

**UNIVERSIDAD DE LEÓN**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Dpto. Medicina, Cirugía y Anatomía  
Veterinaria**



**Ingeniería del tejido  
cartilaginoso**

**OBTENCIÓN DE CARTÍLAGO *IN VITRO* PARA SU  
UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

**Bruno Jorge Antunes Colaço**

**León, Mayo de 2008**

**UNIVERSIDAD DE LEÓN**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Dpto. Medicina, Cirugía y Anatomía  
Veterinaria**



**TESIS DOCTORAL**

**OBTENCIÓN DE CARTÍLAGO *IN VITRO* PARA SU  
UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

**Memoria presentada por el licenciado Bruno Jorge  
Antunes Colaço para optar al grado de DOCTOR POR LA  
UNIVERSIDAD DE LEÓN**

Directores

**Dra. Vega Villar Suárez  
Dr. António Silvério Cabrita  
Dr. José Maria Villar Lacilla**

**León, Mayo de 2008**



Programa Operacional Ciência e Inovação 2010

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en parte gracias a la concesión de una beca por parte de la Fundação para a Ciencia e Tecnologia SFRH/BD/16444/2004.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Deseo expresar mi reconocimiento a todas las personas que de una manera u otra, han colaborado para la ejecución de esta Tesis Doctoral:**

A los Doctores José María Villar Lacilla, Vega Villar Suárez y António Silverio Cabrita por aceptar dirigir esta tesis.

Un agradecimiento especial al Doctor José María Villar Lacilla por el apoyo siempre manifestado desde el primer momento, por las condiciones proporcionadas para la realización del trabajo y por el ejemplo que siempre ha sido para mí.

A la Doctora Vega Villar Suárez, por su persistencia, orientación y amistad. Sin su apoyo esta tesis sería imposible de haberse ejecutado.

Al Doctor Jerome Guichaux por haberme recibido en su laboratorio (INSERM U971), y haberme facilitado todas las condiciones para la realización de un buen trabajo.

A Marieli por su persistencia, competencia y apoyo en el trabajo diario en el laboratorio. A Chema por su apoyo, disponibilidad y buen humor.

A Antonio y Silvia por toda la ayuda en el trabajo realizado en el servicio de microscopía.

A la Doctora Susana Suárez por los consejos y la disponibilidad para la revisión del trabajo.

A los Doctores Maximino Fernández Caso y José Gabriel Fernández por la amistad a lo largo de estos años, y por los preciosos consejos.

A Fer y Javi un especial agradecimiento por su apoyo, alegría y amistad en momentos difíciles. A la familia del Angel por la amistad y buena disposición.

A Irene por el cariño y amistad.

A David, Venancio y Tiago por la amistad y compañía.

A Candi, Maite, Yago, Pepe, Clara por la disponibilidad, amistad y compañía.

A Christoph, Claire, Emilie, Jerome Sohier, Thomas, Martial, Solmaz por su apoyo en mi estancia en Francia.

A Paquito, Sonia Fernández, Rafa, José Luís, Guilherme, Catalina, Judith, Marta, Cristina, Raúl, Alexandre, Inés, Ozquita, Xavi, Marisa y Diego por los buenos momentos pasados en León.

A mis padres y hermana.

## RESUMEN

Las patologías cartilaginosas tienen una elevada incidencia en la población mundial, causando graves problemas clínicos al tiempo que económicos (Jackson *et al.*, 2001; Cherubino *et al.*, 2003).

Dentro de las enfermedades imputables a la degeneración del cartílago se incluyen: enfermedades congénitas, enfermedades pediátricas de la placa de crecimiento, lesiones inducidas por traumatismos, osteoartritis y otras patologías degenerativas relacionadas con la edad, artritis reumatoide y neoplasias. De todas ellas, se estima que sólo la osteoartritis es la responsable del 50% de las patologías crónicas en una población envejecida (Sun *et al.*, 2007; Reginster *et al.*, 2002).

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinar emergente, que se destaca como una nueva área de la medicina y puede ser definida como el *arte de reconstruir los tejidos, ya sea estructural, o funcionalmente* (Hunzinker *et al.*, 2001). El cartílago una vez lesionado tiene poca capacidad de reparación espontánea debido a la naturaleza avascular de este tejido. En este contexto la ingeniería del tejido cartilaginoso, pretende ser una solución para este problema intentando alcanzar un sustituto funcional (Salgado *et al.*, 2006).

Este nuevo campo de la ciencia tiene como bases el uso combinado de células, biomateriales y factores bioactivos que permiten regenerar y reemplazar las funciones biológicas del cartílago dañado o degenerado (Dietrich *et al.*, 2004).

Dentro de las múltiples células que se pueden utilizar en ingeniería de tejido cartilaginoso, hemos seleccionado trabajar con condrocitos auriculares y células troncales de grasa abdominal, inguinal e infrapatelar.

Constatamos que los condrocitos auriculares de conejo, cuando se cultivan sobre superficies plásticas se desdiferencian. El fenómeno de desdiferenciación fue descrito por Holtzer, en 1960, y en 1977, von

der Mark, sugirió que este proceso tendría, posiblemente, origen en las interacciones establecidas entre la matriz extracelular (concretamente el colágeno) y los condrocitos. De esta forma, estudiamos la presencia de componentes de la matriz extracelular *in situ* e *in vitro* de sus receptores, las integrinas. El cartílago auricular de conejo presenta una colocalización entre los proteoglicanos, colágeno tipo II y las integrinas  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha \nu \beta 3$ ,  $\beta 3$ .

Los cultivos en agregación indujeron la rediferenciación de los condrocitos auriculares de conejo *in vitro*, con expresión de marcadores de diferenciación como el colágeno tipo II y el agregano. El grado de rediferenciación es mayor en el centro del agregado, que en la periferia, probablemente debido a la influencia de la hipoxia.

Constatamos también, que las células en cultivo expresan las integrinas  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha \nu \beta 3$ ,  $\beta 3$ , pero en menor grado que las células adultas, pudiendo desempeñar un papel en la desdiferenciación que tiene lugar en las superficies plásticas.

Las células troncales derivadas de tejido adiposo (CTDTA) abdominal e inguinal de rata demostraron ser una alternativa viable y bastante prometedora. Conseguimos obtener células en un número bastante aceptable y observamos que a lo largo de los pases éstas se tornan en una población más homogénea. Las células eran positivas al CD29 y CD73, aumentando la positividad a estos marcadores con los sucesivos pases, y no alterándose, esta significativamente, con la criopreservación. Estas células tienen capacidad de multipotencia, pudiendo diferenciarse en adipocitos, condrocitos y neuronas. Estas células demostraron también capacidad de adhesión al ácido poliglicólico, agar y colágeno tipo I.

Con el objetivo de profundizar el estudio de la capacidad de diferenciación condrogénica de las células troncales de tejido adiposo, utilizamos el caballo como animal de experimentación, a partir de grasa infrapatelar. Estudiamos la capacidad de diferenciación condrogénica de estas células en diferentes condiciones, intentando comprender el papel de la tensión de oxígeno. Observamos con nuestros experimentos



que las CTDTA de caballo tienen potencial para diferenciarse en condrocitos, produciendo componentes propios de la matriz extracelular adulta, concretamente colágeno y proteoglicanos. Las condiciones de hipoxia favorecen la expresión precoz de colágeno y proteoglicanos, desempeñando un papel más relevante en el colágeno. La adición de dexametasona conjuntamente con el TGF- $\beta$ 1, ITS y ascorbato puede llevar a la creación *in vitro*, de un modelo de condrocitos hipertróficos.

Los dos tipos celulares estudiados demostraron ser capaces de producir cartílago *in vitro*, con expresión de los respectivos marcadores de cartílago. Las CTDTA parecen ser una alternativa muy interesante por su elevada capacidad de replicación, lo que permitirá producir mayores cantidades de tejido *in vitro*.

## SUMMARY

The cartilage pathologies have a high incidence in the world population, creating serious clinical and economical problems (Jackson *et al.*, 2001; Cherubino *et al.*, 2003).

