in vitro* de CMMs-MOH sobre biomateriales de colágeno.

Las CMMs pueden ser aisladas de una gran variedad de tejidos, como la médula ósea (CMMs-MO) (Kastrinaki *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 1998), cartílago

articular (Alsalameh *et al.*, 2004), membrana sinovial (De Bari *et al.*, 2001; Fickert *et al.*, 2003), pericondrio (Douchis *et al.*, 1997), periostio (Nakahara *et al.*, 1990), tejido conectivo de la dermis y el músculo esquelético (Young *et al.*, 2001), tejido adiposo (Zuk *et al.*, 2001 & 2002), y membrana amniótica (Díaz-Prado *et al.*, 2010a & 2010b; Alviano *et al.*, 2007) entre otros. Así, las técnicas empleadas para su obtención son menos invasivas que las de obtención de condrocitos (Facchini A *et al.*, 2006).

c. Ingeniería tisular: empleo de biomateriales o *scaffolds* en la regeneración de cartílago

La ingeniería tisular es un área multidisciplinar que integra principios de ingeniería y de ciencias de la vida, para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos dañados, con capacidad limitada para auto-repararse.

Para alcanzar la regeneración de tejidos, se han investigado tres aproximaciones, que consisten en: la terapia celular, los factores inductores de tejido y los *scaffolds* biocompatibles (figura 4). Los *scaffolds* son substratos naturales o sintéticos que pueden soportar células temporalmente y dirigir su desarrollo. Favorecen las interacciones célula-material y la liberación de factores biológicos por parte de las células.

Los *scaffolds* suponen un elemento clave en la ingeniería tisular, ya que permiten a las células adherirse a sus superficies y colonizarlos.

Para su empleo en ingeniería tisular, un *scaffold* debe poseer una serie de características bioquímicas y biofísicas que le permitan controlar y promover eventos específicos a nivel celular y tisular. Estos soportes deben diseñarse empleando materiales que permitan una biodegradabilidad controlada y que posean poros interconectados de escala adecuada para promover la integración del tejido. La generación del nuevo tejido debería ocurrir gradualmente, a medida que el *scaffold* se va degradando, permitiendo al nuevo tejido adquirir la forma y el tamaño del *scaffold* original (Gloria A *et al.*, 2010). También debe poseer propiedades mecánicas adecuadas para adaptarse al sitio de implantación y tratamiento, y una química de superficie adecuada para promover la unión, proliferación y diferenciación de las células. Los *scaffolds* no deben inducir reacciones adversas en el huésped, y finalmente tienen que ser fáciles de manufacturar dentro de una gran variedad de formas y tamaños.

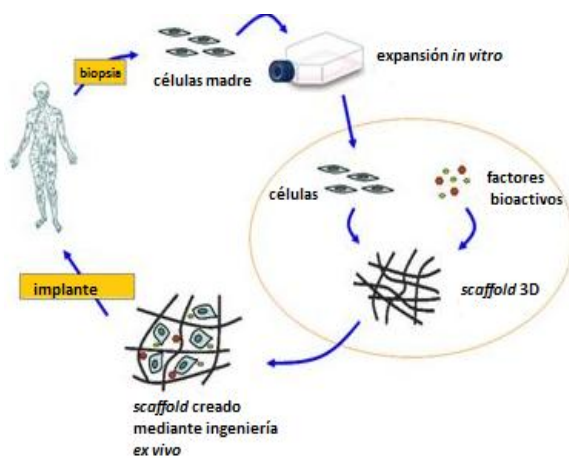


Figura 4. Esquema de los pasos en ingeniería tisular. Extraída y modificada de <http://www.nuhs.edu.sg/research/programmatic-research/som-registered-programmes/nus-tissue-engineering-programme.html>

Para su empleo en ingeniería tisular de cartílago, se han diseñado *scaffolds* de estructuras fibrosas, esponjas porosas, o mallas (tejidas o no tejidas) (Kuo *et al.*, 2006). Para su fabricación se han empleado tanto polímeros naturales como sintéticos (Tuli *et al.*, 2003). Algunos de los biomateriales naturales empleados en la regeneración de cartílago son el colágeno (Zheng *et al.*, 2010; Cao

& Xu, 2008; Negri *et al.*, 2007; De Franceschi *et al.*, 2005; Dorotka *et al.*, 2005), agarosa (Awad *et al.*, 2004; Mauck *et al.*, 2000), fibrina (Scotti *et al.*, 2010), alginato (Herlofsen *et al.*, 2011) ácido hialurónico (Facchini *et al.*, 2006) o quitosano (Alves da Silva *et al.*, 2010) y biomateriales

sintéticos, como ácido glicólico poli-láctico (PLGA) y una nanofibra polimérica (Alves da Silva *et al.*, 2010; Casper *et al.*, 2010) . Estos biomateriales pueden emplearse solos o combinados en distintas proporciones.

Las propiedades mecánicas y biológicas de los biomateriales influyen significativamente la condrogénesis y el mantenimiento de la integridad estructural del tejido neo-formado. Debido a su naturaleza tridimensional, favorecen el mantenimiento de la morfología celular y una elevada expresión de glicosaminoglicanos (GAG) y Col II, los cuales son componentes de la MEC del cartílago hialino (Nettles *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2008).

Estudios llevados a cabo *in vivo* con conejos, mostraron que el empleo de biomateriales sintéticos puede tener consecuencias negativas sobre el cartílago hialino. Al implantar meniscos sintéticos, compuestos por un hidrogel de polivinilo, todos los animales sufrieron ulceración y pérdida de cartílago transcurridas ocho semanas (Oka *et al.*, 1997). El problema que surge con los biomateriales sintéticos, es que el implante no se fusiona con el hueso adyacente, dando lugar a la degradación de la superficie que lo recubre tras 2 o 3 meses (Oka *et al.*, 1997). Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo en ratones se observaron buenos resultados al tratar las lesiones de cartílago con condrocitos sembrados sobre biomateriales de colágeno. Este estudio mostró una buena proliferación y mantenimiento del fenotipo celular y unos buenos resultados de reparación (Frenkel *et.*, 1997).

A pesar de la difusión de nuevas técnicas en ingeniería tisular, y al número de *scaffolds* que han sido investigados, el material ideal de la MEC no se ha identificado aún. El uso clínico de estos biomateriales se encuentra actualmente limitado, principalmente debido al riesgo de transmisión de enfermedades e inmunoreacción.

El empleo de *scaffolds* presenta una serie de ventajas sobre otras técnicas. Los soportes de liberación celular pueden actuar como una barrera ante la invasión del injerto por fibroblastos, los cuales de otro modo inducirían reparación fibrosa (Frenkel *et al.*, 1997). Además, la presencia de MEC alrededor de las células incrementa la retención celular del donador en el sitio de reparación y posiblemente proteja a las células de factores ambientales, como moléculas inflamatorias (Pelttari *et al.*, 2009). Los métodos en ingeniería tisular con *scaffolds* son menos invasivos que otras técnicas, debido a que no hay necesidad de segar el periostio. Además, otros beneficios de este métodos son: tiempo de intervención quirúrgica reducido, riesgo bajo de hipertrofia periostial y adhesión postquirúrgica (Iwasa *et al.*, 2009).

Sin embargo, los biomateriales tienen distinta influencia en el metabolismo de las células huésped, y por lo tanto, la calidad del cartílago sintetizado va a variar en función del biomaterial elegido (Mouw JK *et al.*, 2005, Jeon H *et al.*, 2007).

En resumen, la regeneración de tejido hialino podría obtenerse tras la implantación de un cartílago funcional creado previamente mediante ingeniería tisular, en lugar de la liberación de un implante de condrocitos (Pelttari *et al.*, 2009), siendo esta una alternativa menos invasiva para el tratamiento de las lesiones de cartílago que los que existen actualmente. Sin embargo, no se ha verificado aún que las ventajas teóricas y técnicas de los *scaffolds* den lugar a una mejora de los resultados clínicos en comparación con otras técnicas convencionales, por lo que es necesario llevar a cabo más estudios para determinarlo.

Con este estudio se pretende comprobar si los biomateriales de colágeno y heparán sulfato (HS) permiten la diferenciación hacia condrocitos de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana (CMMs-MOh). Los resultados obtenidos nos darán información acerca de la posible eficacia del uso de biomateriales como transportadores de células al interior del cartílago dañado, con el fin de favorecer su regeneración.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la capacidad de las células madre mesenquimales humanas, cultivadas sobre soportes de colágeno y HS, de experimentar condrogénesis y la influencia de dichos soportes para promover la neoformación de un tejido cartilaginoso.

Objetivos específicos:

- 1.- Obtención de los diferentes soportes de colágeno.
- 2.- Obtención y procesamiento de las muestras de médula ósea humana.
- 3.- Aislamiento y cultivo de las CMMs obtenidas de médula ósea humana.
- 4.- Caracterización fenotípica de las CMMs aisladas de médula ósea humana.
- 5.- Comprobación *in vitro*, mediante diferenciación celular, de que las células aisladas en el objetivo nº3 cumplen las características típicas de células progenitoras.
- 5.- Estudiar la posible utilidad de los diferentes biomateriales de colágeno como soporte para el cultivo de CMMs.
- 6.- Determinar la capacidad de diferenciación condrogénica *in vitro* de las CMMs cuando son cultivadas sobre los biomateriales.
- 7.- Valorar histológicamente las células cultivadas sobre los diferentes soportes de colágeno.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

a. Obtención de muestras, aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea humana

Para este estudio se emplearon 10 muestras de médula ósea humana obtenidas a partir de cabezas femorales. Estas muestras fueron proporcionadas por el Banco de Tejidos del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) y procedieron de reemplazos protésicos de cadera de pacientes atendidos en este hospital.

Para todas las muestras se ha obtenido el consentimiento informado de cada uno de sus respectivos donantes (Anexo 1). Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación clínica de Galicia (CEICG).

Para extraer las CMMs-MOh, se llevó a cabo un lavado con 50 ml de medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*, suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) (ambos de Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) con una jeringuilla de 1,1mm x 25mm.

A continuación se filtró la suspensión resultante de células, a través de un filtro estéril de 40 µm, se centrifugó a 300xg durante 8 minutos.

El cultivo de las CMMs-MOh (1×10^5 células) se realizó en un frasco de cultivo de 25 cm² con medio *DMEM* suplementado con 20% de SBF, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (de ahora en adelante se le denominará medio *DMEM*) en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 37°C (Steri-Cult 200 Incubator HEPA class 100, Hucoa Erlöss, Madrid, Spain).

Los cultivos se mantuvieron hasta llegar a una confluencia del 80%, momento en el que se tripsinizaron y las suspensiones de células resultantes se transfirieron a frascos de cultivo de mayores dimensiones (pases celulares), expandiendo así los cultivos.

Para reducir la contaminación por fibroblastos, la suspensión de células se sometió a una técnica de *pre-plating*, durante 20 minutos en los dos

primeros pases (Richler & Yaffe, 1970). La base de esta técnica es que las CMMs requieren más tiempo para adherirse a la placa de cultivo que los fibroblastos. Por lo tanto, las células que no se han adherido se resuspenden y resiembran.

Al alcanzar el número de células necesarias para llevar a cabo los experimentos de diferenciación, caracterización por citometría y siembra sobre los biomateriales, las CMM-MOH se recuperaron con tripsina y se resuspendieron en medio de cultivo.

b. Cultivo celular sobre los biomateriales

Los biomateriales empleados en este estudio fueron suministrados por la empresa italiana Opocrin, S.P.A Via Pacinotti, 3. 41040 Corlo di Formigine-Modena. Persona de contacto: Bruna Parma. Esta empresa trabaja desde 1964 en la investigación, producción y comercialización de materias primas para uso farmacéutico derivadas de órganos y tejidos animales.

Se analizaron 4 soportes con una superficie de 1 cm² cada uno, compuestos de Col I y HS en las siguientes concentraciones: Col I, Col I +1% HS, Col I +2% HS y Col I +3% HS.

Para el cultivo sobre los biomateriales, previamente se elaboró un *pool* celular de CMMs-MOH, para alcanzar la densidad celular deseada, ya que de otro modo hubiera sido necesario llegar a pases celulares muy elevados, pudiendo perder las células su capacidad de diferenciación. Dicho *pool* estaba formado por células provenientes de siete donantes, seis de ellos OA y uno normal. Una parte del *pool* se destinó a experimentos de caracterización fenotípica de CMMs-MOH mediante citometría de flujo, a experimentos de diferenciación en placa para microscopía óptica y en placa de doce pocillos para extracción de ARN.

Las células se sembraron sobre los biomateriales a una densidad de 2×10^5 células/ cm², durante 30 días, utilizándose una placa de plástico no adherente de 24 pocillos. La incubación se llevó a cabo en condiciones de normoxia (atmósfera húmeda con 5% de CO₂). Tras esperar unas horas

para permitir a las células penetrar y adherirse al biomaterial, se añadieron 650 μ l de medio de cultivo.

Para inducir la diferenciación condrogénica de las CMMs-MO_h se empleó el medio de diferenciación condrogénico comercial (*hMSC Commercial Chondrogenic Differentiation Medium*; Lonza, Biowhittaker, Belgium) suplementado con 10 ng/ml de *Recombinant Human Transforming Growth factor- β 3 (TGF- β 3)* (Prospec-Tany Technogene Ltd., Rehovot, Israel) y 100 nM de proteína relacionada con la hormona paratiroidea (*Parathyroid hormone-related protein, PTHrP*) (a partir de ahora se denominará medio condrogénico) . Se realizaron 3 réplicas de cada uno de los biomateriales.

Como control negativo de no diferenciación, cada tipo de biomaterial se cultivó en medio *DMEM*. En ambos casos, se procedió al cambio de medio cada 3-4 días, y se recogió el anterior sobrenadante en tubos *ependorffs* que se congelaron a -80°C hasta su posterior utilización para medir el colágeno y agregano liberado al medio por las células.

Células	Biomaterial	Medio de cultivo
CMMs-MO _h	Col I	DMEM 20%
CMMs-MO _h	Col I +1% HS	DMEM 20%
CMMs-MO _h	Col I +2% HS	DMEM 20%
CMMs-MO _h	Col I +3% HS	DMEM 20%
CMMs-MO _h	Col I	Medio condrogénico
CMMs-MO _h	Col I +1% HS	Medio condrogénico
CMMs-MO _h	Col I +2% HS	Medio condrogénico
CMMs-MO _h	Col I +3% HS	Medio condrogénico
Sin células	Col I	Medio condrogénico
Sin células	Col I +1% HS	Medio condrogénico
Sin células	Col I +2% HS	Medio condrogénico
Sin células	Col I +3% HS	Medio condrogénico

Tabla 1. Grupos de estudio

Se dejó un pocillo con cada tipo de biomaterial sin células, para que sirvieran como controles negativos para las mediciones posteriores de colágeno y agregano, y para el análisis mediante microscopía electrónica. Transcurridos 15 y 30 días, se extrajo un fragmento de los biomateriales mediante corte con bisturí, destinado a tres análisis diferentes: determinación de la presencia de moléculas características de cartílago hialino, tales como colágeno de tipo II y proteoglicanos, que se detectaron

mediante técnicas inmunohistoquímicas e histológicas; otra fracción fue procesada para ser examinada mediante microscopía electrónica; la fracción restante se congeló a -80°C para su posterior extracción de ARN y *Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)*.

c. Caracterización de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana.

i. Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo

Cada progenitor celular de una línea tisular concreta presenta un patrón de expresión de marcadores de superficie celular determinado. Así, para valorar la expresión de marcadores de superficie celular en las CMMs-MOh, se utilizaron los siguientes: CD73, CD44, CD105, CD106, CD166, CD45, CD29, CD34, CD90, CD117, CD271, STRO-1, SSEA-4 y antifibroblasto (Antifib).

Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia necesaria para llevar a cabo la citometría, las células se recuperaron por tripsinización y se procedió a su recuento en una cámara de Neubauer. Fue necesaria una densidad de 4×10^6 células por cada donante, de modo que sólo se pudieron analizar cinco de los diez donantes de los que se disponía.