Among the diseases that can be originated by cartilage degeneration, are included: congenital diseases, growth plate pediatric diseases, trauma induced injuries, osteoarthritis and other aging related degenerative pathologies, arthritis rheumatoid and tumors. From all of them, it is estimated that the osteoarthritis itself is responsible for 50% of the chronic pathologies in an aged population (Sun *et al.*, 2007; Reginster *et al.*, 2002).

Tissue engineering is an emerging multidisciplinary science that highlights as a new medicine area and can be defined as the *art of reconstructing tissues structurally or functionally* (Hunzinker *et al.*, 2001). Once injured, the cartilage has little spontaneous reparation capacity, because of the avascular nature of this tissue. In this context the cartilage tissue engineering, pretends to be a solution for this problem trying to find a functional substitute (Salgado *et al.*, 2006).

This new field of science is based on the combined use of cells, biomaterials and bioactive factors that permit regenerate and substitute the biological functions of injured or degenerated cartilage (Dietrich *et al.*, 2004).

From the multiple cells that we could use in cartilage tissue engineering, we have selected to work with auricular chondrocytes and adipose stem cells from abdominal, inguinal and infrapatelar fat.

We observed that rabbit auricular chondrocytes dedifferentiated, when cultured on plastic surfaces. The dedifferentiation process was described by Holtzer in 1960, and in 1977 von der Mark has suggested that this process would be originated by the interactions established between the extracelullar matrix (namely the collagen) and the chondrocytes. Therefore, we studied the presence of the extracelullar

matrix components *in situ* and *in vitro* and their receptors, the integrins. The rabbit auricular cartilage presented a colocalization among the proteoglycans, collagen type II and the integrins  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha \nu \beta 3$ ,  $\beta 3$ .

The cultures in aggregation induced rabbit auricular chondrocytes redifferentiation *in vitro*, with expression of differentiation markers like collagen type II and aggrecan. The redifferentiation degree is higher in the pellet center than in the surroundings, probably due to hypoxia influence.

We also observed that cells in culture expressed the integrins  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha \nu \beta 3$ ,  $\beta 3$ , but in a lower degree than the adult cells, and they can play a key role in the dedifferentiation that takes place in plastic surfaces.

The adipose derived stem cells (ADSC) obtained from rat abdominal and inguinal fat demonstrated to be a viable alternative and promising source. We were able to obtain cells in very acceptable number and we observed that through out the passages they become a more homogeneous population. The cells were positive to CD29 and CD73. We showed that the positive cells increased with the successive passages, and without alterations with the cryopreservation. These cells have multipotency capacity, and they can differentiate in adipocytes, chondrocytes and neurons. These cells demonstrated also the adhesion capacity to the poliglycolic acid, agar and type I collagen.

With the purpose of better understanding the ADSC differentiation capacity, we used horse infrapatelar fat. We tested the chondrogenic differentiation capacity of these cells in different conditions, trying to understand the oxygen tension role. We observed in our experiments that horse ADSC have the potential to chondrogenic differentiation, producing components of the adult extracelullar matrix, namely collagen and proteoglycans. The hypoxic conditions favored the early expression of collagen and proteoglycans, playing an important role in the collagen. Adding dexamethasone with TGF- $\beta 1$ , ITS and ascorbic acid permits *in vitro*, the creation of a hypertrophic chondrocytes useful model.

The two cellular types studied showed to be able to produce *in vitro* cartilage, with the expression of the respective cartilage markers. The ADSC seemed to be a very interesting alternative because of their high replication capacity, which will permit higher tissue production *in vitro*.

## **PUBLICACIONES**

Este trabajo ha dado origen a los siguientes proyectos, publicaciones y comunicaciones:

### **Proyectos financiados:**

*Cultivo y caracterización de células troncales de tejido adiposo de rata para su aplicación en reparación de defectos articulares* (2007). Investigador Principal: Vega Villar Suárez. Investigador: Bruno Jorge Antunes Colaço (Departamento de Zootecnia). Financiación: 60000 Euros.

*Capacidad regenerativa del Condroitín Sulfato asociado a células troncales procedentes de tejido adiposo en lesiones articulares* (2008). Investigador Principal: Jaime Sánchez Lázaro. Investigador: Bruno Jorge Antunes Colaço (Departamento de Zootecnia). Financiación: 12500 Euros.

### **Publicaciones del SCI:**

#### *Artículos*

**Villar-Suárez, V.; Colaço, B.; Calles-Venal, I.; Bravo, I. G.; Fernández-Álvarez, J. G.; Fernández-Caso, M.; Villar-Lacilla, J. M.** (2005) Effects of extracellular matrix on the morphology and behaviour of rabbit auricular chondrocytes in culture. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.4:364-373.

#### *Abstracts*

**Villar-Suarez, V.; Colaço, B.; Vasquez, F.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernández-Caso, M.; Villar-Lacilla, J.M.** (2005) Influence of extracellular matrix in differentiation and apoptosis. *Histology and Histopathology*. Supplement 1: S-107/S108.

**Villar, V.; Colaço, B.; Calles-Venal, I.; Alvarez, J. G.; Fernandez-Caso, M.F.; Villar, J.M.** (2005). Culture of Differentiated Adult Rabbit Auricular Chondrocytes. *Anatomia, Histologia e Embryologia*. 34(1):54.

*Presentación oral:*

**Villar, V.; Cañamero, M.; Calles-Venal, I.; Colaço, B.; Fernández-Caso, M.; Quiroz, E.** (2003) Cultivo de condrocitos de conejo y su aplicación en ingeniería de tejidos. *XII Congreso de la Sociedade Española de Histología e Ingeniería Tisular*.

*Presentaciones en poster:*

**Villar, V.; Colaço, B.; Calles-Venal, I.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernández-Caso, M.; Villar, J.M.** (2004) Culture of differentiated adult rabbit auricular chondrocytes. Presentado en el XXVth Congress of the European Association of Veterinary Anatomists.

**Colaço, B.; Calles-Venal, I.; Villar, V.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernández-Caso, M.; Villar, J.M.** (2004) Comparative study between the expression of the integrins in dedifferentiated auricular chondrocytes and EBTR fibroblasts. Presentado en el *Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society*.

**Calles-Venal, I.; Villar, V.; Colaço, B.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernández-Caso, M.; Villar, J.M.** (2004) Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rabbit auricular cartilage explants. Presentado en el *Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society*.

**Colaço, B.; Villar, V.; Fernández-Álvarez, J. G.; Fernandez-Caso, M.; Colaço, A.; Villar, J.M.** (2005) Integrins as possible auricular chondrocyte differentiation markers. Presentado en el *4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society*.

**Villar-Suárez, V.; Colaço, B.; Vasquez, F.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernández-Caso, Villar-Lacilla, J. M.** (2005) Influence of extracellular matriz in differentiation and apoptosis. Presentado en el *XIII Congreso Nacional y I Internacional de la sociedad Española de histología e Ingeniería Tisular*.

**Colaço, B.; López, M. E.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernández-Caso, M.; Villar, J.M.; Cabrita, A.M.; Villar, V.** (2006) Isolation and characterization of abdominal rat adipose multipotent cells, presentado en el ESF/EMBO Research Conference on Stem Cells in Tissue Engineering.

**Colaço, B.; Gonzalez Fernandez, M.L.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernández-Caso, M.; Villar, J.M.; Cabrita, A.M.; Villar, V.**(2007) Temporal changes in the expression of cd73 and cd29 in rat adipose multipotent cells, presentado en las *II Jornadas de Medicina Dentaria de Viseu*.

**Colaço, B., Gonzalez Fernandez, M.L.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernández-Caso, M.; Villar, J.M.; Cabrita, A.M.; Villar, V.**(2007) Seeding of rat adipose multipotent cells in polyglycolic acid resorbable suture, presentado nas *II Jornadas de Medicina Dentaria*.

# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	1
<b>1.1.- BIOLOGÍA DEL CARTÍLAGO</b> .....	3
<b>1.1.1.- Histogénesis del cartílago</b> .....	3
<b>1.1.2.- Estructura del cartílago adulto</b> .....	5
1.1.2.1.- Células .....	5
1.1.2.2.- Matriz extracelular .....	8
1.1.2.2.1.- Componentes fibrilares .....	10
1.1.2.2.2.- Proteoglicanos .....	16
1.1.2.2.3.- Otras proteínas y glicoproteínas no relacionadas con el colágeno.....	21
1.1.2.2.4.-Receptores de membrana .....	25
1.1.2.2.5.- Fluido tisular.....	29
<b>1.1.3.- Tipos de cartílago</b> .....	30
<b>1.2.- INGENIERÍA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO</b> .....	33
<b>1.2.1.- Células utilizadas en ingeniería del tejido cartilaginoso</b> .....	40
1.2.1.1.- Condrocitos y condroblastos .....	40
1.2.1.2.- Células troncales.....	41
1.2.1.2.1.- Células troncales embrionarias .....	42
1.2.1.2.2.- Células troncales adultas .....	45
1.2.1.2.2.1.- Células multipotentes a partir del tejido adiposo .....	48
<b>1.2.2.- Sustancias bioactivas en la diferenciación condrocítica</b> .....	56
<b>1.2.3.- Matrices utilizadas en ingeniería del tejido cartilaginoso</b> .....	69
1.2.3.1.- Tipo de biomaterial .....	70
1.2.3.1.1.- Polímeros naturales.....	70
1.2.3.1.2.- Polímeros sintéticos.....	77
1.2.3.2.- Configuración de un biomaterial .....	79
1.2.3.2.1.- Matrices tridimensionales porosas .....	80
1.2.3.2.2.- Hidrogeles .....	81
1.2.3.2.3.- Micro o nanoparticulas .....	82
1.2.3.2.4.- Compuestos que permiten la liberación controlada de factores de crecimiento.....	82
<b>2.-OBJETIVOS</b> .....	84
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	88
<b>A.- CONDROCITOS</b> .....	90
<b>A.1.- Materiales</b> .....	90

<b>A.2.- Cultivo de condrocitos</b> .....	90
A.2.1.- Cultivo en monocapa .....	91
A.2.2.- Cultivo en agregación .....	92
<b>A.3.- Técnicas microscópicas</b> .....	92
A.3.1. - Técnicas de microscopía óptica .....	92
A.3.1.1.- Técnicas generales de procesado de las muestras para microscopía óptica	92
A.3.1.1.1.-Fijación .....	93
A.3.1.1.2.- Inclusión en parafina .....	94
A.3.1.1.3.- Histoquímica. ....	95
A.3.1.1.4.- Inmunohistoquímica.....	96
A.3.1.1.5.- Inmunofluorescencia directa .....	98
A.3.1.1.6.- Inmunofluorescencia indirecta .....	99
A.3.2.- Técnicas de microscopía electrónica.....	101
<b>A.4.- Técnicas de biología molecular</b> .....	103
A.4.1.- Extracción de ARN a partir del tejido.....	103
A.4.2.- Extracción de ARN total a partir de células cultivadas utilizando el RNAspin Mini Kit (GE Healthcare®).....	105
A.4.3.- Cuantificación de la cantidad y pureza del ARN .....	108
A.4.4.- PCR .....	115
A.4.5.- Electroforesis en gel de agarosa.....	117
<b>B.- CÉLULAS TRONCALES DE <i>Ratus norvegicus</i></b> .....	119
<b>B.1.- Materiales</b> .....	119
<b>B.2.- Técnicas de cultivo</b> .....	119
B.2.1.- Cultivos en monocapa .....	120
B.2.2.- Cultivo en agregación .....	121
B.2.3.- Cultivo en micromasa .....	121
B.2.4.- Cultivo en biomateriales.....	122
B.2.4.1.- Cultivo en poly-d-glicólico .....	122
B.2.4.2.- Cultivo en agar.....	123
B.2.4.3.- Colágeno .....	123
B.2.5.- Congelación celular .....	123
<b>B.3.- Técnicas de diferenciación celular</b> .....	124
B.3.1.- Inducción de la condrogénesis .....	124
B.3.2.- Inducción de la neurogénesis.....	124
<b>B.4.- Técnicas de microscopía</b> .....	125
B.4.1.- Técnicas de microscopía óptica .....	125
B.4.1.1.1.-Fijación .....	125
B.4.1.1.2.- Inclusión en parafina .....	125
B.4.1.1.3.- Histoquímica.....	125
B.4.1.1.4.- Inmunofluorescencia directa.....	127

B.4.1.1.5.- Inmunofluorescencia indirecta .....	127
<b>B.5.- Técnicas de microscopía electrónica.....</b>	<b>127</b>
B.5.1.- Protocolo de microscopía electrónica de transmisión .....	128
B.5.2.- Protocolo de microscopía electrónica de barrido.....	128
<b>B.6.-Citometría de flujo .....</b>	<b>129</b>
B.6.1.-Preparación de muestras para su análisis .....	129
B.6.2.- Adquisición y análisis .....	130
<b>C.- CÉLULAS TRONCALES DE <i>Eqqus caballus</i>.....</b>	<b>133</b>
<b>C.1.- Animales.....</b>	<b>133</b>
<b>C.2.- Aislamiento de las células .....</b>	<b>133</b>
<b>C.3.- Cultivo de células .....</b>	<b>135</b>
C.3.1.- Protocolo de cultivo de células en frascos de 75 cm <sup>2</sup> .....	135
C.3.2.- Protocolo de siembra en <i>cell stack</i> .....	135
<b>C.4.- Congelación de las células.....</b>	<b>136</b>
<b>C.5.- Protocolo de descongelación de células.....</b>	<b>137</b>
<b>C.6.- Diferenciación condrogénica de células troncales de tejido adiposo (grasa infrapatelar) de caballo .....</b>	<b>138</b>
C.6.1.- Medio condrogénico normal.....	138
C.6.2.- Medio condrogénico con Dexametasona.....	141
<b>C.7.- Técnicas histológicas.....</b>	<b>145</b>
C.7.1.-Hematoxilina-eosina.....	145
C.7.2.-Azul de Alcian .....	145
C.7.3.-Tricrómica de Masson.....	145
<b>4.- RESULTADOS.....</b>	<b>146</b>
<b>4.1.- INFLUENCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS CONDROCITOS AURICULARES DEL CONEJO .....</b>	<b>148</b>
<b>4.1.1.- Estudio de las características de la matriz extracelular <i>in situ</i> .....</b>	<b>148</b>
<b>4.1.2.- Cultivo, obtención y caracterización de células cartilaginosas .....</b>	<b>155</b>
4.1.2.1.- Cultivos de condrocitos .....	155
4.1.2.2.- Distribución de las proteínas de la matriz e integrinas .....	157
4.1.2.3.- Expresión de las integrinas en células en monocapa .....	160
<b>4.2.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES OBTENIDAS A PARTIR DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATA.....</b>	<b>162</b>
<b>4.2.1.- Obtención y cultivo de células multipotentes .....</b>	<b>162</b>
4.2.1.1.- Cultivo de células multipotentes sobre superficies plásticas.....	162
4.2.1.2.- Cultivos en agregación .....	167
<b>4.2.2.- Evaluación y caracterización de las células obtenidas .....</b>	<b>169</b>
4.2.2.1.- Proliferación y viabilidad.....	169