Una vez realizado el recuento, las células se resuspendieron en tampón *FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting; BD Biosciences, EEUU)* y se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo en forma de "V" (NUNC™, VWR International, Dinamarca) aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/ pocillo. Se incubaron durante 40 min a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente, en completa oscuridad. En algunos casos, se realizó una incubación posterior de 30 min a 4°C , con un anticuerpo secundario.

Transcurrido este tiempo, las muestras se analizaron en un citómetro FACSCalibur (BD *Biosciences*, EEUU) y los resultados obtenidos se procesaron utilizando el programa informático CellQuest (BD *Biosciences*). Las células positivas se identificaron mediante comparación con los isotipos control FITC, PE, PECy5 y APC.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	ESPECIFICIDAD	CLON	CASA COMERCIAL
Isotipo FITC	1:50		MOPC-21	BD Pharmingen
Isotipo PE	1:50		MOPC-21	BD Pharmingen
Isotipo PECy5	4:50		1F8	Abcam
Isotipo APC	4:50		MOIPC-21	BD Pharmingen
α -mause	1:20	Inmunoglobulina (Ig)G, IgA, IgM murinas	F0313	Dako (PALEX MEDICAL,S.A.)
PE-CD29	3:50	Integrina β 1 Receptor Antígeno de Activación Tardío (VLA)del leucocito	MAR4	BD Pharmingen
PE-CD34	4:50	Antígeno de células Progenitoras Hematopoyéticas 1 (HPCA-1)	581	BD Pharmingen
FITC-CD44	1:50	Molécula de Adhesión Asociada al Anidamiento(HCAM)	IM7	BD Pharmingen
FITC-CD45	3:50	Antígeno Leucocitario Común (LCA)	HI30	BD Pharmingen
PE-CD73	3:50	Ecto-5'-nucleotidasa y la Glicoproteína de anclaje a la Glicosil fosfatidilinositol (GPI)	AD2	BD Pharmingen
PE-Cy5-CD90	1:50	Thy-1	5E10	BD Pharmingen
FITC-CD105	1:50	Endoglina	SN6	AbD Serotec
PE-CD106	6:50	Molécula de Adhesión Vascular de la Células 1 (VCAM-1)	51-10C9	BD Pharmingen
APC-CD117	2:50	c-kit, Receptor del Factor de Células Madre (SCFR)	YB5.B8	ABD Serotec1
PE-CD166	3:50	Molécula de Adhesión Celular del Leucocito Activado (ALCAM)	3A6	BD Pharmingen
CD271 (NM*)	1,5:1000	Receptor del Factor de Crecimiento Neuronal (NGFR) de baja afinidad humano p75	ME20.4	Sigma Aldrich Química
SSEA-4 (NM*)	2:50	Antígeno Específico de Estado Embrionario 4	MC-813-70	R & D Systems
STRO-1 (NM*)	30 μ l (0.45 μ g)	Antígeno Estromal 1 de médula y precursores estromales	NS1-Ag4-1	Developmental Studies Hybridoma Bank
Antifib (NM*)	1:100	Ratón anti-fibroblasto	1B10	Sigma Aldrich Química

Tabla 2. Anticuerpos empleados para la caracterización fenotípica de CMMs-MOH. NM*: anticuerpos no marcados con fluoróforo, por lo que necesitan un secundario marcado para ser detectados.

ii. Estudio de la multipotencialidad de las células madre mesenquimales de médula ósea humana mediante diferenciación celular in vitro

Tras varios pases celulares, una fracción celular se sometió a cultivo bajo condiciones específicas tratando de inducir su diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos:

- **Diferenciación adipogénica:**

Las células se sembraron en una cámara de ocho pocillos para microscopía, en una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ pocillo. Durante los tres primeros días se incubaron con medio *DMEM* para alcanzar el máximo de confluencia. Para inducir la adipogénesis, se utilizó el *kit Bullekit Adipogenic Differentiation Medium* (Lonza, Bélgica). Este *kit* está compuesto por un medio de inducción y otro de mantenimiento, los cuales se alternaron cada tres días, hasta transcurrir veintiuno, momento en el que se fijaron las células para su posterior tinción. La tinción se llevó a cabo con el colorante *oil red O* (Sigma Aldrich Química S.A., España), que permite la detección de inclusiones lipídicas en el citoplasma, características de la diferenciación adipogénica.

Cada pocillo de diferenciación se comparó con un control correspondiente a células cultivadas durante el mismo periodo de tiempo en medio *DMEM*.

- **Diferenciación osteogénica:**

Las células se sembraron en una cámara de 8 pocillos para microscopía, en una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ pocillo. Se incubaron con medio *DMEM* hasta alcanzar la confluencia, y posteriormente se cultivaron durante tres semanas en *hMSC Bullekit Osteogenic Differentiation Medium* (Lonza, Bélgica). Cada pocillo de diferenciación fue comparado con un control negativo, que se correspondía con células incubadas durante el mismo período de tiempo en medio *DMEM*.

Transcurrido ese tiempo, se fijaron las células en paraformaldehído, y los depósitos de calcio característicos de la diferenciación osteogénica en cultivo se visualizaron mediante la tinción rojo alizarina (Sigma Aldrich Química S.A., España).

- ***Diferenciación condrogénica:***

La condrogénesis se indujo mediante el empleo de la técnica de formación de *micropellet* (Johnstone *et al.*, 1998), con una densidad celular de 2.5×10^5 células.

Las células se centrifugaron a 300xg durante 10 min, y el *pellet* resultante se cultivó en medio condrogénico.

Este medio se cambió cada tres días, durante tres semanas, momento en el que las micromasas se incluyeron en parafina para su evaluación histológica e inmunohistoquímica. La diferenciación se comprobó comparando con un control negativo, que fue incubado durante el mismo período de tiempo en medio *DMEM*.

Tras la desparafinación en xilol y la rehidratación en una graduación de alcoholes decrecientes, se valoró la diferenciación condrogénica de las micromasas empleando las tinciones con Hematoxilina-Eosina (HE), el Tricómico de Masson Modificado (MM), el Azul de Toluidina (AT) y la Safranina O (SO).

En cuanto a la valoración inmunohistoquímica de la condrogénesis, las micromasas se incubaron con distintos anticuerpos primarios para detectar la presencia de colágeno de tipo I (Col I) (Abcam, España), Col II (BioNova Científica, España), tipo X (Col x) y agrecano C-20 (*Agg*) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Germany).

d. Estudio de la diferenciación condrogénica sobre los biomateriales.

i. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico de los biomateriales.

Para el análisis histoquímico de los biomateriales, éstos fueron fijados en paraformaldehído al 4%, e incluidos en parafina, tras 15 y 30 días de cultivo. Posteriormente se cortaron secciones de 4 μm de grosor, de los biomateriales, se desparafinaron con xylol, y se rehidrataron en una serie gradual de etanol.

Se realizó un análisis morfológico mediante las tinciones H-E y MM. Se empleó el colorante AT para la detección de proteoglicanos de la MEC, la SO para determinar la presencia de GAG sulfatados, característicos de la MEC del cartílago, y Von Kossa (VK), que permite detectar calcificaciones en la MEC.

Con respecto al análisis inmunohistoquímico, se incubaron las secciones de parafina (de 4µm de grosor) con anticuerpos primarios para detectar la presencia de:

- Col I (Abcam, España).
- Col II (BioNova Científica, España).
- Col X (Sigma-Aldrich, España).
- Agg (Santa Cruz Biotechnology Inc., Alemania).
- Metaloproteinasa 13(MMP13) (Thermo Fisher Scientific, España).
- Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) (Calbiochem, España).

El *kit* de detección empleado fue el peroxidase/DAB ChemMate™ DAKO EnVision™ (Dako Citomation, USA), para determinar la interacción antígeno-anticuerpo.

Para la preparación de controles de tinción negativos, se omitió el anticuerpo monoclonal primario.

Las muestras se visualizaron al microscopio óptico.

ii. Evaluación histoquímica e inmunohistoquímica de los biomateriales

Para cada grupo de estudio, y por medio de los colorantes HE y MM, se determinó:

- el porcentaje de células con respecto a área de biomaterial estudiado.
- la localización celular de las células en el biomaterial (superficial o interno).

- la morfología celular.
- la viabilidad.

Los resultados histoquímicos e inmunohistoquímicos se expresaron semicuantitativamente de acuerdo a la intensidad de la tinción, como:

- negativa o ausente (puntuado como – o 0).
- débil (puntuado como 1+).
- moderada (puntuada como 2+).
- fuerte (puntuada como 3+).

El porcentaje de células (con respecto al área de biomaterial estudiada), se agrupó de este modo:

- 1-24%.
- 25-49%.
- 50-74%.
- 75-100%.

Con respecto a la intensidad de la tinción, 3+ se asignará a la muestra del estudio con metacromasia o intensidad de tinción más alta, del total de muestras analizadas.

Es importante destacar que la tinción de SO muestra la presencia de GAG sulfatados, tiñéndolos de color naranja, debido a la metacromasia producida. Por esta razón en este tipo de tinción evaluaremos la intensidad de metacromasia, y no la intensidad de tinción.

iii. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión

Para el análisis de la ultraestructura de las CMMs-MOH, se visualizaron los biomateriales cultivados en medio condrogénico, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Como control negativo se emplearon los biomateriales sin célula cultivados en medio condrogénico. Previamente se fijaron con glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato sódico al 0,1 M y pH 7,4, durante 1h a 4°C. Posteriormente se hizo un lavado con tampón cacodilato durante al menos 2h. A continuación se llevó a cabo un tratamiento postfijación con tetraóxido de osmio (OsO₄) al

1% en tampón fosfato durante 1h, dejándolos a temperatura ambiente. Las muestras se deshidrataron con una serie gradual de etanol, y se incluyeron en medio de baja viscosidad Spurr (Spurr, 1969).

Se obtuvieron secciones ultrafinas con un microtomo modelo LEICA AG REICHERT ULTRACUT E 701704 (Leica AG Reichert Division, Austria), que se contratiñeron con citrato y acetato de uranilo. La ultraestructura de los biomateriales y las células se examinó haciendo uso de un microscopio de transmisión modelo JEOL JEM 1010 (Jeol, Japón).

iv. Análisis morfométrico mediante microscopía electrónica de barrido

Para estudiar la morfometría de las células cultivadas en medio condrogénico, se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), tanto los biomateriales con células en medio condrogénico, como sus controles sin células. Éstos se fijaron con glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato sódico 0,1M, a pH7,4 durante 24h a 4°C. A continuación las muestras se deshidrataron con acetona seguido de una deshidratación por punto crítico de CO₂ (Balzers, Alemania).

Por último se llevó a cabo un proceso de metalización de las muestras de biomaterial con oro.

Para el análisis morfométrico se empleó un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM 6400 (Jeol, Japón).

Los estudios de microscopía electrónica (MET y MEB) se realizaron en la unidad de microscopía de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña (UDC), con la ayuda de sus responsables, las Dras. Ada Castro Couceiro y Catalina Sueiro López.

v. Extracción de ARN, síntesis de ADNc, y PCR cuantitativa

El análisis mediante *qPCR* se llevó a cabo tanto para la caracterización celular de las CMMs-MOh, como para el estudio de la diferenciación condrogénica en las células sembradas en los biomateriales. En ambos casos se llevaron a cabo técnicas para extraer y aislar el ARN de las

células y sintetizar ADNc para su posterior empleo en la *qPCR*.

Aislamiento de ARN total: en las CMM-MO_h crecidas en monocapa sobre placas de 8 pocillos, la extracción se llevó a cabo con TRIzol® (*Invitrogen*) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Para extraer el ARN de las células crecidas tridimensionalmente en los soportes, fue necesario un proceso previo de homogenización con microdismembrador para facilitar la extracción.

Síntesis de ADNc: la integridad del ARN total aislado se valoró cuantificándolo a 260 nm utilizando el NanoDrop™ *spectrophotometer* (*Thermo Scientific*, España). Para comprobar la calidad y pureza del mismo se calculó el cociente A260/A280.

A partir de 1 µg de ARN aislado, se realizó un tratamiento con DNasa I, utilizando el *kit DNase I, RNase-free* (*Fermentas*, España). Posteriormente se llevó a cabo la *RT-PCR* (*Reverse transcription polymerase chain reaction*, transcripción reversa), empleando el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Roche*, Alemania), según las instrucciones de la casa comercial. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta que el ADNc fue amplificado. Se incluyeron controles negativos y positivos en cada experimento (datos no mostrados).

qPCR: El análisis mediante PCR en Tiempo Real (*qPCR*) se llevó a cabo empleando los cebadores que se muestran en la tabla 3 y el LightCycler® 480 Instrument (*Roche*) utilizando el LightCycler 480 SYBR Green I Master (*Roche*).

NOMBRE	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	CONTENIDO G/C		AMPLICIÓN
			Cebador Sentido	Cebador antisentido	
Sox9	5'gtacccgcacttgcaaac 3'	5'tcgctctcgttcagaagtctc 3'	58%	52%	72 nt
COL2A 1	5'gtgtcagggccaggatgt 3'	5'tcccagtgctcacagacacagat 3'	61%	50%	116 nt
FABP4	5'ggatgataaactgggtggga 3'	5'cacagaatggttagagtcaatgc 3'	48%	40%	125 nt
AMP1	5'ggtgagaaaggagatccaggt 3'	5'tgctgagcgggtatacataggc 3'	52%	52%	147 nt
LPL	5'agaacatcccattcactctgc 3'	5'ccattgagcttcaacatgagt 3'	48%	41%	107 nt
ALP	5'gacggaccgctcactctc 3'	5'gtgcccgtgtgcaattct 3'	67%	56%	109 nt
OP	5'cgcagacctgacatccagt 3'	5'ggctgtccaatcagaagg 3'	58%	58%	136 nt
TBP	5'gccatagtgatctttgcagt 3'	5'cgctggaactcgtctcacta 3'	48%	55%	142 pb

Tabla 3. Secuencias y condiciones de los cebadores empleados en la *qPCR* para la amplificación de ARNm humanos específicos de la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica y del gen de referencia TBP.

Los resultados de la *qPCR* se obtuvieron mediante una cuantificación relativa de la expresión génica, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para ello se necesitó un gen de referencia (*housekeeping*). En nuestro caso dicho gen fue el TBP (tabla 3), que ya había sido determinado en estudios previos mediante el algoritmo estadístico geNORM (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), que realiza una evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados. Los datos se normalizaron con respecto al valor más bajo de los obtenidos, el cual fue considerado como valor 1.

Los productos condrogénicos de la *qPCR* se visualizaron en geles de agarosa al 2% con *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogene S.A., España). Se empleó el marcador de pesos moleculares *DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder)* (Roche, Alemania). Los geles se visualizaron y fotografiaron en un Fujifilm LAS-3000 *Imager* (Fujifilm, Tokio).

vi. Medición de colágeno y glicosaminoglicanos liberados al medio de cultivo

Las mediciones se realizaron sobre los medios de cultivo de los biomateriales, que fueron recogidos cada 3-4 días. El colágeno se midió mediante ensayo colorimétrico con el *kit Syrcol Soluble Collagen Assay*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Bicolor, UK). Los GAG se midieron mediante análisis espectrofotométrico por Blyscan, con el *kit Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay*, siguiendo también las instrucciones de la casa comercial (Bicolor, UK). La absorbancia de las muestra se midió en un espectrofotómetro (Tecan Infinite® 200 PRO NanoQuan, Switherland).

Inicialmente se estudio la presencia de GAG en el sobrenadante de aquellos biomateriales que mostraron una mayor proliferación celular, ya que es dónde cabría esperar una mayor concentración. Los resultados obtenidos mostraban la ausencia de este componente de la matriz del cartílago, por lo que se tomó la determinación de no proseguir con las mediciones.

Con respecto al colágeno, se evaluó su presencia en los medios de cultivo de todos los grupos en estudio (Tabla 1). A los resultados obtenidos en los grupos de biomateriales con células en medio condrogénico, se les restó sus respectivos controles sin células, para evitar tener en cuenta el colágeno procedente de la degradación del biomaterial. Posteriormente estos datos se compararon con los obtenidos a partir de los grupos en medio *DMEM*.

e. Análisis estadístico de los datos

Las diferencias significativas entre medias y medianas se calcularon empleando el software SPSS 17.0 para *Windows*. Los p-valores <0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar (E.E).

5. RESULTADOS

a. Cultivo en monocapa de las células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana

Las CMMs se cultivaron en monocapa en los frascos de cultivos durante varios pases celulares (S), llegando hasta S4-S7. Durante este periodo, las células presentaban una morfología bipolar o poligonal, similar a la de los fibroblastos (figura 5). A lo largo de los subcultivos, mantenían esta morfología, y no se observaron cambios en su actividad proliferativa.

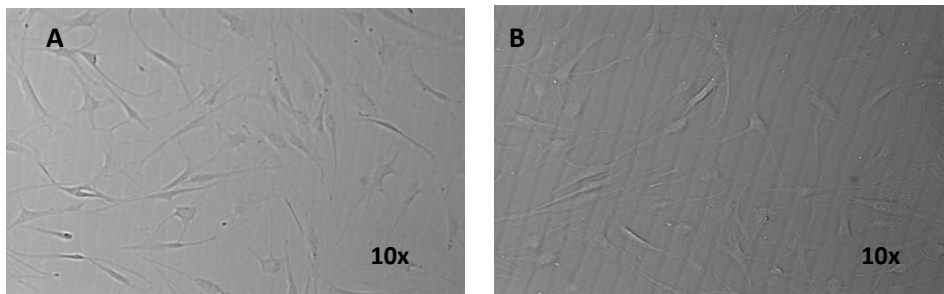


Figura 5. Cultivos celulares de las CMMs-MOH creciendo en monocapa bajo condiciones *in vitro*. S2(A); S3 (B).

b. Cultivo de las células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana sobre los biomateriales

Una vez sembradas las CMMs-MOH sobre los biomateriales y transcurridos unos días, se comenzó a observar una zona central más densa y de color blanquecino, que se correspondía con la región donde se había sembrado el botón celular (figura 6). En este sentido, se podía apreciar por un lado una porción central del soporte que contenía las células y por otro una región más periférica y menos densa que todavía no había sido colonizada por las células.

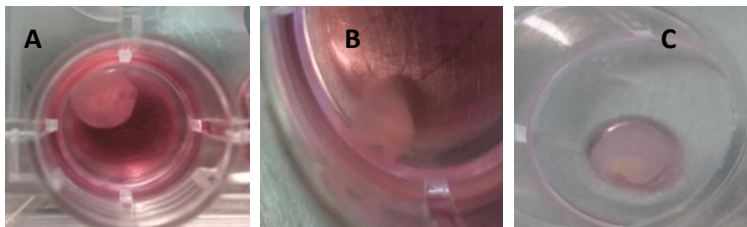


Figura 6. Biomateriales sembrados con CMMs-MOH en presencia de medio condrogénico. Transcurridos 15 días (A). Transcurridos 30 días (B y C).

c. Caracterización de las células aisladas de médula ósea humana

i. Caracterización mediante citometría de flujo

Tras llevar a cabo la caracterización fenotípica de las CMMs-MO_h, el perfil de expresión de marcadores de membrana obtenido se muestra en la figura 7.

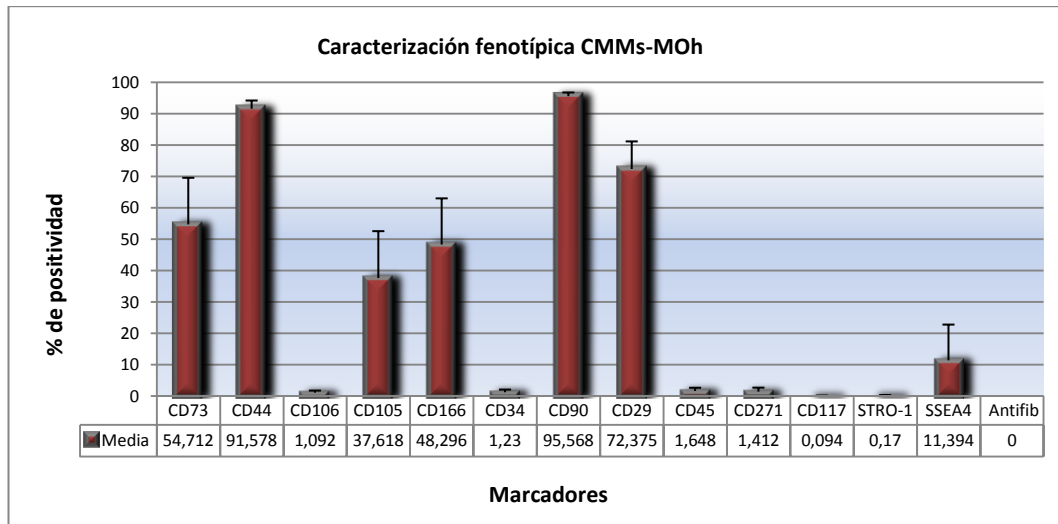


Figura 7. Porcentaje de positividad de los distintos marcadores de membrana empleados para la caracterización fenotípica de las CMMs-MO_h. Se representan los valores y las desviaciones típicas.

Se demostró la presencia de marcadores ya descritos para CMMs-MO_h en la población celular en estudio, obteniéndose porcentajes de positividad elevados para los marcadores CD44 ($91,58 \pm 2,61$ %), CD90 ($95,57 \pm 1,18$ %) y CD29 ($72,37 \pm 8,79$ %), y una expresión moderada de CD73 ($54,71 \pm 14,85$ %), CD166 ($48,30 \pm 14,71$ %) y CD 105 ($37,62 \pm 14,94$ %).

Por otro lado, se observó un porcentaje de positividad muy bajo de los marcadores hematopoyéticos CD34 ($1,23 \pm 0,84$) y CD45 ($1,648 \pm 0,9$), indicando que no hubo contaminación con células madre hematopoyéticas de la sangre de la médula ósea. Se obtuvo una ligera positividad para SSEA4 ($11,39 \pm 11,4$), característico de células madre embrionarias. Apenas se expresaban los marcadores CD271 ($1,41 \pm 1,28$), CD117 ($0,09 \pm 0,09$), STRO-1 ($0,17 \pm 0,17$) y se mostró la ausencia total de Antifib en la población (figura 8).

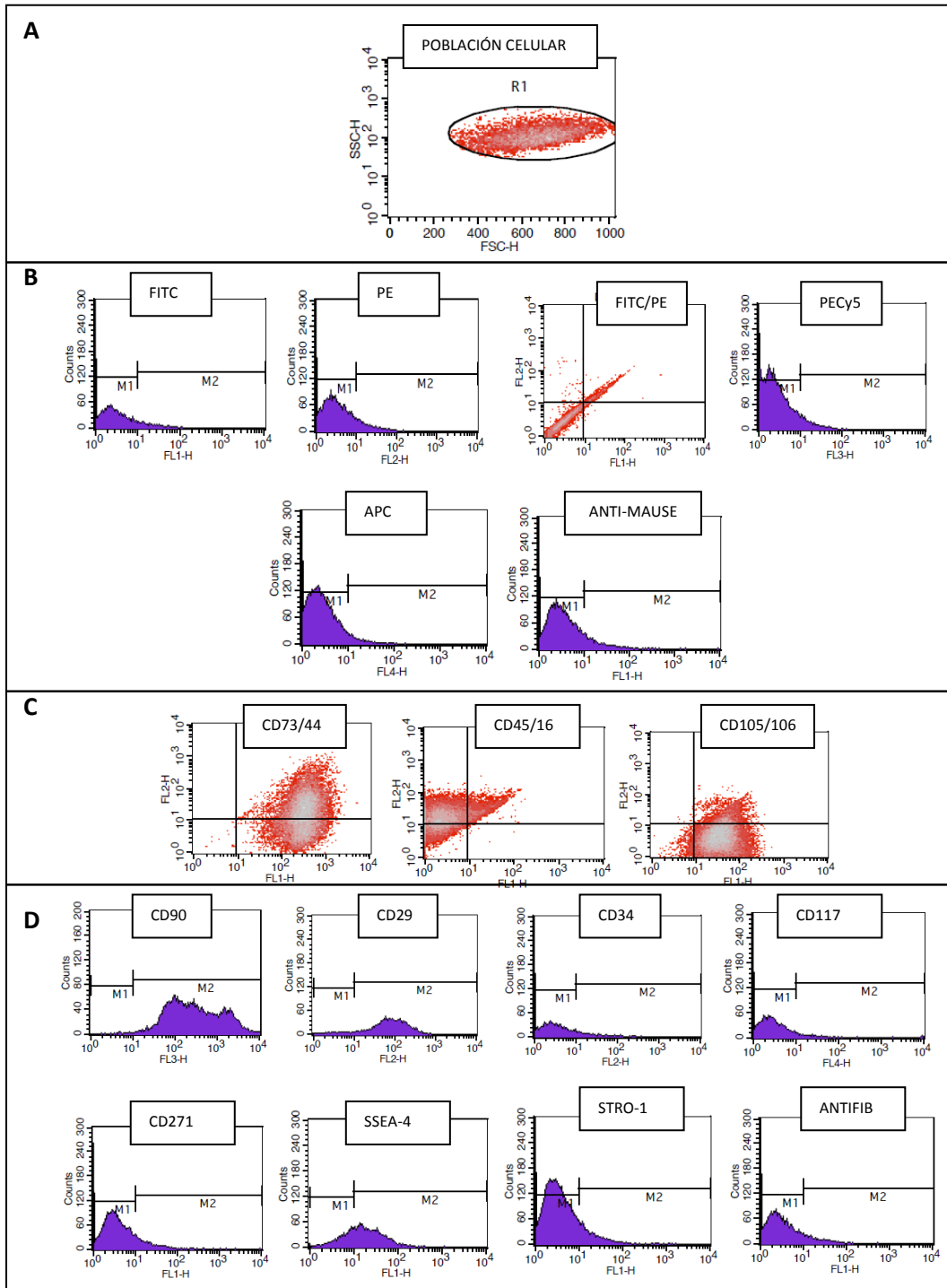


Figura 8. Gráficos obtenidos con el citómetro de flujo, mostrando la positividad obtenida para cada marcador empleado. Población celular (A). Isotipos control (B). Dobles marcajes (C). Marcaje sencillo (D).

ii. **Potencial de diferenciación *in vitro***

Para evaluar la diferenciación osteogénica y adipogénica, se realizaron tinciones con rojo alizarina y *oil red* respectivamente (figura 9), tanto de las células crecidas en medio de estimulación, como de sus respectivos controles en medio *DMEM*.

Los controles resultaron negativos en ambos casos (figura 9A y 9D). Las células estimuladas con medio adipogénico resultaron positivas para la tinción con *oil red*, pudiéndose apreciar las vesículas lipídicas características de adipocitos (figura 9B y 9C). En el caso de las CMMs-MOh sometidas a diferenciación osteogénica, los resultados tras la tinción con rojo alizarina demostraron la presencia de precipitados cálcicos característicos de osteoblastos (figura 9E y 9F).

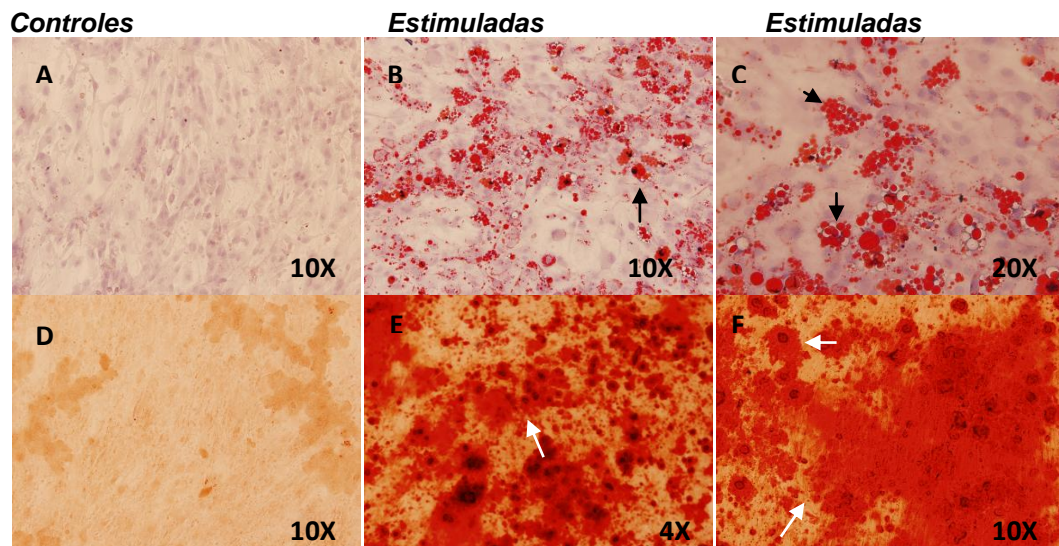


Figura 9. Diferenciación adipogénica y osteogénica de CMMs-MOh, tras 21 días de cultivo. Tinciones *oil red* (A-C) y rojo alizarina (D-F). Flechas negras: vesículas lipídicas; flechas blancas: precipitados cálcicos.

La morfología de las micromasas se evaluó empleando las tinciones H-E y MM (figura 10A). Todas las células demostraron su capacidad para la formación de micromasas, distinguiéndose una zona periférica más celular y una interna menos celular y con mayor presencia de MEC. La presencia de proteoglicanos se detectó a través de toda la MEC de las células que constituían el *micropellet* mediante tinciones con AT y SO (figura 10B).

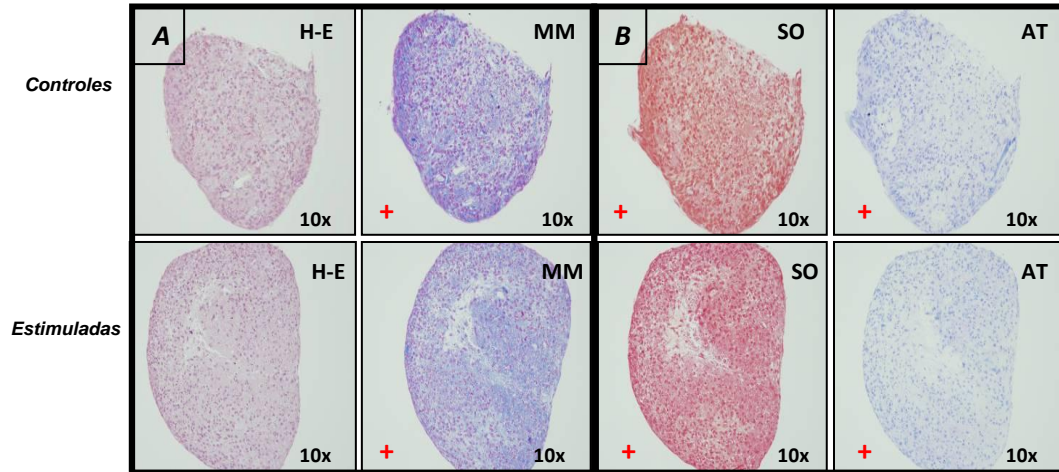


Figura 10. Micromasas obtenidas tras la diferenciación condrogénica de las CMMs-MO_h. Tinciones histológicas con H-E, MM, SO y AT.

Los análisis inmunohistoquímicos mostraron la presencia de Col II, característico del cartílago articular, con una mayor intensidad en las micromasas estimuladas que en el control en medio DMEM. Se detectó también una presencia débil de Col I y Col X (figura 11A) en los estimulados, siendo mayor en los controles. Con respecto al *Agg*, la tinción era de intensidad muy débil o ausente (Figura 11B), tanto en controles como estimulados.