4.2.2.2.- Caracterización de las células a través de marcadores de superficie celular	170
4.2.2.2.1.- Inmunofluorescencia directa	170
4.2.2.2.2.- Inmunofluorescencia indirecta	171
4.2.2.2.3.- Citometría de flujo	172
<b>4.2.3.- Pruebas de multipotencia de las células obtenidas a partir de la grasa</b>	<b>177</b>
4.2.3.1.- Diferenciación en fenotipo neurogénico con $\beta$ -mercaptoetanol	177
4.2.3.2.- Diferenciación en adipocitos	179
4.2.3.3.- Inducción de la condrogénesis	181
<b>4.2.4.- Métodos de preservación</b>	<b>182</b>
4.2.4.1.- Preservación del tejido antes de la disociación	182
4.2.4.2.- Criopreservación de las células	182
4.2.4.2.1.- Técnicas de criopreservación después de la amplificación	182
4.2.4.2.2.- Impacto de la criopreservación en los marcadores de superficie de las células troncales	182
<b>4.2.5.- Inclusión de las células en biomateriales</b>	<b>185</b>
4.2.5.1.- Inclusión de células troncales de tejido adiposo en biomateriales	185
4.2.5.1.1.- Biomateriales naturales	185
4.2.5.1.2.- Biomateriales sintéticos	187
<b>4.3.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE CÉLULAS TRONCALES DE TEJIDO ADIPOSO (GRASA INFRAPATELAR) DE CABALLO</b>	<b>188</b>
<b>4.3.1.- Obtención y cultivo de células multipotentes</b>	<b>188</b>
<b>4.3.2.- Diferenciación condrogénica de ctdta de caballo</b>	<b>188</b>
<b>4.3.3.- Diferenciación condrogénica hipertrófica de CTDTA de caballo</b>	<b>199</b>
4.3.3.1.- Cultivos en dos dimensiones	199
4.3.3.2.- Cultivos en tres dimensiones	200
<b>5.-DISCUSIÓN</b>	<b>215</b>
<b>5.1.- INFLUENCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS CONDRÓCITOS AURICULARES DEL CONEJO</b>	<b>218</b>
<b>5.1.1.- Estudio de las características de la matriz extracelular <i>in situ</i></b>	<b>219</b>
5.1.1.1.- Caracterización morfológica	220
5.1.1.2.- Caracterización de la distribución de los componentes de la matriz extracelular e integrinas	221
<b>5.1.2.- Cultivo y caracterización de las células cartilaginosas</b>	<b>225</b>
5.1.2.1.- Caracterización de las células cartilaginosas en cultivo	225
5.1.2.2.- Rediferenciación por agregación	228
<b>5.2.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES A PARTIR DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATA</b>	<b>231</b>
<b>5.2.1.- Obtención y cultivo de células multipotentes</b>	<b>231</b>

<b>5.2.2.- Evaluación y caracterización de las células obtenidas</b> .....	237
5.2.2.1.- Número, proliferación y viabilidad celular.....	237
5.2.2.2.- Caracterización de las células a través de marcadores de superficie celular	238
5.2.2.3.- Citometría de flujo .....	239
<b>5.2.3.- Multipotencia de las CTDTA</b> .....	240
5.2.3.1.- Neurogénesis .....	240
5.2.3.2.- Adipogénesis.....	241
5.2.3.3.- Condrogénesis .....	242
<b>5.2.4.- Preservación</b> .....	244
5.2.4.1.- Preservación del tejido antes de la disociación .....	245
5.2.4.2.- De las células.....	245
5.2.4.2.1.- Técnicas de criopreservación después de la amplificación.....	245
5.2.4.2.2.- Impacto de la criopreservación en los marcadores de superficie de células troncales .....	246
<b>5.2.5.- Biomateriales</b> .....	246
<b>5.2.6.- Perspectivas de esta tecnología</b> .....	248
<b>5.3.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA DE CÉLULAS TRONCALES DE TEJIDO ADIPOSO (GRASA INFRAPATELAR) DE CABALLO</b> .....	251
<b>5.3.1.- Obtención y cultivo de células multipotentes</b> .....	252
<b>5.3.2.- Diferenciación condrogénica de CTDTA de caballo</b> .....	252
<b>5.3.3.- Diferenciación condrogénica hipertrófica de CTDTA de caballo</b> .....	258
<b>6.- CONCLUSIONES</b> .....	262
<b>7.- BIBLIOGRAFIA</b> .....	268

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-</b> Macromoléculas en el cartílago articular.	10
<b>Tabla 2-</b> Tipos de colágeno más abundantes en los tejidos.	14
<b>Tabla 3-</b> Integrinas de condrocitos y sus ligandos.	27
<b>Tabla 4-</b> Resumen de estudios de ingeniería del cartílago .	36
<b>Tabla 5-</b> Resumen de la clasificación de las células troncales.	42
<b>Tabla 6-</b> Factores usados experimentalmente para inducir la diferenciación de las células troncales del tejido adiposo.	49
<b>Tabla 7-</b> Métodos de recogida utilizados en la obtención de las células troncales del tejido adiposo.	51
<b>Tabla 8-</b> Marcadores comunes de las células troncales.	54
<b>Tabla 9-</b> Diferentes protocolos utilizados para la diferenciación condrogénica.	57
<b>Tabla 10-</b> Resumen de los efectos principales de las sustancias bioactivas en la condrogénesis.	58
<b>Tabla 11-</b> Tipos de matrices utilizadas en ingeniería de tejidos de cartílago.	71
<b>Tabla 12-</b> Inclusión en parafina en el caso de los fragmentos de cartílago.	94
<b>Tabla 13-</b> La inclusión del agregado en parafina.	95
<b>Tabla 14-</b> Primers utilizados.	116
<b>Tabla 15-</b> Datos cuantitativos obtenidos por electroforesis automática.	154
<b>Tabla 16-</b> Datos cuantitativos obtenidos por electroforesis automática.	158
<b>Tabla 17-</b> Expresión de marcadores de células troncales a lo largo de los pases.	176

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Imagen microscópica del cartílago auricular de conejo.	6
<b>Figura 2-</b> Imagen representativa de la constitución de un proteoglicano, concretamente del agrecano.	20
<b>Figura 3-</b> Esquema de ingeniería de tejidos.	34
<b>Figura 4-</b> Esquema general de funcionamiento del citómetro de flujo.	131
<b>Figura 5-</b> Representación esquemática del experimento en tres dimensiones.	139
<b>Figura 6-</b> Representación esquemática del experimento de diferenciación condrogénica en dos dimensiones.	142
<b>Figura 7-</b> Representación esquemática del experimento en tres dimensiones.	144
<b>Figura 8-</b> Microfotografías del cartílago auricular de conejo obtenidas por microscopía electrónica de transmisión.	150
<b>Figura 9-</b> Estructura del cartílago adulto.	151
<b>Figura 10-</b> Expresión de integrinas en el cartílago auricular adulto.	152
<b>Figura 11-</b> Electroforesis automática de muestra obtenida a partir de cartílago auricular de conejo.	153
<b>Figura 12-</b> RT-PCR semi-cuantitativa de ARN obtenido de oreja de conejo.	154
<b>Figura 13-</b> Cultivos de condrocitos auriculares de conejo en diferentes momentos.	156
<b>Figura 14-</b> Imágenes de los estudios de la composición de la matriz extracelular en los agregados.	157
<b>Figura 15-</b> Electroforesis automática de una muestra obtenida a partir de células cultivadas en monocapa y agregados de cartílago auricular de conejo.	158
<b>Figura 16-</b> RT-PCR de P3.	159
<b>Figura 17-</b> RT-PCR de P3 agregados.	160
<b>Figura 18-</b> Imágenes de los estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para las integrinas.	161
<b>Figura 19-</b> Cultivo de las células adherentes del tejido adiposo.	163
<b>Figura 20-</b> Células P4 y P7 con aumento de prolongaciones.	165
<b>Figura 21-</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido.	166
<b>Figura 22-</b> Varias imágenes de agregados formados a partir de CTDTA.	168
<b>Figura 23-</b> Expresión de CD29 por inmunofluorescencia directa.	170
<b>Figura 24-</b> Inmunofluorescencia indirecta para el marcador CD73.	171
<b>Figura 25-</b> Dot Blot de CTDTA en diferentes pases.	172
<b>Figura 26-</b> Gráfico que representa los aumentos de tamaño con los pases.	173
<b>Figura 27-</b> Gráfico que representa la complejidad con los pases.	174