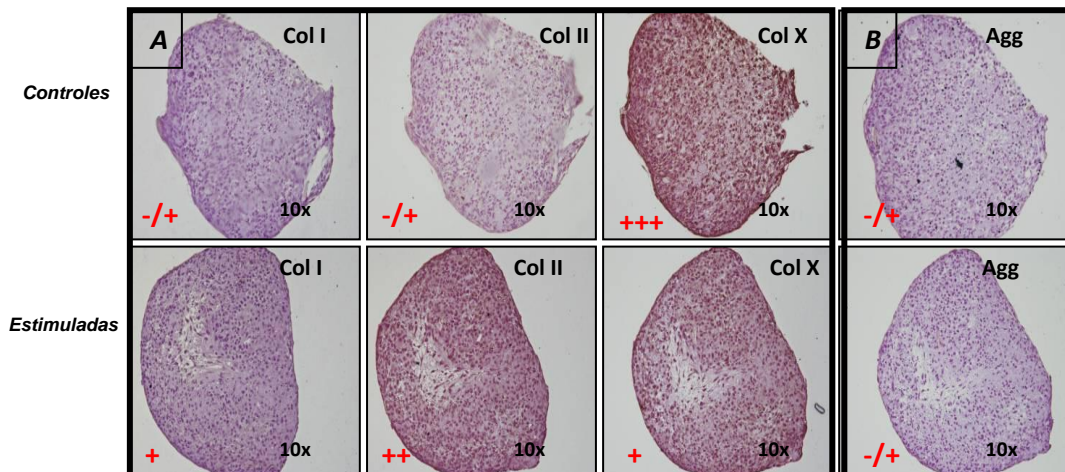


Figura 11. Micromasas obtenidas tras la diferenciación condrogénica de las CMMs-MO_h. Tinciones inmunohistoquímicas.

iii. Análisis molecular de la diferenciación celular

La diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica se valoró también mediante *qPCR*. Se estudió la expresión de algunos genes específicos de éstos linajes. Todos estos análisis se llevaron a cabo en

las células tras el proceso de diferenciación inducida, además de en un control de no diferenciación en medio *DMEM*.

Diferenciación adipogénica: se analizaron los niveles de expresión de adiponectina (*AMP1*), lipoproteína lipasa (*LPL*) y proteína de unión a ácidos grasos (*FABP4*), con respecto al valor obtenido en los controles en medio *DMEM* a $t=21$, los cuales se consideraron como el valor 1, y se midieron los niveles de expresión relativa (*REL*).

La expresión relativa de estos genes fue inferior que la de sus respectivos controles de no diferenciación en medio *DMEM* tras 21 días de cultivo (figura 12).

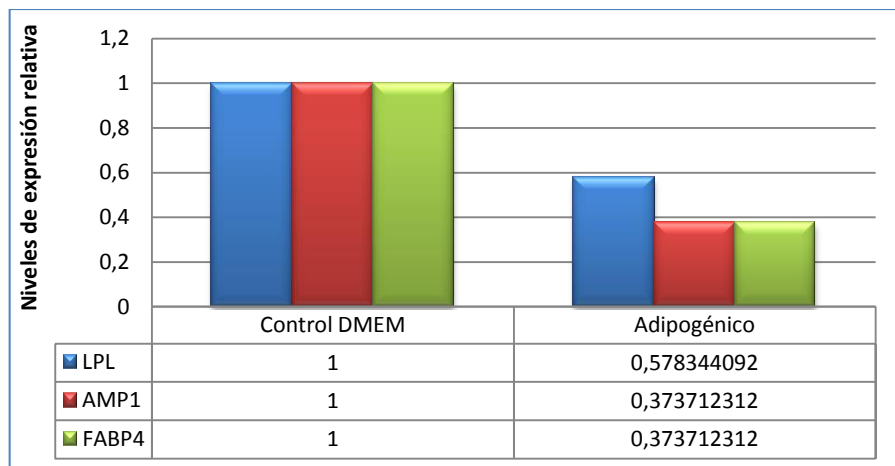


Figura 12. Niveles de expresión relativos de genes típicos de diferenciación celular adipogénica en CMMs-MO_h, cultivadas en medio *DMEM* y adipogénico.

Diferenciación osteogénica: los datos se normalizaron con respecto al valor obtenido en osteogénesis a $t=21$, el cual se consideró como equivalente a 1, y se analizaron los *REL* de osteopontina (*OP*) y fosfatasa alcalina (*ALP*).

La expresión relativa de *ALP* era 6,3 veces mayor en las células cultivadas en medio osteogénico que en las células cultivadas en medio *DMEM*. En el caso de *OP* fue también 1089 veces mayor en las células cultivadas en medio de diferenciación osteogénico (figura 13). Estos

resultados mostraron la capacidad de las CMMS-MOH de diferenciarse hacia osteoblastos.

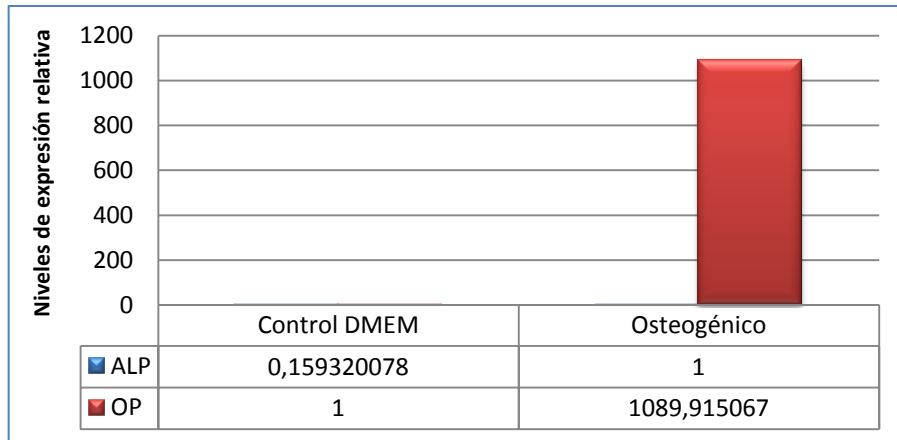


Figura 13. Niveles de expresión relativos de genes típicos de diferenciación celular osteogénica en CMMs-MOH, cultivadas en medio *DMEM* y osteogénico.

Diferenciación condrogénica: los datos se normalizaron con respecto al valor obtenido en los controles en medio *DMEM* a $t=21$, el cual se consideró equivalente a 1, y se midieron los NER. *Col II* mostró una expresión relativa de 5,06 veces superior en las células diferenciadas que en las células cultivadas en medio *DMEM*. En el caso de *Sox9* los niveles de expresión relativos fueron 8,28 veces superiores en las células diferenciadas en comparación con las células control cultivadas en medio *DMEM* (figura 14).

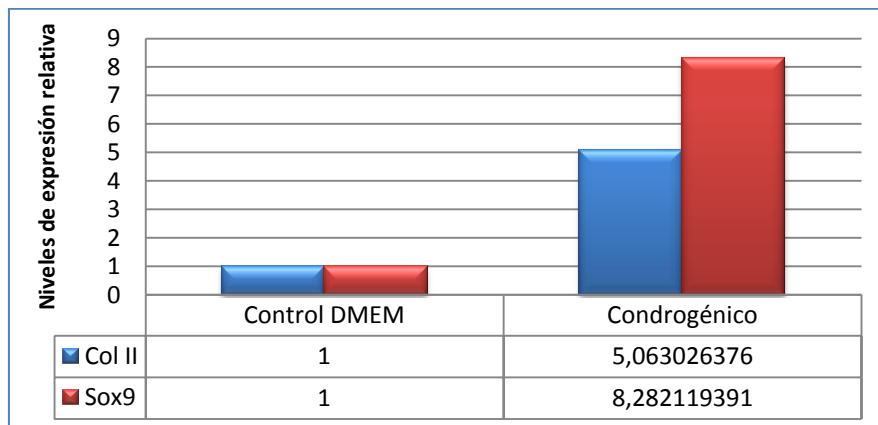


Figura 14. Niveles de expresión relativos de genes típicos de diferenciación celular condrogénica en CMMs-MOH, cultivadas en medio *DMEM* y condrogénico.

d. Estudio de la diferenciación condrogénica sobre los biomateriales
i. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico

En todos los casos se consideraron por separado la positividad de las tinciones debida al propio biomaterial, o a la MEC, teniendo en consideración únicamente esta última.

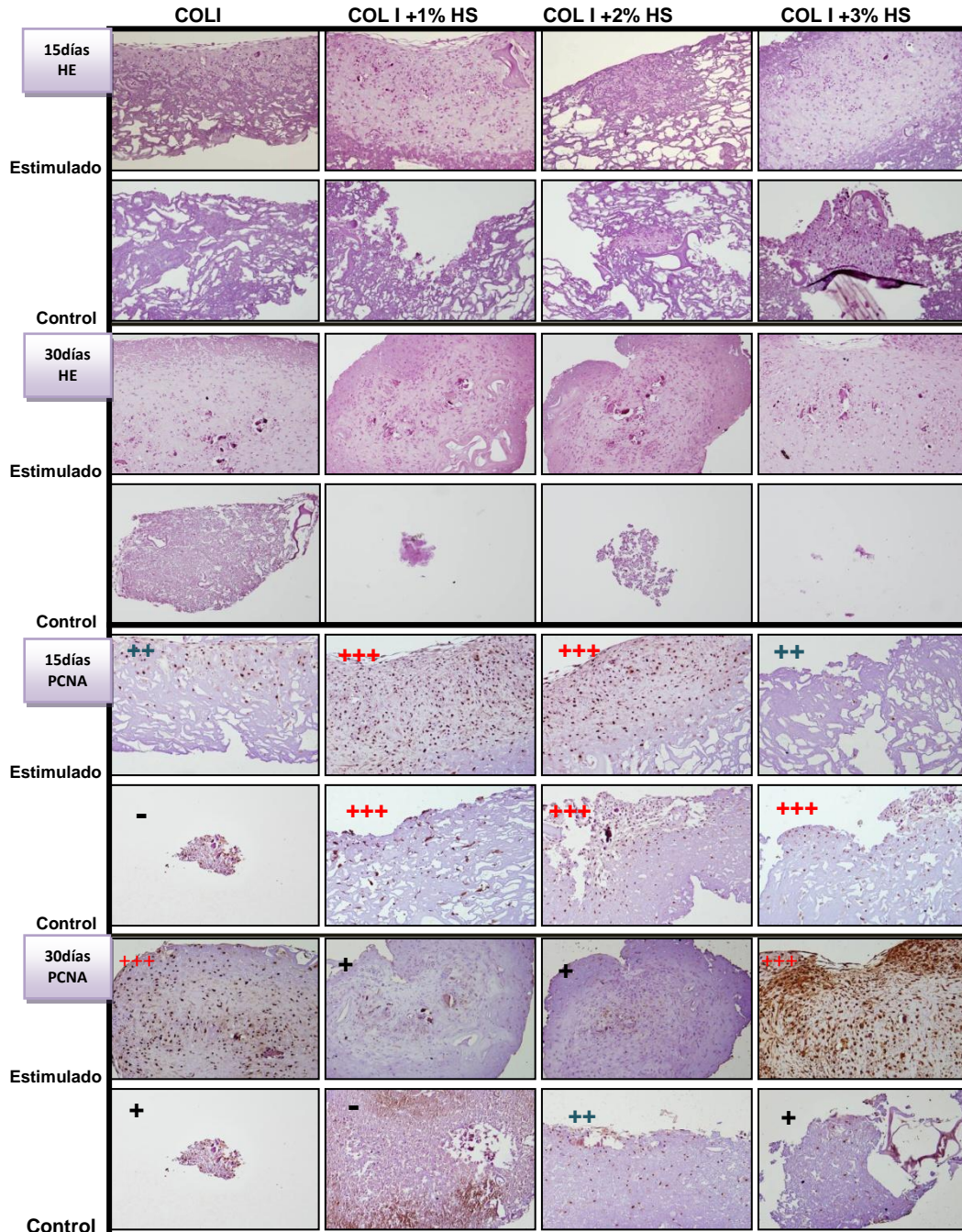


Figura 15. Resultado de las tinciones obtenidas con H-E y PCNA sobre biomateriales. Control: biomateriales con células en medio *DMEM*; Estimulado: biomateriales con células en medio condrogénico. Positividad de la tinción: negativa (-); débil (+); moderada (++); fuerte (+++). Magnificación: 10x.

Mediante el análisis morfológico de las muestras con la tinción H-E (figura 15), se observó que en los biomateriales con células cultivadas en medio condrogénico, había una elevada presencia celular y síntesis de MEC en todos los casos. A los 15 días, este crecimiento fue más notable en los biomateriales con Col I +1% HS y Col I +3% HS. En los otros soportes (Col I y Col I +2% HS) las células y la MEC no cubrieron la totalidad del biomaterial, quedando centradas en una región más aislada. En sus respectivos controles de no diferenciación celular, cultivados en medio *DMEM* no se observó MEC, y aún se visualizaban perfectamente las fibras que constituían el biomaterial. Transcurridos 30 días, tanto las células como la MEC se distribuyeron por todo el biomaterial en todos los casos de estimulación. En los controles de no diferenciación tampoco se observó la presencia de células y MEC.

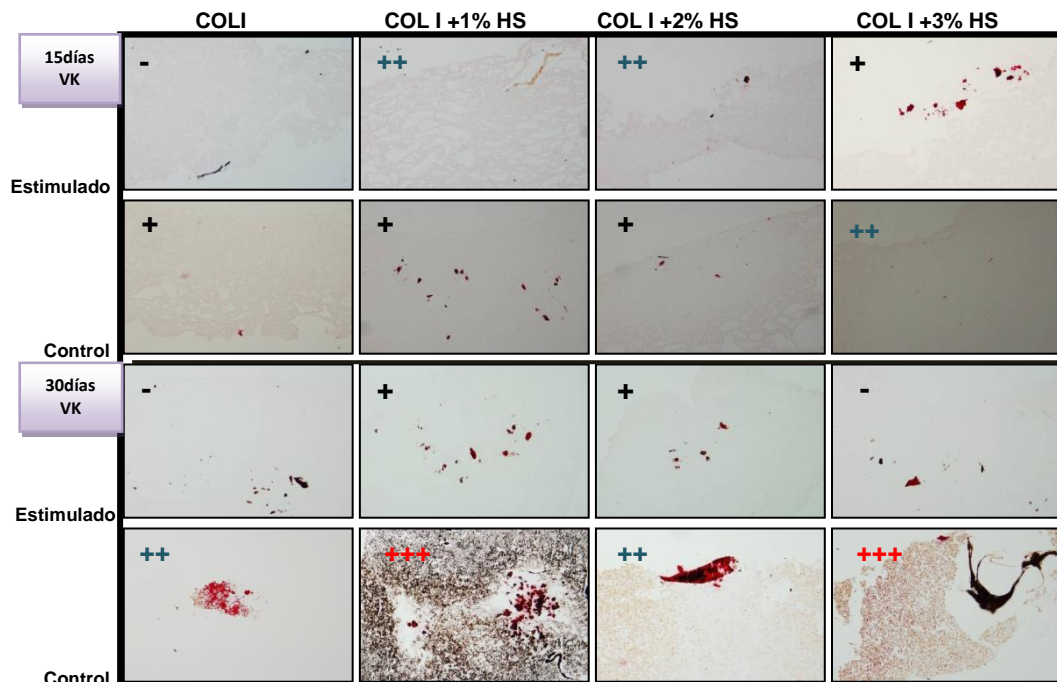


Figura 16. Resultado de las tinciones obtenidas con VK sobre biomateriales. Control: biomateriales con células en medio *DMEM*; Estimulado: biomateriales con células en medio condrogénico. Positividad de la tinción: negativa (-); débil (+); moderada (++); fuerte (+++). Magnificación: 10x.

Para comprobar que tanto a los 15 como a los 30 días las células no sólo estaban presentes, sino que también continuaban proliferando, se estudió

la presencia del marcador *PCNA* mediante tinción inmunohistoquímica (figura 15). La intensidad de la tinción fue fuerte a los 15 días tanto en los controles de no diferenciación como en los estimulados, indicando una gran proliferación celular. A los 30 días, apenas se detectó en los controles, mientras que en los estimulados seguía estando presente.

Las tinciones con VK tras 15 días, mostraron una intensidad moderada en los biomateriales Col I +1% HS y Col I +2% HS cultivados en medio condrogénico, siendo débil en los restantes biomateriales. A los 30 días, resultó fuertemente positiva en Col I +3% HS en *DMEM*, y moderada o débil en el resto (*DMEM* y condrogénico) (figura 16).

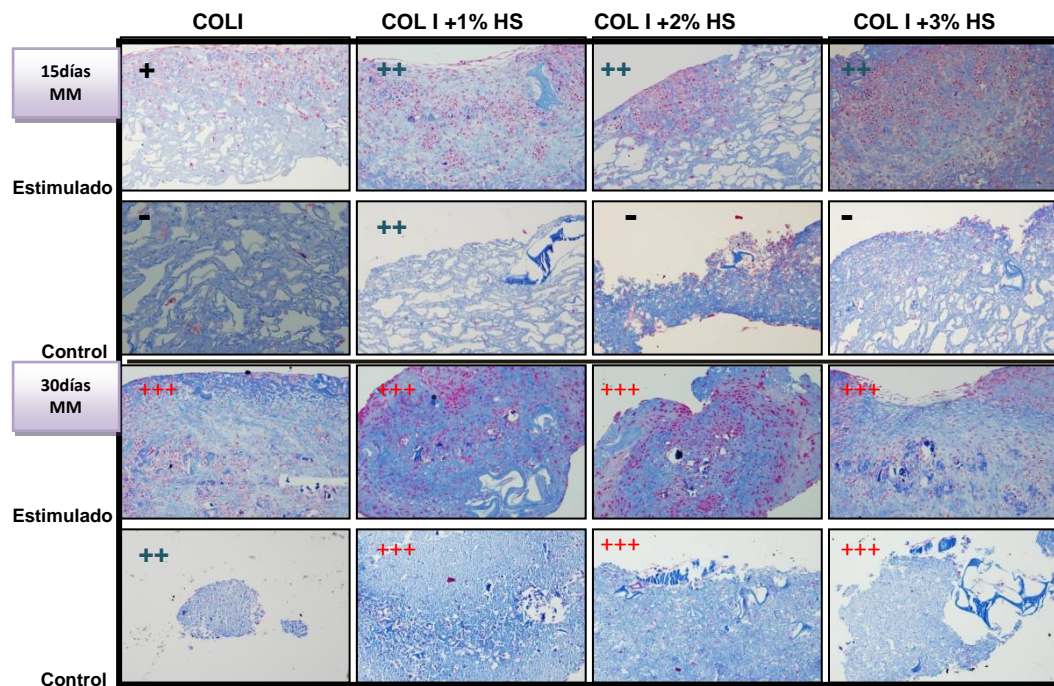


Figura 17. Resultado de las tinciones obtenidas con MM sobre biomateriales. Control: biomateriales con células en medio *DMEM*; Estimulado: biomateriales con células en medio condrogénico. Magnificación: 10x

Los análisis morfológicos con MM mostraron que a los 15 días había presencia celular en todos los biomateriales estimulados, siendo muy baja o nula en los controles de no diferenciación. Cabe destacar la distribución homogénea de las células y la notable presencia de colágeno en la MEC de Col I +3% de HS. Transcurridos 30 días, hubo un aumento de la síntesis de MEC en las células estimuladas (figura 17).

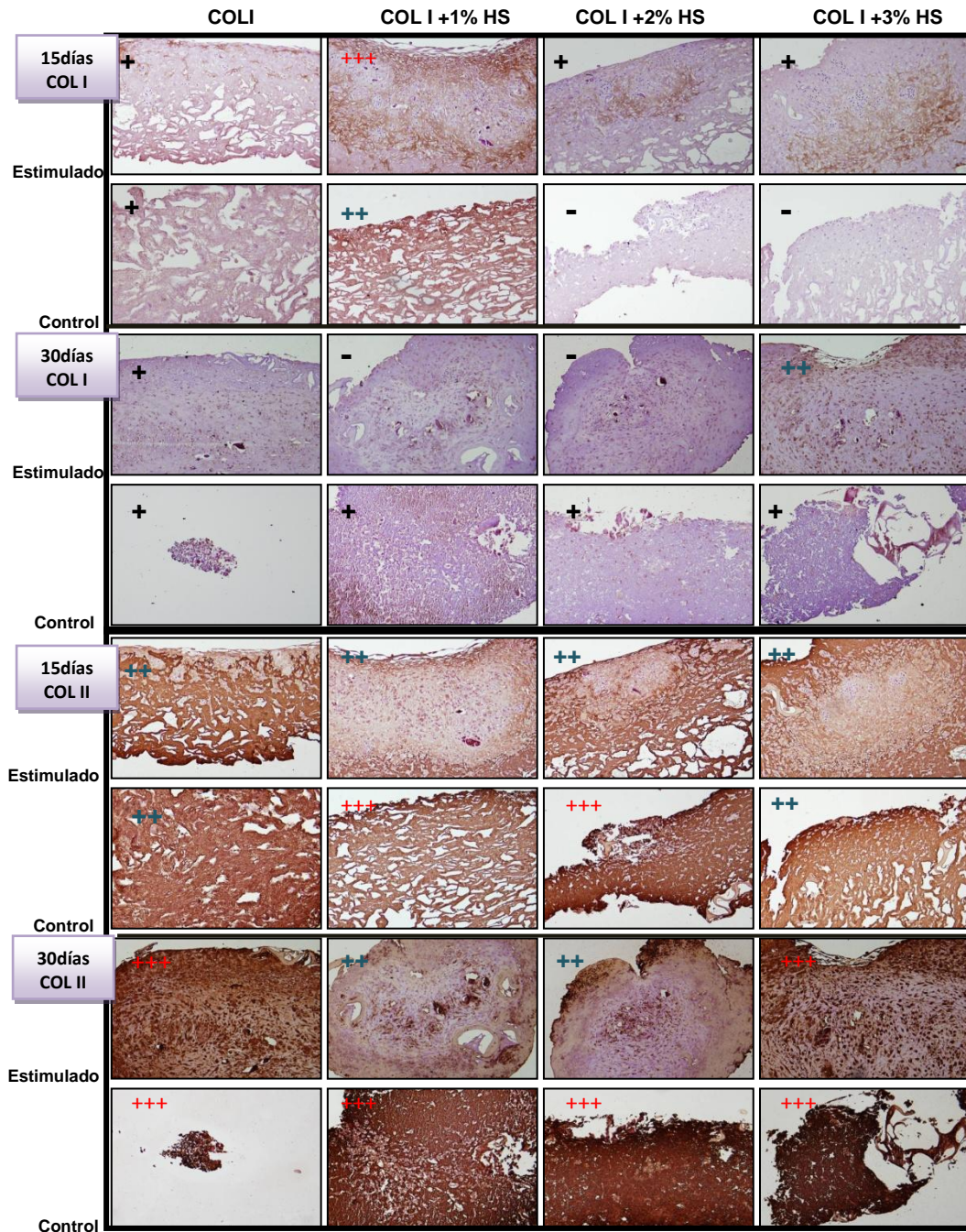


Figura 18. Resultado de las tinciones inmunohistoquímicas obtenidas para Col I y Col II sobre biomateriales. Control: biomateriales con células en medio *DMEM*; Estimulado: biomateriales con células en medio condrogénico. Positividad de la tinción: negativa (-); débil (+); moderada (++); fuerte (+++). Magnificación: 10x.

El análisis inmunohistoquímico realizado para detectar la presencia de colágeno, mostró positividad para Col II en la MEC de todos los biomateriales. A los 15 días dicha positividad fue moderada en todos los biomateriales estimulados. Se produjo un aumento a los 30 días de positividad moderada a fuerte en el caso de los biomateriales Col I y Col I

+3% HS. No se detectó Col I en ninguna muestra a excepción de algunos casos en la MEC de las células en medio *DMEM* (figura 18). Se obtuvo positividad para Col X en los biomateriales y en la MEC de los controles no estimulados. Se detectó su presencia también en la MEC en los biomateriales con medio condrogénico (figura 19).

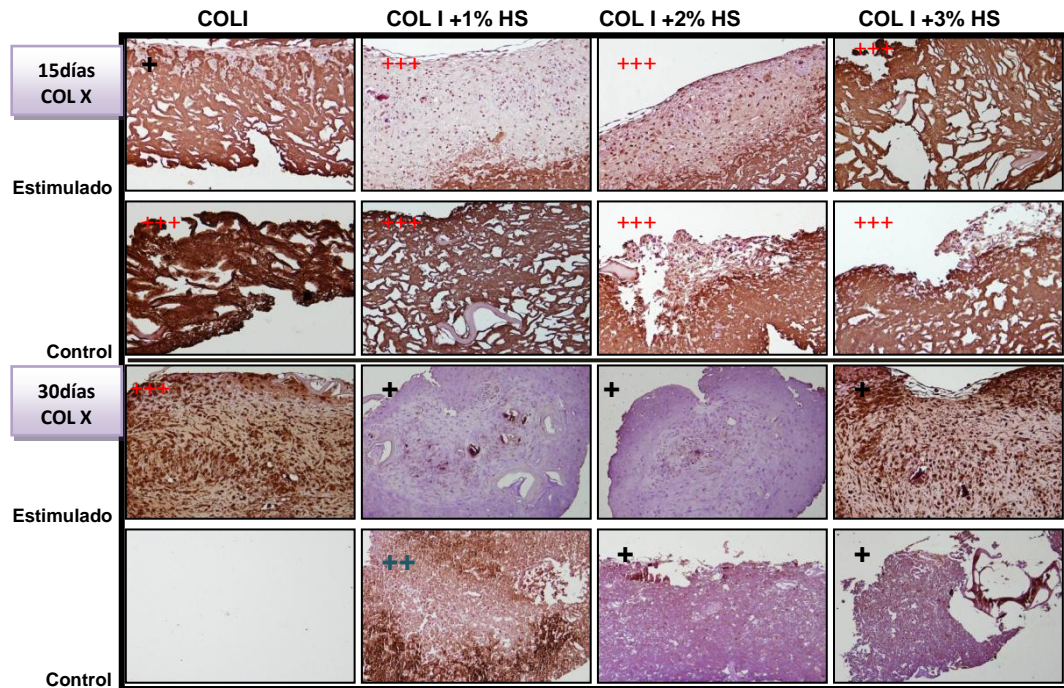


Figura 19. Resultado de las tinciones inmunohistoquímicas obtenidas para Col X sobre biomateriales. Control: biomateriales con células en medio *DMEM*; Estimulado: biomateriales con células en medio condrogénico. Positividad de la tinción: negativa (-); débil (+); moderada (++); fuerte (+++). Magnificación: 10x.

El análisis inmunohistoquímico para la detección de MMP13, a los 15 días de cultivo, mostró como resultado una positividad débil para los biomateriales estimulados. En el caso de los controles en medio *DMEM* la positividad resultó algo superior (moderada).

Tras 30 días de cultivo, este enzima no se detectó ni en los biomateriales estimulados ni en los controles de no diferenciación.

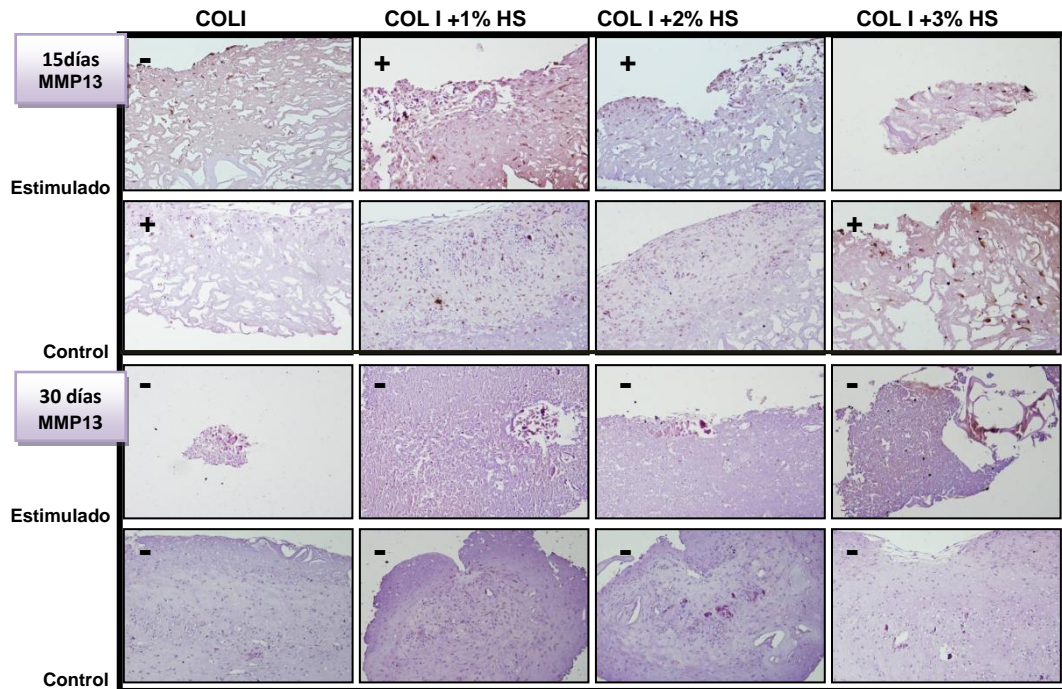


Figura 20. Resultado de las tinciones para MMP-13 sobre los biomateriales. Control: biomateriales con células en medio *DMEM*; Estimulado: biomateriales con células en medio condrogénico. Positividad de la tinción: negativa (-); débil (+); moderada (++); fuerte (+++). Magnificación: 10x

Con respecto al AT (solo a los 15 días), todos los biomateriales resultaron negativos para esta tinción, mientras que las células mostraron una fuerte intensidad en el caso del medio condrogénico, y muy baja en los controles (figura 21).

Al teñirse con SO, en la MEC se observó una fuerte positividad en todos los biomateriales cuando fueron estimuladas en medio de diferenciación condrogénica, tanto a los 15 como a los 30 días. La coloración fue más intensa tras 30 días. En aquellos en los que se cultivaron en medio *DMEM*, la coloración adquirió una intensidad muy tenue (positividad baja).

Con relación a la positividad del biomaterial, esta tinción fue tenue para todos los soportes analizados tras 15 días de cultivo. Sin embargo, a los 30 días la tinción resultó negativa.