<b>Figura 28-</b> Expresión de distintos marcadores por citometría de flujo en células P1.	175
<b>Figura 29-</b> Pre-inducción neurogénica con mercaptoetanol.	177
<b>Figura 30-</b> Inducción neurogénica con mercaptoetanol.	178
<b>Figura 31 -</b> Representación de la diferenciación en adipocitos.	179
<b>Figura 32-</b> Tentativa de inducción adipogénica sin contacto celular.	180
<b>Figura 33-</b> Estudio de la diferenciación condrogénica.	181
<b>Figura 34-</b> Expresión del CD29 en células frescas y congeladas.	183
<b>Figura 35-</b> Expresión del CD73 en células frescas y congeladas.	184
<b>Figura 36-</b> Células troncales del tejido adiposo incluídas en gel de agarosa.	186
<b>Figura 37-</b> Nódulos formados por células tratados con colágeno tipo I.	186
<b>Figura 38-</b> Cultivo de CTDTA en hilo de ácido poliglicólico.	187
<b>Figura 39-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E(x50).	190
<b>Figura 40 -</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (x100).	191
<b>Figura 41-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (x400).	192
<b>Figura 42 -</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración AB (x50).	193
<b>Figura 43-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración AB (x100).	194
<b>Figura 44 -</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración AB (x 400).	195
<b>Figura 45-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo Tricrómica de Masson(x50).	196
<b>Figura 46-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo Tricrómica de Masson (x100).	197
<b>Figura 47 -</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo Tricrómica de Masson (x400).	198
<b>Figura 48-</b> Diferenciación condrogénica en dos dimensiones.	199
<b>Figura 49-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (X50).	202
<b>Figura 50-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (X100).	203
<b>Figura 51-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E(X200).	204
<b>Figura 52-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (X400).	205



<b>Figura 53-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración AB(x50)	206
<b>Figura 54-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración AB(x 100).	207
<b>Figura 55-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración AB (x200).	208
<b>Figura 56-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración AB (x 400).	209
<b>Figura 57-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración TM (x50).	210
<b>Figura 58-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración TM (x100).	211
<b>Figura 59-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración TM (x200).	212
<b>Figura 60-</b> Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración TM (x400).	213
<b>Figura 61-</b> Coloraciones histológicas de los agregados CTDTA de caballo azul de Alcian (x4).	214

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** - 1,25-dihydroxy-cholecalciferol.
- ADN**- Ácido desoxiribonucleico.
- AH**- Ácido hialurónico.
- AP1**- Activador de proteína 1.
- ARN**- Ácido ribonucleico.
- ARNm**- Ácido ribonucleico mensajero.
- ATP**- Adenosín trifosfato.
- bFGF**- Basic fibroblast growth factor (factor básico de crecimiento fibroblástico).
- BMP**- Bone morphogenetic protein (proteína morfogenética ósea).
- BSA**- Bovine serum albumin (albumina sérica bovina).
- CCN**- Cyr61,ctgf, nov.
- CFU-F**- Unidades formadoras de colonias fibroblásticas.
- COL**- Gen del colágeno I-XVIII.
- COMP**- Cartilage oligomeric matrix protein (proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa).
- CTM**- Células troncales mesenquimatosas.
- CTMO**- Células troncales de la medula ósea.
- CTDTA**- Células troncales derivadas del tejido adiposo.
- C4S**- Sulfato de condroitina 4.
- C6S**- Sulfato de condroitina 6.
- DEPC**- Dietilpirocarbonato.
- DMEM**- Dulbecco modified eagle medium.
- DMSO**- Dimetilsulfóxido.
- EDTA**- Ácido etilendiaminotetraacético.
- EGF**- Factor de crecimiento epidérmico.
- FACIT**- *Fibril-associated collagens with interrupted triple helices*.
- FEV**- Fracción estromal vascular.
- FGF**- Fibroblast growth factor (factor de crecimiento de los fibroblastos).
- FN**- Fibronectina.
- GAGs**-Glicosaminoglicanos.
- GAPDH**- Gliceroaldehido 3-fosfato deshidrogenasa.
- GC**- Glucocorticoides.
- GR**- Receptor de glucocorticoides.
- GDF**- Factor de crecimiento y diferenciación (tipo 5).
- GLUT**- Facilitative glucose transporter (facilitador del transporte de glucosa).
- GPI**- Glicosilfosfatidilinositol.

**HBSS**- Hank's buffered salt solution.

**HCT**- Hipoxicontrol.

**HCH**- Hipoxicondrogénico.

**HGF**- Hepatocyte growth factor (factor de crecimiento del hepatocito).

**HLA**- Human leukocyte antigen (antígenos leucocitarios humanos).

**H/E**- Hematoxilina/eosina.

**HIF**- Hipoxia inducible factors (factores inductores de hipoxia).

**HS-PGs**- Proteoglicanos con la base de heparán sulfato.

**HMG**- High mobility group (ligación de alta movilidad).

**IBMX**- 3-isobutil-1-metilxantina.

**IGF**- Insulin growth factor (factor de crecimiento tipo insulina).

**IGFBP**- Proteína de conexión al factor de crecimiento tipo insulina (tipo 1, 2 y 3).

**IGFR**- Insulin growth factor receptor (receptor para el factor de crecimiento tipo insulina).

**IL**-Interleucina.

**ITS**- Insulina transferrina y selenio.

**IR**- Insulin receptor (receptor para la insulina).

**kDa**- Kilodalton.

**KS**- Queretan sulfato.

**MAC**- Moléculas de adhesión celular.

**MCI**- Masa celular interna.

**MEC**-Matriz extracelular.

**MHC**- Major histocompatibility complex (complejo principal de histocompatibilidad).

**MIDAS**- *Metal ion dependent adhesión*.

**N-CAD**- Caderinas.

**NCH**- Normoxicondrogénico.

**NCT** -Normoxicontrol.

**Neu N**- Proteína nuclear específica neuronal.

**NSE**- Neuron specific enolase (enolasa específica neuronal).

**NGFr**- Neural growth factor receptor (Receptor del factor de crecimiento neuronal).

**OSM**- Oncostatina M.

**PBS**- Phosphate buffered saline.

**PCL**- Policaprolactona.

**PCR**- Reacción en cadena de la polimerasa.

**P/E**- Penicilina/estreptomicina.

**PET**- Teraftato de polietileno.

**PEGT**- Teraftato de glicosaminoglicanpolietileno.

**PG**- Proteoglicano.

**PGA**- Ácido poliglicólico.

**PLA**- Ácido poliláctico.

**PLLA**- Ácido poli-L-láctico.

**PM**- Peso molecular.

**PRELP**- *Proline, arginine-rich end leucine rich repeat protein.*

**PTFE**- Politetrafluoroetileno.

**PZS**- Proteína de zona superficial.

**RGD**- Secuencia arg-gly-asp.

**RER**- Retículo endoplasmático rugoso.

**RT**- Transcriptasa reversa.

**SCF**- Stem cell factor (factor de célula troncal).

**SFB**- Suero fetal bovino.

**SMAD**- *Small mothers against decapentaplegic.*

**SOX**- *SRY box.*

**SRLP**- Proteoglicanos de pequeña dimensión ricos en leucina.

**SRY**- Región Y de determinación sexual.

**TBE**- Tampón tris-borato-EDTA.

**TE**- Tampón tris-EDTA.

**TGFβ**- Factor de crecimiento y transformación beta (tipo 1, 2 y 3).

**TM**- Tricrómica de Masson.

**TSP**- Trombospondina.

**Wnt**- *Wingless gene.*

# **1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## **1.1.- BIOLOGÍA DEL CARTÍLAGO**

Como definen Junqueira *et al.* (1998), el cartílago es un tejido abundante en los vertebrados, siendo un componente fundamental del esqueleto. Este tejido tiene varias funciones fundamentales en el organismo como por ejemplo: actuar como molde para el crecimiento y desarrollo de huesos largos, formar parte del esqueleto fetal, teniendo un importante papel en la osificación endocondral, estar presente en las superficies articulares de los huesos proporcionando, de esta manera, una superficie de baja fricción y actúa también como soporte en algunos órganos del cuerpo, como la tráquea previniendo el colapso aéreo (Unsworth, 2004).

### **1.1.1.- HISTOGÉNESIS DEL CARTÍLAGO**

Durante el periodo de desarrollo embrionario el esqueleto es sobretodo cartilaginoso, siendo gradualmente sustituido por tejido óseo.