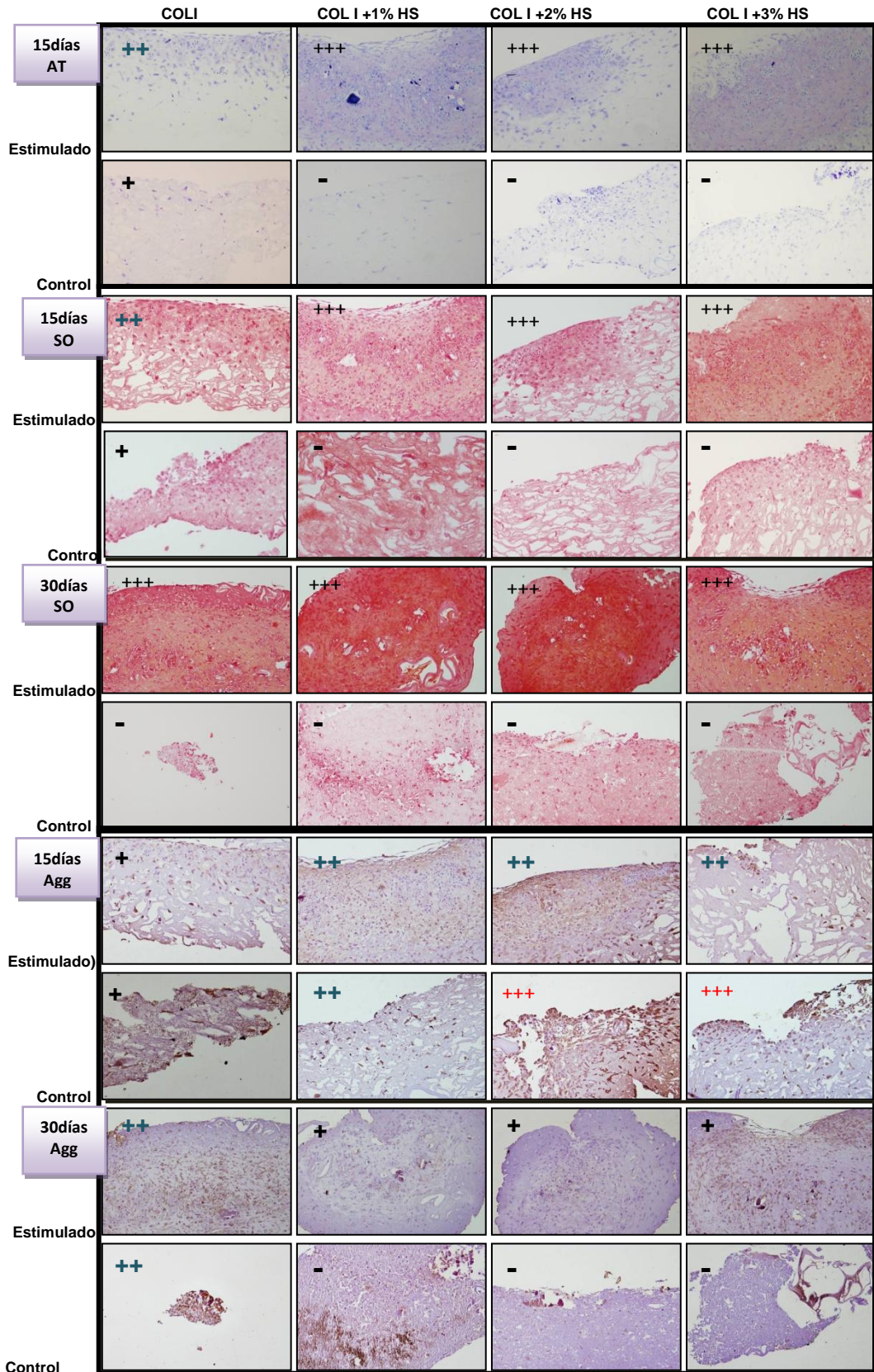


Figura 21. Resultado de las tinciones con AT, SO y Agg sobre los biomateriales. Control: biomateriales con células en medio *DMEM*; Estimulado: biomateriales con células en medio condrogénico. Positividad de la tinción: negativa (-); débil (+); moderada (++); fuerte (+++). Magnificación: 10x.

Se detectó una positividad moderada para el Agg a los 15 días en todos los biomateriales. A los 30 se produjo un leve descenso, mostrando una positividad débil, excepto en el biomaterial Col I, donde continuó siendo moderada.

Para evaluar el porcentaje celular con respecto al área de biomaterial estudiado, así como las zonas en las que se encontraba una mayor abundancia celular (en la superficie o en el interior del biomaterial), se interpretaron conjuntamente los resultados obtenidos con las tinciones H-E y MM. A los 15 días, se observaron células en la superficie y en el interior del biomaterial en todos los grupos a estudiar. El mayor porcentaje celular, se mostró en los biomateriales Col I +1% HS (> 80%) y Col I +3% HS (> 75%), en medio condrogénico. A éstos le sigue Col I (> 45%) en medio condrogénico, y Col I + 2% HS en medio condrogénico (>15%) En todos estos casos, la morfología celular fue buena, apreciándose la formación de agregados celulares (tabla 5).

BIOMATERIAL	% DE CÉLULAS	LOCALIZACIÓN CELULAR	MORFOLOGÍA CELULAR
Col I medio DMEM	< 1%	Superficie e interior	Regular
Col I +1% HS medio DMEM	< 1%	Superficie e interior	Regular Buena
Col I +2% HS medio DMEM	> 10%	Superficie e interior	Regular
Col I +3% HS medio DMEM	> 5%	Superficie e interior	Regular
Col I medio condrogénico	> 45%	Superficie e interior	Buena
Col I +1% HS medio condrogénico	> 80%	Superficie e interior	Buena
Col I +2% HS medio condrogénico	> 15%	Superficie e interior	Buena
Col I +3% HS medio condrogénico	> 75%	Superficie e interior	Buena

Tabla5. Tabla elaborada a partir de las tinciones de H-E y AT tras 15 días de cultivo.

Transcurridos los 30 días, en los controles el porcentaje celular resultó nulo o muy bajo (< 1%). Con respecto los estimulados el mayor porcentaje celular se obtuvo en Col I +3% HS (> 90%), y en el resto fue superior a un 80%, observando de nuevo una buena morfología celular, aunque a este tiempo se observaron también calcificaciones (tabla 6).

BIOMATERIAL	% DE CÉLULAS	LOCALIZACIÓN CELULAR	MORFOLOGÍA CELULAR
Col I medio <i>DMEM</i>	0%		Necrosis
Col I +1% HS medio <i>DMEM</i>	0%		Necrosis. Calcificaciones
Col I +2% HS medio <i>DMEM</i>	< 1%	Superficie e interior	Calcificaciones
Col I +3% HS medio <i>DMEM</i>	0%		Necrosis
Col I medio condrogénico	> 80%	Superficie e interior	Buena. Calcificaciones
Col I +1% HS medio condrogénico	> 80%	Superficie e interior	Buena. Calcificaciones
Col I +2% HS medio condrogénico	> 80%	Superficie e interior	Buena. Calcificaciones
Col I +3% HS medio condrogénico	> 90%	Superficie e interior	Buena. Calcificaciones

Tabla 6. Tabla elaborada a partir de las tinciones de H-E y AT tras 30 días de cultivo.

ii. Análisis molecular de la diferenciación celular

La diferenciación condrogénica tras 30 días de cultivo se valoró estudiando la expresión de genes específicos de linaje. Los genes estudiados fueron *Col II* y *Sox9*.

Los datos se normalizaron con respecto al valor obtenido para Col I +-%HS en medio *DMEM*, el cual se consideró como valor 1, y se calcularon los NER. Se comparó la expresión relativa de dichos genes en los biomateriales en medio condrogénico con la de sus respectivos controles en medio *DMEM* (figura 22).

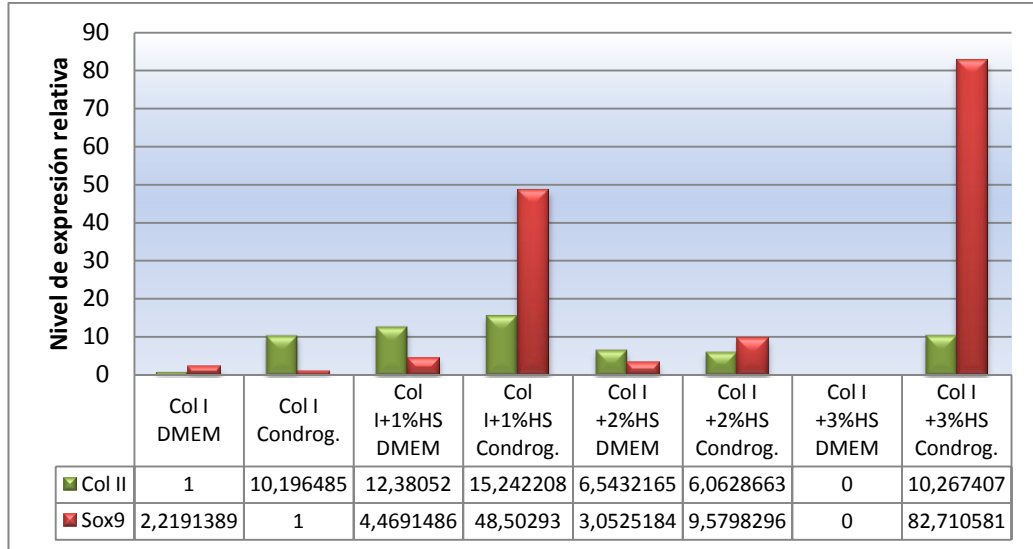


Figura 22. Expresión relativa de genes típicos de diferenciación celular condrogénica. Comparación de los resultados obtenidos en medio condrogénico “Condrog” con sus controles “DMEM”.

El biomaterial Col I +3% HS mostró la mayor expresión de los genes *Col II* y *Sox9* (entre 10,3 y 82,7 veces superiores a los de su respectivo control), seguido de Col I +1% HS, en el que eran entre 1,23 y 10,88 veces superiores. Para Col I +2%HS los niveles de expresión resultaron entre 0,92 y 3,14 veces superiores. Por último, el biomaterial Col I presentaba un nivel de expresión de *Col II* 10,2 veces superior en relación al control, aunque en el caso de *Sox9*, el nivel de expresión fue mayor en el control que en el condrogénico.

Los productos condrogénicos de *qPCR* se visualizaron en un gel (figura 23). Tanto para el gen de referencia *TBP*, como para *Col II* y *Sox9*, todas las muestras mostraron una sola banda.

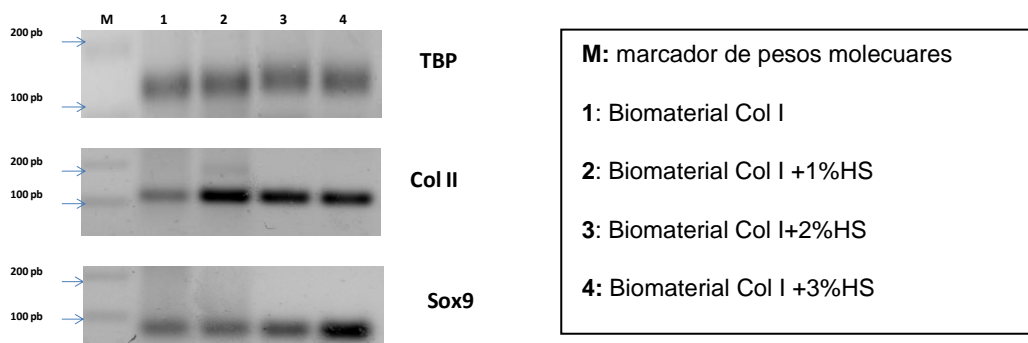


Figura 23. Geles de agarosa al 2%. Para cada una de las muestras, se amplificó el gen de referencia *TBP* para analizar la integridad del ADNc sintetizado.

iii. Mediciones de colágeno liberado al medio por las células

Para poder determinar la liberación de colágeno por parte de las células al medio de cultivo se realizó un ensayo Elisa. Las concentraciones de colágeno soluble fueron medidas en un volumen total de 650 μl de cada uno de los sobrenadantes del medio de cultivo.

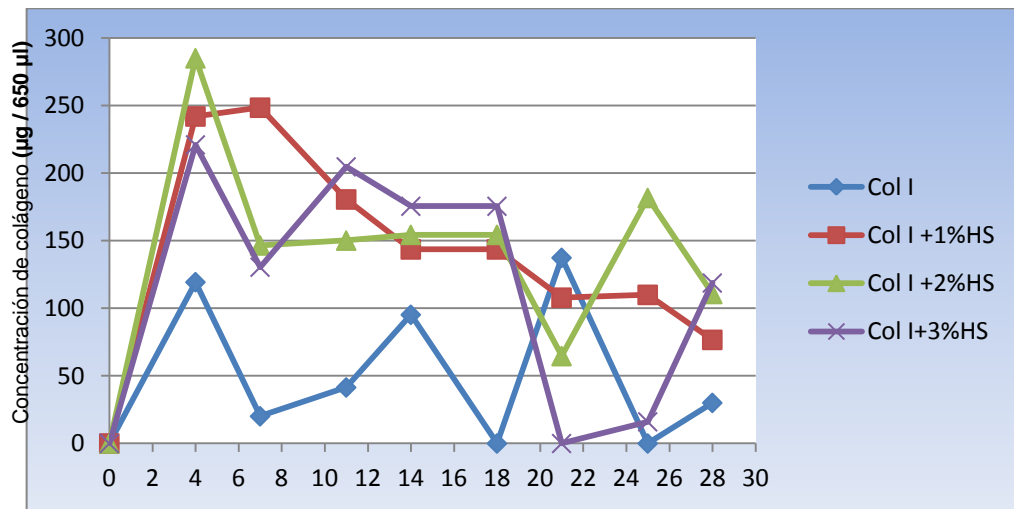


Figura 24. Representación de las diferentes concentraciones de colágeno liberado al medio de cultivo por las células en cada biomaterial cada 3-4 días. Los cálculos se efectuaron con varias réplicas para cada biomaterial (n=3), calculando la media de sus respectivas absorbancias, y a partir de ella su concentración correspondiente.

Para considerar únicamente el colágeno presente en el medio de cultivo que es liberado por las células, a cada biomaterial con células se le restó su respectivo control sin células, que consistió en el biomaterial sin células cultivado en el mismo medio de cultivo, medio condrogénico (figura 24).

Observamos que se produce liberación de colágeno para cada tiempo a estudio, exceptuando el intervalo 21-25 días (tabla 7) indicando que se produjo la liberación de colágeno al medio de cultivo por parte de las células.

Las células cultivadas sobre el biomaterial compuesto por Col I fue el que mostró una menor liberación de colágeno al medio de cultivo, mostrando además una tendencia opuesta a la del resto. En el biomaterial Col I +1%

HS se produjo un descenso gradual en la liberación de colágeno al medio durante todo el período de cultivo. En el soporte de Col I +2% HS y Col I +3% HS, también se observa un descenso en la liberación de colágeno a medida que transcurrían los 30 días, excepto en el intervalo 6-18 días, en el que se estabiliza, y en los dos últimos intervalos de tiempo, en los que cabe destacar un aumento bastante notable con respecto al intervalo anterior (salvo en el biomaterial Col I +2%HS).

DÍAS	4	7	11	14	18	21	25	28
Col I Control	119,32504	20,120682	41,454428	95,209328	0	137,335	0	30,051635
Col I 1%	241,90109	248,39501	180,52815	143,58631	143,58631	107,84946	109,95209	76,665629
Col I 2%	284,9325	146,51384	150,12067	154,35024	154,35024	64,656292	181,6199	110,60715
Col I 3%	220,907	130,39627	204,65195	175,47372	175,47372	0	16,028605	118,71041

Tabla 7. Concentraciones calculadas a partir de la absorbancia del medio de cultivo. Biomateriales estimulados.

Por el contrario, los análisis llevados a cabo en los sobrenadantes obtenidos de los biomateriales en medio *DMEM*, mostraron ausencia de liberación de colágeno al medio de cultivo (tabla 8). En casos excepcionales se obtuvo alguna liberación de colágeno, aunque ésta resultó ser muy pequeña, indicando que apenas se produjo liberación de colágeno al medio de cultivo. De este modo, la concentración de colágeno soluble presente en el medio de cultivo a cada intervalo de tiempo medido, fue superior en los biomateriales estimulados que en los controles, existiendo diferencias significativas entre ambos ($p < 0,05$ empleando la prueba *U* de *Mann-Whitney*), exceptuando el tiempo 18 y 25 para el biomaterial Col I, y el tiempo 21 para el biomaterial Col I +3%HS.

DÍAS	4	7	11	14	18	21	25	28
Col I Control	0	0	0	1,01266781	0	0	0	0
Col I 1%	0	0	0	0	0	0	0	0
Col I 2%	0	0	0	0	0	0	0	0
Col I 3%	5,73666731	0	0	0	0	0	0,0876681	0

Tabla 8. Concentraciones calculadas a partir de la absorbancia del medio de cultivo. Biomateriales control de no diferenciación.

e. Análisis morfométrico mediante microscopía electrónica de barrido

El análisis mediante MEB se llevó a cabo en los biomateriales que habían sido cultivados en medio condrogénico, y sus respectivos controles sin células. Las muestras se analizaron tras 15 y 30 días de cultivo.

A ambos tiempos se observaron un gran número de células sobre cada biomaterial en el que se habían sembrado (figura 23).

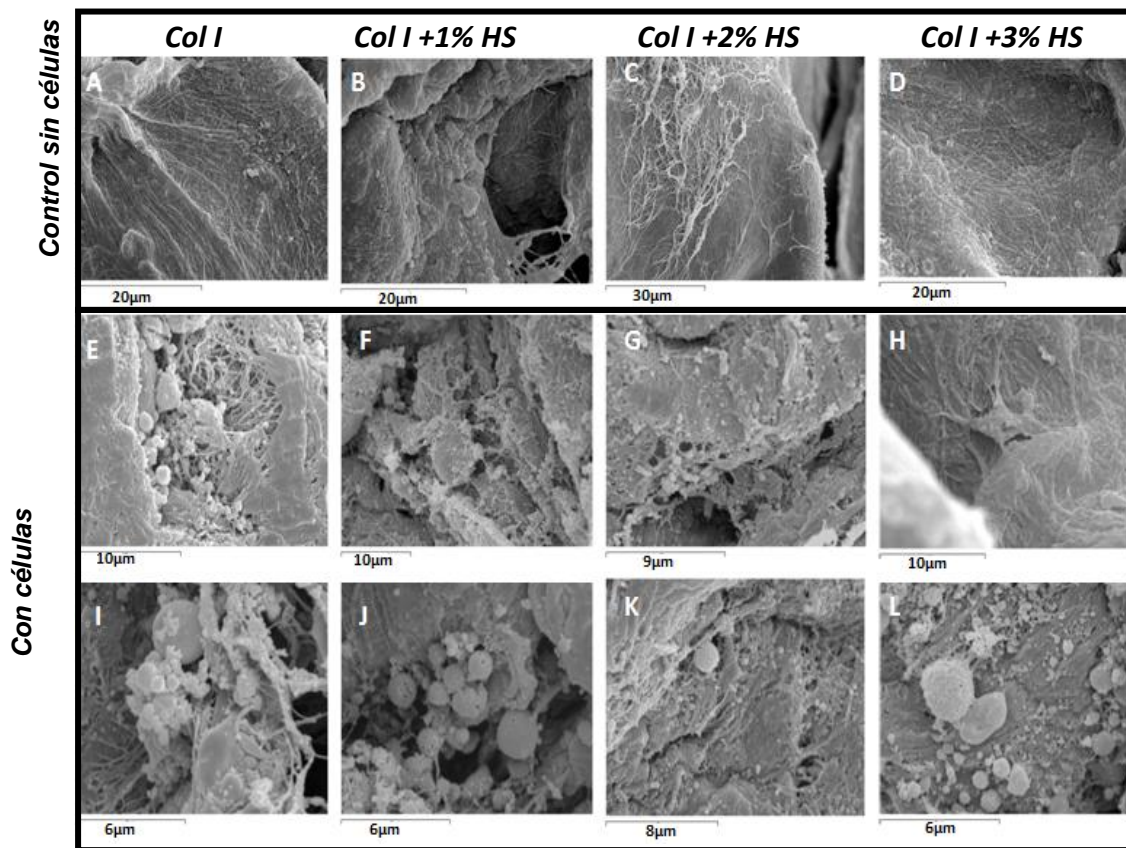


Figura 23. Imágenes obtenidas mediante MEB de los biomateriales tras 15 días de cultivo. Controles sin células en medio condrogénico (A-D). Biomateriales con células en medio condrogénico (E-L).

Con respecto a los biomateriales, tanto a 15 como a 30 días se observó una superficie bastante heterogénea, diferenciándose zonas muy fibrosas (figuras 23C y 23D), y otras más granulares. Además se pudo apreciar que la densidad del biomaterial también variaba según la región observada.

La mayoría de las células examinadas presentaban una morfología redondeada característica de condrocitos cuando se encuentran embebidos en la MEC que forma parte del cartílago hialino.

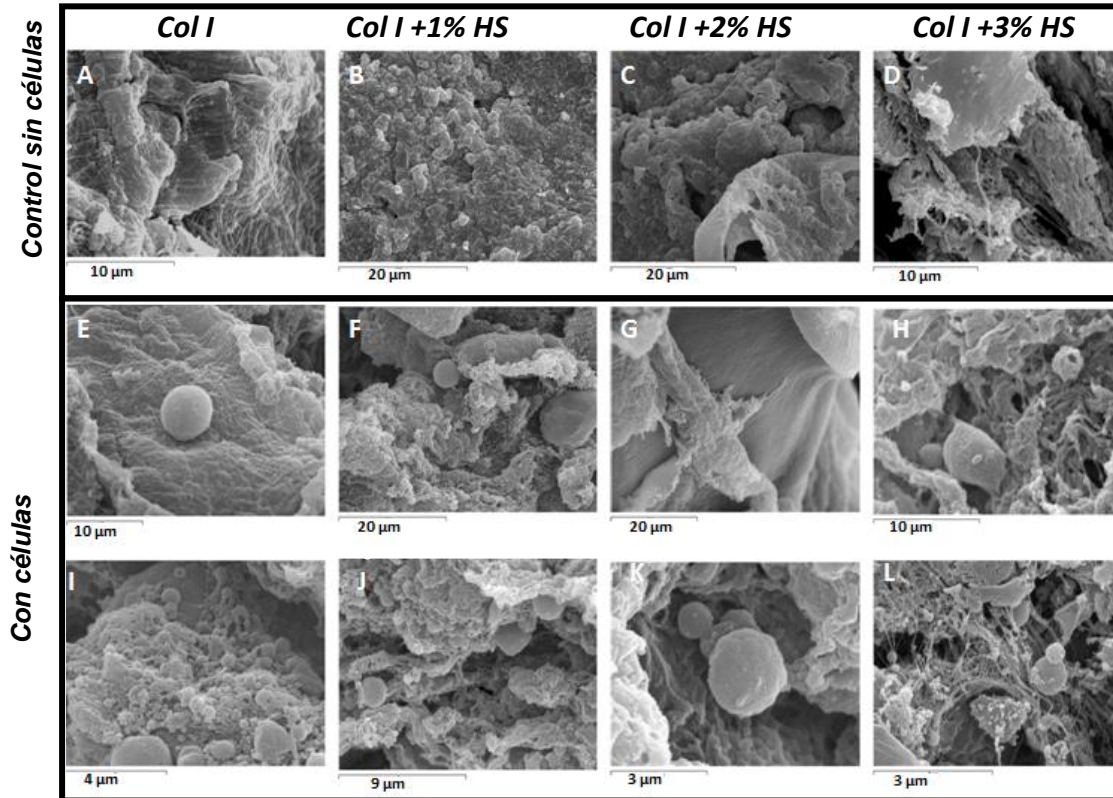


Figura 24. Imágenes obtenidas mediante MEB de los biomateriales tras 30 días de cultivo. Controles sin células (A-D). Biomateriales con células (E-L).

Algunos casos particulares mostraban una morfología más aplanada y poligonal (figura 24G). En ocasiones, se observaban prolongaciones que parecían adherir la célula a la superficie del biomaterial. En las proximidades de las células, se observaba una gruesa capa de lo que parece ser MEC secretada por las células, que no fue encontrada en los controles.

f. Análisis morfométrico mediante microscopía electrónica de transmisión

El análisis mediante MET se llevó a cabo únicamente en los biomateriales con células cultivadas en medio condrogénico (figura 25). Se observó presencia celular en todos ellos tanto a los 15 como a los 30 días.

Las células variaban de tamaño entre 10-20 μm y en su interior albergaban un gran núcleo con un nucléolo prominente.

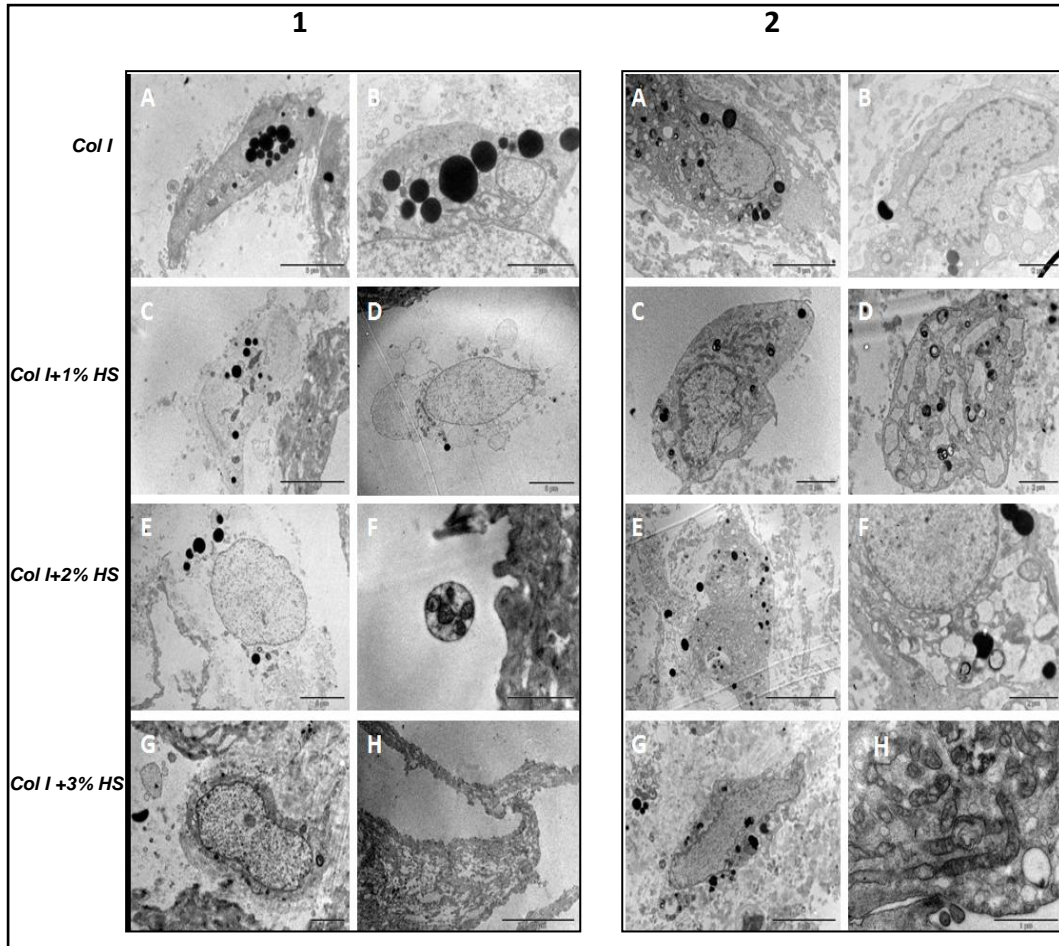


Figura 25. Imágenes obtenidas mediante MET de los biomateriales con células tras 15 (1) y 30 (2) días de cultivo.

Cabe destacar la abundante presencia de vesículas electrodensas, vacuolas, y otras vesículas claras, cuya abundancia aumentaba en las zonas más próximas a la superficie celular. En el citoplasma se observó una gran cantidad de cisternas dilatadas del Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) (figura 25.2D). En el exterior de las células, y próximo a su superficie, se apreció también una gran confluencia de vesículas electrodensas (figura 25.2E). Además aparecía un número elevado de mitocondrias (figura 25.1F y 25.2H).

6. DISCUSIÓN

La reparación de cartílago dañado mediante ingeniería tisular consiste en el empleo de un soporte tridimensional que sirva como estructura sobre la que se pueda desarrollar el nuevo tejido, y que a la vez se vaya degradando. Estos soportes deben mimetizar la MEC del tejido nativo que se pretende reparar.

El colágeno es una proteína que se encuentra en una elevada variedad de tejidos del cuerpo, entre ellos el cartílago hialino. Presenta multitud de ventajas para su empleo en ingeniería tisular. Una de ellas es que puede ser degradado por las colagenasas del cuerpo de forma rápida, de modo que es un soporte muy empleado con aplicaciones biomédicas, no solamente para regeneración de cartílago, sino también para regeneración de otros tejidos, como por ejemplo el de las válvulas del corazón (Tedder ME *et al.*, 2009).

Su degradación podría permitir la restauración funcional y estructural del tejido dañado. El grupo de investigación de Che y colaboradores (2006) han empleado los soportes de colágeno para estudiar comportamientos celulares, como la migración y proliferación, además de la diferenciación y expresión de fenotipos. Por otro lado, la capacidad de las células de crecer *in vitro* en un biomaterial con características similares a tejidos, ayuda a entender su comportamiento en ambientes complejos (Parenteau-Bareil R *et al.*, 2010). Los biomateriales de colágeno son de suma importancia en biomedicina, y cuentan con la gran ventaja de poder extraerse de numerosos tejidos, además de combinarse con otras moléculas, como los GAG. Las matrices de GAG modulan el rechazo de los tejidos neo-formados en ingeniería tisular. El potencial de estos soportes radica principalmente en sus propiedades que lo hacen compatible con las zonas de implantación. (Erickson I A *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios actuales se centran en la optimización de los biomateriales constituidos por colágeno, tratando de aumentar su fortaleza mecánica y biodegradabilidad (Parenteau-Bareil R *et al.*, 2010).

Muchos de esos estudios se realizan con condrocitos autólogos, resultando en la formación de un tejido que difiere histológicamente de la MEC (De Franceschi *et al.*, 2005). Además, el empleo de condrocitos autólogos es una técnica muy invasiva, ya que requiere que se extraigan de cartílago sano, siendo necesario avanzar en el conocimiento de otros tipos celulares como las CMMs-MOh.

En este estudio se evaluó la capacidad de diferenciación condrogénica de las CMMs-MOh, cultivadas sobre biomateriales de Col I y Col I + HS (en distintas concentraciones), además de la neo-formación de tejido cartilaginoso. En el medio de diferenciación condrogénico se empleó *TGFβ* y *PTHrP*. La *PTHrP* es una hormona secretada por los condrocitos (Bian L, 2008). Se ha demostrado que la *PTHrP* favorece la diferenciación condrogénica de CMMs-MOh y suprime su hipertrofia *in vitro*, manifestándose su potencial para emplearse en ingeniería tisular (Kim YJ *et al.*, 2008).

Las CMMs-MOh en cultivo mostraron la adherencia al plástico y la forma fibroblástica característica de este tipo celular. El análisis mediante citometría de flujo mostró positividad para CD73, CD90 y CD105, mientras que resultó negativo para marcadores de linaje hematopoyético, como CD34 y CD45. Estos resultados, junto con la capacidad de diferenciación hacia distintos linajes celulares (osteoblastos y condrocitos), demuestran que las células aisladas y empleadas en este estudio cumplen los criterios para ser consideradas CMMs-MOh, según la *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* (Dominici *et al.*, 2006). Sin embargo, la expresión de genes específicos de diferenciación adipogénica fue menor en las CMMs-MOh cultivadas en medio de estimulación que en los controles *DMEM*, tendencia observada previamente en otros tipos celulares como las células epiteliales de la membrana amniótica humana (CEMAh) (Díaz-Prado SM *et al.*, 2010). Con respecto a la diferenciación osteogénica, las CMMs-MOh mostraron la expresión de marcadores típicos de osteoblasto, indicando el potencial

osteogénico de estas células. El hecho de que unas CMMs tengan un mayor potencial de diferenciación hacia unos linajes celulares que hacia otros ya ha sido descrito previamente por varios autores. En este sentido, se ha demostrado que las CMMs aisladas de un mismo tejido pueden contener distintos subgrupos celulares con diferentes estados de diferenciación, y que las CMMs-MOH muestran un mayor potencial de diferenciación osteogénica que hacia otros tipos celulares (condrocitos y adipocitos) (Muraglia A *et al.*, 2000; Fuentes-Boquete IM *et al.*, 2008).

Tras 15 días de cultivo de las CMMs-MOH sobre los biomateriales, se observó presencia celular en todos ellos, siendo mayor en los biomateriales estimulados que en los controles. Lo mismo ocurría con respecto a la MEC. La presencia de CMMs-MOH y de MEC se centraban en regiones limitadas del biomaterial, hecho que cambió transcurridos 30 días, cuando se observó que las células se distribuían por todo el biomaterial de modo homogéneo, y se produjo un notable aumento de la MEC. Además se comprobó que las CMMs-MOH presentaban una elevada proliferación celular. En los controles en medio *DMEM* a los 30 días no se apreció apenas MEC, y el porcentaje celular descendió con respecto a los 15 días. Estos resultados indican que la estructura tridimensional de los soportes, junto con el empleo de *TGFβ* y *PTHrP*, no sólo favorecen la diferenciación condrogénica, sino también la formación de MEC (Janjanin S *et al.*, 2008; Lisignoli G *et al.*, 2005). La combinación de estos tres elementos crea un ambiente idóneo para la proliferación y mantenimiento de los condrocitos diferenciados. Resultados similares se obtuvieron en estudios con otros soportes naturales, como el ácido hialurónico (Facchini *et al.*, 2006).