La histogénesis del cartílago es un proceso complejo, que se inicia mediante interacciones epitelio-mesenquimatosas. Existen dos tipos fundamentales de tejidos embrionarios: el epitelial y el mesenquimatoso. Durante los estadios iniciales del proceso de diferenciación del embrión, el tejido epitelial puede transformarse en mesenquimatoso y viceversa. Como han señalado Collins en 1995 y Hickok *et al.*, en 1998, además de esta transformación, estos tejidos interaccionan entre ellos, influenciando mutuamente su diferenciación. El tejido mesenquimatoso es la forma joven de tejido conjuntivo, que se caracteriza por estar constituido por células mesenquimatosas de forma estrellada, distribuidas en una matriz abundante (Noden y Delahunta, 1990). En 2001 MacDonald y Hall observaron que, a medida que surgen interacciones entre las células epiteliales y las células mesenquimatosas, éstas últimas inician un proceso de agregación y condensación. Las condensaciones mesenquimatosas van a dar origen a

los centros de condricación, lugares de formación inicial del cartilago. Las células mesenquimatosas presentes en las condensaciones, sufren un proceso de diferenciación, formando densas poblaciones celulares, que van perdiendo sus prolongaciones celulares y adquiriendo una forma redondeada, denominándose, en este momento, condroblastos (Banks, 1992; Hall y Miyake, 1995; Eurell y Sickle, 1998).

La fibronectina y activina, demostraron regular positivamente las Moléculas de Adhesión Celular (MACs), favoreciendo, de esta forma el inicio de las condensaciones (Widelitz *et al.*, 1993). Hall y Miyake (1995), señalan que a medida que las células de las condensaciones se diferencian en condrocitos, presentan colágeno del tipo II y disminuyen la expresión de las MACs.

El crecimiento de estos centros de condricación puede ocurrir por dos mecanismos distintos: crecimiento intersticial y crecimiento aposicional.

Es sabido, que en el crecimiento intersticial, los condroblastos sufren varias divisiones mitóticas y empiezan a sintetizar y a depositar la matriz, que separa los condroblastos unos de los otros. Esta diferenciación del cartilago tiene lugar desde el centro hacia las zonas limítrofes. En este momento, podemos observar, células con características de condrocitos en el centro y, en la periferia, células con características de condroblastos.

Simultáneamente a este fenómeno de diferenciación, la lámina que rodea el esbozo cartilaginoso se diferencia en pericondrio, constituido por dos capas distintas. La capa inmediatamente adyacente al esbozo cartilaginoso está compuesta por precondroblastos o condroblastos y se denomina capa celular o condrogénica. La capa más externa, está compuesta por fibras de colágeno no ordenadas y fibroblastos, y constituye la capa fibrosa (Eurell y Sickle, 1998).

En el crecimiento aposicional, los condroblastos se originan en la capa condrogénica del pericondrio, y van a segregar componentes de la matriz extracelular, durante su transformación en condrocitos. La capacidad de la capa condrogénica para producir cartilago persiste en la



vida adulta, pero permanece en estado latente hasta que haya necesidad de formación de nuevo cartilago (Banks, 1992).

Terminada esta fase de crecimiento, en la que hay una expansión cartilaginosa, el condroblasto se transforma en una célula menos activa, y se denomina condrocito (Eurell y Sickle, 1998). En la periferia del cartílago hialino, los condrocitos jóvenes tienen una forma elíptica, con el eje longitudinal paralelo a la superficie. En la región central las células se tornan más redondeadas y pueden aparecer en grupos de ocho originados por divisiones mitóticas de un simple condrocito. A este grupo de células Junqueira *et al.*, 1998 le denominan isógeno.

### **1.1.2.- ESTRUCTURA DEL CARTÍLAGO ADULTO**

El cartílago es un tejido conjuntivo sin vascularización (sanguínea y linfática) y sin inervación. Naumann *et al.*, 2002, describió como éste tejido está compuesto por células incluidas en una matriz, que está normalmente cubierta externamente por un pericondrio fibroso, con excepción del cartílago que recubre las superficies articulares.

#### **1.1.2.1.- Células**

Existen varios tipos distintos de células presentes en el cartilago: los condroblastos, condrocitos, condroclastos y fibrocondrocitos.

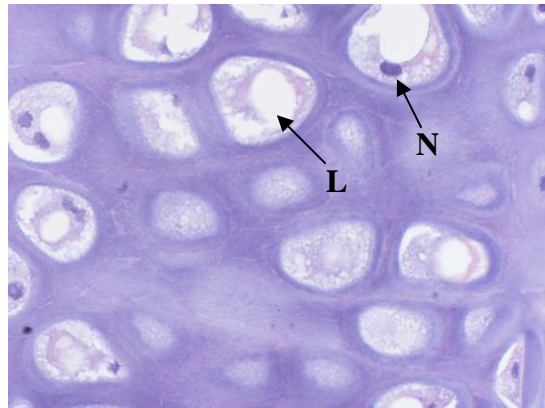
##### *Condroblastos*

Los condroblastos son células precursoras y están presentes, como ya referimos, en los centros condrogénicos del embrión y se mantienen en el adulto en el pericondrio. Los condroblastos forman a su alrededor un halo de matriz basófila adyacente, compuesta por una delicada red de fibras de colágeno de los tipos II, IX y de proteoglicanos. Estas células tienen un aspecto ovalado con un núcleo esférico, un citoplasma basófilo (debido a la presencia en gran cantidad de retículo

endoplasmático rugoso (RER)) y un complejo aparato de Golgi, teniendo un papel fundamental en el crecimiento cartilaginoso, como ya señalaron Eurell y Sickle, (1998) y Junqueira *et al.*, (1998).

### *Condrocitos*

El condrocito (del griego *Chondros*=Cartilago + *Cytos*= Células) es la célula por excelencia del cartilago. Los condrocitos tienen las mismas funciones que los condroblastos, pero con un nivel de actividad más reducido. Existe quien considera que los condrocitos y condroblastos son la misma célula en diferentes fases de su ciclo vital. Los condrocitos son consideradas células menos activas que los condroblastos, siendo estos últimos responsables del mantenimiento de la matriz que los rodea, sintetizando colágeno (principalmente del tipo II), glicoproteínas, proteoglicanos y ácido hialurónico, quedando incluidos en cavidades de la matriz denominadas lagunas.



**Figura 1** – Imagen microscópica del cartilago auricular de conejo (x20), se puede observar los condrocitos embebidos en la matriz. Las gotas lipídicas señaladas con **L** y el núcleo señalado con **N**.

Los condrocitos son células redondas o poligonales, con un núcleo esférico y con uno o más nucléolos. Debido a su gran función anabólica poseen un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado, mitocondrias poco abundantes y un aparato de Golgi complejo y prominente (Eurell y Sickle, 1998). De entre las características específicas de estas células destacamos que poseen un cilio primario y

la presencia en los condrocitos más viejos de acumulaciones de glicógeno y lípidos (Fig. 1) (Poole *et al.*, 2001; Archer y West, 2003).

Debido al hecho de que el cartílago está desprovisto de capilares sanguíneos, los condrocitos están obligados a realizar la respiración celular con baja presión de oxígeno (10% en la superficie y 1 % en las capas más profundas) (Archer y West, 2003). La gran adaptación a estas condiciones, pudo ser demostrada en experimentos donde se constató que como respuesta a bajas concentraciones de O<sub>2</sub>, surgen elevados niveles de expresión de HIF y AP-1 (Rajpurohit *et al.*, 1996).

Los condrocitos son células altamente glicolíticas (metabolizan la glucosa principalmente por glicólisis anaeróbica) que presentan efectos Pasteur negativos; requiriendo un aporte regular de glucosa para una óptima producción de ATP en la homeostasis celular (Lee y Urban, 1997). De esta forma, la glucosa es un importante metabolito y un importante precursor estructural fundamental para el cartílago, de modo que su transporte tiene consecuencias significativas en el desarrollo cartilaginoso y su integridad funcional. Se ha demostrado que los condrocitos normales expresan por lo menos tres isoformas del transportador de la glucosa GLUT (GLUT1, GLUT3 y GLUT9) (Mobasheri *et al.*, 2002).

### *Condroclastos*

Los condroclastos están presentes especialmente durante los estadios de desarrollo. Esta célula gigante multinucleada, que resulta de la fusión de macrófagos, es responsable de la renovación de la matriz cartilaginosa y de las células (Nordahl *et al.*, 1998). Estas células se reconocen fácilmente por sus numerosas mitocondrias, gotas y vacuolas (Takuma *et al.*, 1962; Banks, 1992).

### *Fibrocondrocitos*

Los fibrocondrocitos fueron descritos en el menisco de conejo por Webber *et al.*, en 1985. Son considerados como una combinación entre los condrocitos y los fibroblastos (Sweigart *et al.*, 2003). Estas células presentan una morfología redonda y están protegidos por una matriz territorial, como los condrocitos, pero producen colágeno tipo I como los fibroblastos (Benjamin y Ralph, 2004). Existen dos poblaciones morfológicamente distintas de fibrocondrocitos: una de células ovals o fusiformes con pocas prolongaciones celulares situada en la capa más superficial, y otra con células redondas o poligonales, con más prolongaciones y localizada en las capas más profundas (Gladially *et al.*, 1983).

#### **1.1.2.2.- Matriz extracelular**

La matriz extracelular (MEC) está constituida por un conjunto amplio de proteínas que le dan una gran capacidad para soportar cargas, como son: las fibras de colágeno, las fibras elásticas, tenascina C, fibronectina, trombospodina, proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa y los proteoglicanos (Tabla 1). Esta matriz tiene también propiedades coloidales, que son muy importantes para la nutrición de las células.

En cuanto a su localización, la matriz cartilaginosa, según Hunzinker *et al.*, (1997), puede ser dividida en matriz pericelular, matriz territorial y matriz interterritorial. Generalmente se piensa que la matriz pericelular y territorial, facilitan la conexión entre los condrocitos y la MEC, protegiéndolos durante la compresión del tejido (Buckwalter y Mankin, 1997a).

Ross *et al.*, (2006) trabajan sobre la matriz pericelular considerando que es una región de más o menos 2-3  $\mu\text{m}$  que circunda la célula, caracterizada por tener una elevada concentración de queratán-sulfato, colágeno tipo VI y menores cantidades de colágeno

tipo II, IX y XI (Wotton *et al.*, 1991), ácido hialurónico (Mason, 1981), proteoglicanos sulfatados (Pool *et al.*, 1984), perlecano (SundarRaj *et al.*, 1995) agrecano (Pool *et al.*, 1984), biglicano (Miosge *et al.*, 1994), fibronectina (Glant *et al.*, 1985), laminina (Dürr *et al.*, 1996) y proteína de unión (Ratcliffe y Mow, 1996).

Lee y Loeser (1998), determinaron que las integrinas, anexina V (ancorina II) y CD44 son mediadores de las interacciones entre los condrocitos y su matriz pericelular. Esta matriz conjuntamente con la célula encapsulada forma la condrona, que es considerada como la unidad estructural, funcional y metabólica del cartílago. Morfológicamente cada condrona consiste en un sólo condrocito conectado en su superficie a un glicocálix pericelular transparente que está confinado y encerrado por una cápsula fibrilar pericelular (Poole *et al.*, 1997). Envoltiendo la anterior aparece la matriz territorial que se caracteriza por estar constituida por una red de fibras de colágeno y condroitín sulfato (Meachim y Stockwell, 1979; Eurell y Sickle, *et al.* 1998).

La matriz interterritorial representa la mayor parte de la matriz extracelular del cartílago y es responsable de las propiedades mecánicas del cartílago (Temenoff y Mikos, 2000a). Esta matriz parece presentar grandes cantidades de queratán-sulfato.

A continuación expondremos las diversas proteínas que constituyen la matriz, su localización, los receptores de membrana que tienen los condrocitos y los componentes del fluido tisular.

**Tabla 1-** Macromoléculas en el cartilago articular. Adaptado de Schulz y Bader, 2007.

Componente	Elementos	Peso
Agua		60 a 80 %
Colágeno tipo II		10 a 20 %
Proteoglicanos agregantes	AH,KS, C4S y C6S	5 a 7 %
Agrecano		
Versicano		
Proteoglicanos no agregantes		<5 %
SRLP clase I	Biglicano y decorina	
SRLP clase II	Fibromodulina, Lumicano, PRELP; Perlecano, Epificano	
Familia sindecano	Amfiglicano, TGF- $\beta$ 3 Receptor $\beta$ 3 glicano, Glipicano	
Otros tipos de colágenos	Colágeno tipos III, V, VI, VII, IX, X, XI, XII, XIV	
Proteínas no colagenosas y glicoproteínas	COMP, Ancorina , Fibronectina, Tenascina, Trombospondina, Chondroaderina, Fibrilina	
Lípidos	Fosfatidilserina	

### 1.1.2.2.1.- Componentes fibrilares

#### Fibras de colágeno

El colágeno puede representar entre el 50 % a 60 % del peso seco de la MEC del cartilago, siendo que todas las matrices cartilaginosas están constituidas, principalmente, por colágeno del tipo II (Bloom y Fawcett, 1975).

El colágeno es una proteína estructural formada por la polimerización de monómeros de tropocolágeno. Cada monómero está compuesto por tres cadenas  $\alpha$ , que se enrollan unas en otras produciendo una triple hélice. Esta hélice está sustentada por puentes de hidrógeno, que estabilizan el patrón helicoidal entre las cadenas  $\alpha$  (Metzler, 2001). Cada cadena  $\alpha$  está formada por cerca de 1000 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 95 kDa.

Mediante estudios de cromatografía se identificaron diferentes tipos de cadenas  $\alpha$  ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5$ ) que se diferencian en base a la composición y secuencia de los aminoácidos que las componen (Alberts *et al.*, 1989).

Los condrocitos tienen la capacidad de sintetizar y segregar más de un tipo de colágeno. La capacidad de producir diferentes tipos de colágeno reside en la posibilidad de sintetizar diferentes cadenas  $\alpha$ . Éstas son sintetizadas en los ribosomas teniendo conectados en las regiones amino y carboxiterminales, propéptidos formados por 180 a 300 aminoácidos respectivamente, denominándose la estructura resultante procolágeno. Dependiendo de la cantidad y tipo de cadenas que lo constituyen se forman los distintos tipos de colágeno, estando descritos por lo menos 27 tipos diferentes (Tabla 2) (Lodish *et al.*, 1995; Mathews y van Holde, 1996; Boot-Handford *et al.*, 2003).

En el cartílago hialino y elástico, además del colágeno de tipo II (Heath y Magari, 1996) que es el más importante, existen cantidades menores de otros tipos, como los VI, IX, X y XI. En el caso específico del fibrocartilago, el colágeno predominante es el de tipo I, aunque también están presentes los tipos II, III, V y VI (McDevitt y Webber, 1990).

El **colágeno tipo II** es un heterotrímero de tres cadenas  $\alpha_1$  que son producto de un único gen: el *col2a1*. Existen dos formas de transcribir el gen *col2a1*, ARNs de los tipos IIa y IIb, que difieren únicamente por la presencia del exon 2. Se sabe que el de tipo IIa contiene, en relación al IIb, una cadena más con 69 aminoácidos, y es sintetizado por las células mesenquimatosas condroprogenitoras y por el pericondrio, teniendo posiblemente un papel importante como inductor de la condrogénesis, en cuanto que el del tipo IIb se expresa en los condrocitos adultos (Zhu *et al.*, 1999).

El **colágeno tipo VI**, puede encontrarse en la matriz pericelular y se cree que ayuda a la conexión de las células con la MEC, siendo considerado como un marcador molecular clave de la microanatomía de la condrona. Además representa una pequeña porción del porcentaje total de los colágenos cartilagosos (Eyre, 2002). Estudios en condronas aisladas indican que el colágeno tipo VI se encuentra

preferentemente localizado en la zona pericelular e interacciona directamente con la superficie celular (Poole *et al.*, 1988, Poole *et al.*, 1992). Aunque en menor cantidad que el colágeno total, la elevada concentración pericelular de colágeno tipo VI, sugiere una doble función en el cartílago articular, por una parte mediando las interacciones para mantener la arquitectura pericelular, y por otra proporcionando anclaje mediado por receptores y potencial de señalización entre el condrocito y su microambiente (Poole *et al.*, 1997).