Se observaron además diferencias entre los distintos biomateriales estimulados: el biomaterial Col I +3% HS presentaba el mayor porcentaje celular con respecto al área de biomaterial estudiado. Los restantes biomateriales presentaban un porcentaje algo menor y aproximado en todos ellos. De un modo similar, los resultados obtenidos tras los análisis

de detección de *PCNA* mostraron una mayor proliferación celular en los biomateriales Col I + 3% HS y Col I.

El estudio molecular de la MEC sintetizada en los biomateriales en presencia de medio condrogénico, mostró expresión de *Col II* en todos ellos, siendo superior en el biomaterial Col I + 3%HS, seguido del biomaterial Col I +1%HS. A esto habría que sumarle la detección inmunohistoquímica de Col II y de *Agg en la MEC*. Ambos genes se consideran marcadores característicos del cartílago articular hialino (Negri S *et al.*, 2007), indicando que se produjo la neo-formación de dicho tejido en nuestros soportes.

Sin embargo, tras 30 días de cultivo, y mediante la evaluación de los análisis histoquímicos, se detectaron calcificaciones en todos los biomateriales en medio condrogénico, que pueden ser debidas a que algunos condrocitos continúen el proceso de diferenciación, hipertrofiándose, e iniciando el proceso de osificación (Goldring MB *et al.*, 2006). Datos similares se obtuvieron induciendo la diferenciación condrogénica de CMMs sobre *scaffolds* de Policaprolactona (PCL), en donde se observó mineralización de la nueva MEC formada al día 45 de cultivo (Christoffer k *et al.*, 2010). Son varios los autores que han demostrado la influencia que el tiempo de cultivo y los factores de crecimiento e inducción pueden ejercer sobre la estructura, composición, biomecánica y expresión génica del esqueleto de tejido formado a partir de CMMs (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010). Por otra parte, también podría ser debido a variaciones en la tensión de oxígeno o pH del medio, ya que la formación de cartílago requiere condiciones completamente anaeróbicas (Christofer K *et al.*, 2010). De cualquier modo, estos resultados parecen indicar que podría ser necesario retirar los biomateriales del medio de cultivo condrogénico en un periodo de tiempo inferior a los 30 días, aunque sería necesario llevar a cabo más investigaciones para confirmarlo.

Con respecto a la liberación de colágeno al medio de cultivo por parte de las células, ésta se produjo a lo largo de los 30 días en los biomateriales estimulados, a excepción del intervalo 21-25 días. Sin embargo en los biomateriales en medio DMEM no se detectó colágeno en el medio de cultivo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que se produjo la diferenciación condrogénica de las CMMs-MOH estimuladas. La liberación fue menor en el biomaterial Col I que en los restantes con HS, indicando que podría ser el menos indicado para favorecer la diferenciación de las CMMs-MOH. En el intervalo de tiempo final de cultivo en medio condrogénico, se observó un aumento notable de la concentración de colágeno en los biomateriales Col I +2%HS y Col I +3%HS, pudiendo explicarse este hecho por la degradación del biomaterial, la cual debe ser mayor en los biomateriales con células estimuladas por la formación del nuevo cartílago. La elevada variabilidad observada de un intervalo de tiempo a otro podría deberse a que la degradación del biomaterial en los controles sin células no se produce de modo constante.

La diferenciación condrogénica sobre los biomateriales fue confirmada además mediante MET y MEB, al observar gran cantidad de vesículas electródensas, cuya presencia es característica en la formación de neocartílago (Danišovič L *et al.*, 2007; Tazzari P *et al.*, 2007).

7. CONCLUSIONES:

1. Los diferentes soportes de colágeno y HS testados en el presente estudio resultaron ser óptimos para el crecimiento de CMMs-MO_h no sólo a 15 sino también a 30 días.
2. Las CMMs-MO_h cultivadas en presencia de medio condrogénico sobre los soportes de Col I y diferentes concentraciones de HS, fueron capaces de diferenciarse hacia células con características similares a condrocitos y de sintetizar MEC en ambos tiempos de análisis.
3. Los biomateriales compuestos por Col I permitieron el mantenimiento del fenotípico celular y la neo-formación de un tejido cartilaginoso, obteniéndose los mejores resultados al combinar Col I con un 3% de HS.
4. Estos soportes pueden ser empleados para regenerar constructos condrogénicos *in vitro* de gran utilidad en la ingeniería tisular del cartílago.
5. Es necesario el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de modelos de reparación de defectos del cartílago articular con el fin de poder determinar el potencial de estos soportes para su posible aplicación clínica.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:1522-32.
2. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007; 7:11.
3. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatine scaffolds. *Biomaterials.* 2004; 25:3211-22.
4. Bian L, Zhai D, Mauck RL, Burdick JA. Coculture of Human Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes Reduces Hypertrophy and Enhances Functional Properties of Engineered Cartilage. *Tissue Eng.* 2011; 11:1137-45.
5. Blanco FJ. En: .Blanco FJ, director. *Manual S.E.R. de la Artrosis.* Madrid. IM&C, S.A. 2002; 33-43.
6. Brooks PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol.* 2002; 14:573-7.
7. Cao H, Xu SY. EDC/NHS-crosslinked type II collagen-chondroitin sulfate scaffold: characterization and in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 19:567-75.
8. Che ZM, Jung TH, Choi JH, Yoon do J, Jeong HJ, Lee, E.J et al. Collagen-based coculture for invasive study on cancer cells-fibroblasts interaction. *Biochem Biophys Re. Commun.* 2006; 346:268–275.
9. Christoffer k, Yang F, Park H. Chondrogenesis and mineralization during in vitro cultura of mesenchymal stem cells on three dimensional woven scaffolds. 2010; 16:3709-18.
10. Danišovič L, Lesný P, Havlas V, Teyssler P, Syrová Z, Kopáni M et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Appl Med.* 2007; 5:139-42.

11. De Franceschi L, Grigolo B, Roseti L, Facchini A, Fini M, Giavaresi G. Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. *J Biomed Mater Res*. 2005; 75A:612-22.
12. Díaz-Prado S, Muñíos-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010; 17:49-59.
13. Díaz-Prado S, Muñíos-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, et al. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem*. 2010; 111:846-57.
14. De Bari C, Dell'Acio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001; 44:1928-42.
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* . 2006; 8:315-7.
16. Dorotka R, Bindreiter U, Macfelda K, Windberger U, Nehrer S. Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. *Osteoarthr Cartilage*. 2005; 13:655-64.
17. Douchis JS, Goomer RS, Harwood FL, Khatod M, Coutts RD, Amiel D. Chondrogenic phenotype of perichondrium-derived chondroprogenitor cells is influenced by transforming growth factor-beta 1. *J Orthop Res*. 1997; 15:803-7.
18. Erickson IA, Huang AH, Chung C, Li RT, Burdick JA, y Mauck RL. Differential maturation and structure–function relationships in mesenchymal stem cell- and chondrocyte-seeded hydrogels. *Tissue Eng*. 2009; 15: 1041-1052.
19. Facchini A, Lisignoli G, Cristino S, Roseti L, Franceschi L, Marconi E. Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology*. 2006; 43:471-80.

- 20.** Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003; 11:790-800.
- 21.** Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br*. 1997; 79:831-6.
- 22.** Fuentes-Boquete IM, Arufe Gonda MC, Díaz Prado SM, Hermida Gómez T, de Toro santos FJ, Blanco FJ. Cell and tissue transplant strategies for joint lesions. *Open Transplant J*. 2008; 2:21-35
- 23.** Grigoloa B, Lisignolia G, Piacentinia A, Fiorinia M, Gobbib P, Mazzottib et al. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF®11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials*. 2002; 23:1187-1195.
- 24.** Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The Control of Chondrogenesis. *J Cell Biochem*. 2006; 97:33-44.
- 25.** Herlofsen SR, Kuchler AM, Melvik JE, Brinchmann JE. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in self-gelling alginate discs reveals novel chondrogenic signature gene clusters. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17:1003-13.
- 26.** Ishiguro N, Kojima T, Poole R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci*. 2002; 65:73-84.
- 27.** Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009; 17:561-77.
- 28.** Janjanin S, Wan-Ju L, Morgan M, Shanti RM, Tuan RS. Mold-shaped, nanofiber scaffold-based cartilage engineering using human mesenchymal stem cells and bioreactor. *J Surg Res*. 2008; 149: 47-56.

27. Jeon YH, Choi JH, Sung JK, Kim TK, Cho BC, Chung HY. Different effects of PLGA and chitosan scaffolds on human cartilage tissue engineering. *J Craniofac Surg.* 2007; 18:1249-58.
29. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro
30. chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998; 238:265-72.
31. Kastrinaki MC, Andreakou I, Charbord P, Papadaki HA. Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells using different membrane markers: comparison of colony/cloning efficiency, differentiation potential, and molecular profile. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008; 14:333-9.
32. Kim YJ, Kim HJ, Im GI. PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373:104-8.
33. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol.* 2006; 18:64-73.
34. Lisignoli G, Cristino S, Piacentini A, Toneguzzi S, Grassi F, Cavallo C et al. Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. *Biomater.* 2005; 26:5677-86.
35. Majumdar K, Thiede MA, Mosca J, Mooman M, Gerson S. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiology.* 1998; 176:57-66.
36. Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, Chao PH, Valhmu WB et al. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng.* 2000; 122:252-60.
37. Mouw JK, Case ND, Guldberg RE, Plaas AH, Levenston ME. Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. *Osteoarthr Cartilage.* 2005; 13:828-36.

- 38.** Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 2000; 113:1161-6.
- 39.** Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone.* 1990; 11:181-8.
- 40.** Negri S, Farinato S, Fila C, Pagliaro P, Bellomi A. Tissue engineering: chondrocyte cultures on type I collagen support. Cytohistological and immunohistochemical study. *J Orthopaed Traumatol.* 2007; 8:57-63.
- 41.** Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* 2002; 8:1009-16.
- 42.** Oka M, Chang YS, Nakamura T, Ushio K, Toguchida J, Gu HO. Synthetic osteochondral replacement of the femoral articular surface. *J Bone Joint Surg Br.* 1997; 79:1003-7.
- 43.** Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod BF. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials;* 2010; 3:1863-87.
- 44.** Pelttari K, Wixmerten A, Martin I. Do we really need cartilage tissue engineering?. *Swiss Med Wkly.* 2009; 139:602-9.
- 45.** Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:3254-66.
- 46.** Richler C, Yaffe D. The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol.* 1970; 23:1-22.
- 47.** Scotti C, Mangiavini L, Boschetti F, Vitari F, Domeneghini C, Frascini G et al. Effect of in vitro culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010; 18:1400-06.

48. Szerb I, Kárpáti Z, Hangody L. In Vivo Arthroscopic Cartilage Stiffness Measurement in the Knee. *Arthroscopy: Arthroscopy*. 2006; 22:682-83.
49. Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Duval N, Martel-Pelletier J. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009; 10:148.
50. Tazziri P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M, Conte R. Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastruc Pathol*. 2007; 31:23-31.
51. Tedder ME, Liao J, Weed B, Stabler C, Zhang H, Simionescu A et al. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. *Tissue Eng. A*. 2009; 15:1257–68.
52. Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003; 5:235-8.
53. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 1998; 80:1745-57.
54. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001; 264:51-62.
55. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA. Growth and integration of neocartilage with native cartilage in vitro. *J Orthop Res*. 2005; 23:433-9.
56. Zheng L, Fan HS, Sun J, Chen XN, Wang G, Zhang L et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based hydrogel: an in vivo study. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 93:783-92.
57. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7:211-28.

58. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13:4279-95.

Páginas web

1. Southern cross healthcare group [sede web]. New Zealand: the association. [actualización October de 2008; acceso 20 de Mayo de 2012]. Osteoarthritis (Symptoms, diagnosis, treatment). Disponible en: <http://www.southerncross.co.nz/aboutthegroup/healthresources/medicallibrary/tabid/178/vw/1/itemid/132/osteoarthritis-symptoms-diagnosis-treatment.aspx>
2. Tile M. Queen's Printer for Ontario. [sede web]. Ontario: The Workplace Safety and Insurance Appeals Tribunal. Noviembre de 2008 [actualización Enero de 2010; acceso 22 de Mayo de 2012]. Osteoarthritis. Disponible en: <http://www.wsiat.on.ca/english/mlo/osteoarthritis.htm>
3. National University Health System [sede web]. Singapore: the association. 2010 [acceso 15 de Mayo de 2012]. NUS Tissue Engineering Programme. Disponible en: <http://www.nuhs.edu.sg/research/programmatic-research/som-registered-programmes/nus-tissue-engineering-programme.html>

9. AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue subvencionado por: Servizo Galego de Saúde, Xunta de Galicia (PS07/84), Cátedra Bioibérica de la Universidade de A Coruña y el Instituto de Salud Carlos III CIBER BBN CB06-01-0040; Ministerio Ciencia e Innovacion PLE2009-0144; Fondo Investigación Sanitaria-PI 08/2028 con participación de fondos procedentes de FEDER (Comunidad Europea).

Me gustaría agradecer en primer lugar al INIBIC, y en especial a su director científico el Dr. Francisco Blanco, por proporcionarme todos los medios de los que dispone para poder llevar a cabo este trabajo.

Por supuesto a mi tutora, Silvia Díaz, por enseñarme a desenvolverme y guiarme cuando lo he necesitado, por tratar de corregirme y mejorar cada pequeño detalle, además de por su compromiso y apoyo a nivel laboral y personal.

Al coordinado del Máster, el Dr. Isaac Fuentes.

Al Servicio de Histomorfología por su ayuda con todas las tinciones: Purificación Filgueira y Noa Goyanes.

Al Servicio de Cultivos: Dra. Tamara Hermida, M^a José Sánchez y Dra. Emma Muíños, por todo el tiempo dedicado, por estar siempre ahí para apoyarme y resolver todas mis dudas y por haberme hecho pasar muy buenos momentos. Especialmente a Emma, por el gran esfuerzo que ha supuesto atenderme en ciertos momentos, y seguir haciéndolo con una sonrisa.

SAI: Dras. Ada Castro Couceiro y Catalina Sueiro López.

Universidad de Alcalá de Henares, Dpto. de Especialidades Médicas, Opocrin, S.P.A y la Fundación Jimémnez Díaz (Grupo Capiro)

11. ANEXOS

a. Consentimiento informado



INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

D. / Dña.:

INTRODUCCIÓN.-

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

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

OBJETIVO DEL PROYECTO.-

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

DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.-

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

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

RIESGOS.-

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

COMPENSACIÓN.-

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

CONFIDENCIALIDAD.-

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

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

Es importante que entienda que existe la posibilidad de que sus datos y parte de su muestra sean transferidos a otros equipos de investigación que trabajen en el mismo campo. En tal caso, se asegurará que estos datos sean tratados con la misma confidencialidad descrita anteriormente.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación. Con su aceptación a participar en el proyecto, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS.-

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

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

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

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

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

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA.-

Su participación en el proyecto de investigación es totalmente voluntaria.

Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar.

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

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

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

OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL.-

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

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



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Yo, _____(nombre del paciente),

He leído la información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el proyecto.

He recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado de ello con _____

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

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

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

FIRMA DEL PACIENTE

Nombre

Fecha

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

FIRMA

Nombre

Fecha



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ACOMPAÑANTE

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

Se le ha leído la información establecida en este escrito

Se le ha entregado copia de esta información.

Ha podido hacer preguntas sobre el proyecto.

Ha recibido suficiente información sobre el mismo.

Hemos hablado de ello con_____

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirar su consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

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

Presta libremente su conformidad para participar en el proyecto

Me autoriza a firmar en su nombre.

FIRMA DEL ACOMPAÑANTE DEL PACIENTE **Nombre**

Fecha

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

FIRMA

Nombre

Fecha