El **colágeno tipo IX** (un colágeno asociado a fibrillas), tiene como función ayudar a la conexión de las fibrillas de colágeno con el resto de la MEC. Este colágeno es conocido por regular el diámetro de las fibras de colágeno tipo II (Wotton *et al.*, 1988) y está principalmente localizado en la condrona (Poole *et al.*, 1988; Poole *et al.*, 1997, Wotton *et al.*, 1991).

Los **colágenos IXa1 y XIa2** participan, juntamente con el colágeno de tipo II, en la formación de la red que constituye la matriz extracelular. Su función parece ser predominantemente de regulación, llevando la mutación de los genes COLIX y COLXI a la aparición de fenotipos de condrodisplasia, con la presentación precoz de osteoartritis (Eyre, 2002).

El **colágeno tipo X** puede ser observado en la forma mineralizada, en la zona calcificada del cartílago articular. Está predominantemente asociado con el cartílago hipertrófico, siendo el único lugar donde está descrito (Aigner *et al.*, 1993; Gibson y Flint, 1985; Schmid *et al.*, 1990).

El **colágeno tipo XI** es igualmente un colágeno de importancia menor en el cartílago articular adulto, no representa ni el 3 % del colágeno total. La cantidad de colágeno tipo XI es discreta en el cartílago auricular adulto, pero tiene un papel importante en la regulación del tamaño de las fibrillas de colágeno (Vaughan-Thomas *et al.*, 2001), manteniendo así la integridad y la cohesión tisular.

El colágeno tipo XI juega un papel importante en la regulación de la fibrinogénesis del colágeno tipo II. La liberación proteolítica del procolágeno tipo XI libera el propéptido terminal, pero la región variable



se mantiene en el interior de la molécula madura y se va a localizar en la superficie de las fibrillas de colágeno tipo II (Morris *et al.*, 2000).

### **Corregulación del Sox con el gen del colágeno II**

Las proteínas Sox pertenecen a la familia de los factores de transcripción, y son caracterizadas por un grupo de ligación de alta movilidad (HMG) al ADN, cuya secuencia es, por lo menos, 50% idéntica al factor de determinación sexual SRY. Uno de los miembros de la subfamilia Sox, más concretamente la Sox9, está demostrado tener un papel relevante en la esquetogénesis (Wegner *et al.*, 1999).

Estas proteínas Sox parecen tener importancia en la expresión del colágeno tipo II, contribuyendo de forma decisiva en el desarrollo de uno de los componentes biológicos más importantes para la formación del patrón arquitectónico del cartílago (Zhao *et al.*, 1997; Lefebvre y Li, 1998; Delise *et al.*, 2000).

**Tabla 2** –Tipos de colágeno más abundantes en los tejidos (Adaptado de Gelse, 2003).

Tipo*	Composición de la molécula	Longitud de la triple hélice	Genes (localización genómica)	Tejidos de distribución
<b>Colágenos formadores de fibrillas</b>				
<b>I</b>	[α1(I)] <sub>2</sub> [α2(I)] [α1(I)] <sub>3</sub>	300 nm	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	Piel, tendón, menisco, hueso y dentina
<b>II</b>	[α1(II)] <sub>3</sub>	300 nm	COL2A1 (12q13.11 – q13.2)	Cartílago y humor vítreo
<b>III</b>	[α1(III)] <sub>3</sub>	300 nm	COL3A1 (2q31)	Piel, músculo, sangre
<b>V</b>	[α1(V)] <sub>3</sub> [α1(V)] <sub>2</sub> [α2(V)] [α1(V)][α2(V)][α3(V)]	390 nm	COL5A1 (9q34.2– q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	Membranas fetales, piel, huesos, placenta y tejidos intersticiales
<b>XI</b>	[α1(XI)][α2(XI)] [α3(XI)]	300 nm	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	Cartílago y cuerpo vítreo
<b>Colágenos de membrana basal</b>				
<b>IV</b>	[α1(IV)] <sub>2</sub> [α2(IV)] Otras formas	-	COL4A1 (13q34), COL4A2 (13q34), COL4A3 (2q36– q37), COL4A4 (2q36– q37), COL4A5 (Xq22.3), COL4A6 (Xp22.3)	Todas las membranas basales
<b>Colágenos Microfibrilares</b>				
<b>VI</b>	[α1(VI)][α2(VI)] [α3(VI)]	150 nm	COL6A1 (21q22.3), COL6A2 (21q22.3), COL6A3 (2q37)	Mayor parte de los tejidos intersticiales
<b>Fibrillas de anclaje</b>				
<b>VII</b>	[α1(VII)] <sub>3</sub>	450 nm	COL7A1 (3p21.3)	Piel, mucosa oral y cérvix

<b>Colágenos que forman red hexagonal</b>				
<b>VIII</b>	No es conocida	-	COL8A1 (3q12– q13.1), COL8A2 (1p34.3– p32.3)	Células endoteliales y membrana de Descemet
<b>X</b>	[ $\alpha 1(X)$ ] <sub>3</sub>	150 nm	COL10A1 (6q21– q22.3)	Cartilago hipertrófico
<b>Colágenos FACIT</b>				
<b>IX</b>	[ $\alpha 1(IX)$ ][ $\alpha 2(IX)$ ] [ $\alpha 3(IX)$ ]	200 nm	COL9A1 (6q13), COL9A2 (1p33– p32.2)	Cartilago y humor vítreo
<b>XII</b>	[ $\alpha 1(XII)$ ] <sub>3</sub>	-	COL12A1 (6q12– q13)	Tendón embrionario y pericondrio
<b>XIV</b>	[ $\alpha 1(XIV)$ ] <sub>3</sub>		COL9A1 (8q23)	Piel fetal, pulmón y tendón
<b>XIX</b>			COL19A1 (6q12– q14)	Rabdomiosarcoma humano
<b>XX</b>				Cartilago esternal, tendón
<b>XXI</b>			COL21A1 (6p12.3– 11.2)	Pared de los vasos sanguíneos
<b>Colágenos transmembranosos</b>				
<b>XIII</b>	[ $\alpha 1(XIII)$ ] <sub>3</sub>	-	COL13A1 (10q22)	Células endoteliales, piel, intestino, condrocitos
<b>XVII</b>	$\alpha 1(XVII)$ <sub>3</sub>		COL17A1 (10q24.3)	Hemidesmosomas de la piel
<b>Multiplexinas</b>				
<b>XV</b>	[ $\alpha 1(XV)$ ] <sub>3</sub>		COL15A1 (9q21– q22)	Fibroblastos, células del músculo liso, riñón y páncreas
<b>XVI</b>			COL16A1 (1p34)	Fibroblastos, amnios y queratinocitos
<b>XVIII</b>			COL18A1 (21q22.3)	Pulmones e hígado

- El tipo de colágeno va numerado con numeración romana **FACIT**- Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices

### **Fibras elásticas**

Las fibras elásticas (Eurell y Sickle, 1998), están presentes en órganos cuya función normal requiere elasticidad y soportar fuerzas de tensión. Su diámetro varía entre 0,2 a 5  $\mu\text{m}$  en los tejidos conjuntivos laxos y 12 micras en los ligamentos elásticos, como el ligamento nuchal.

Estas fibras están formadas por dos componentes diferentes que son visibles al microscopio electrónico: la elastina y las microfibrillas. El mayor componente de las fibras elásticas es la elastina, una proteína amorfa de baja densidad electrónica. Las moléculas de elastina se entrelazan al azar y se mantienen unidas por uniones covalentes estables (las dos mayores la desmosina y isodesmina, dos derivados de la lisina). Las microfibrillas, glicoproteínas ricas en cisteína, tienen aproximadamente 11 nm de diámetro estando embebidas en las fibras elásticas (Rock *et al.*, 2004).

La elastina se sintetiza en forma de tropoelastina, como cadenas polipeptídicas únicas, que son transformadas en elastina, por conexiones cruzadas y se disponen en el espacio extracelular (Banks, 1992). Estudios realizados (Parks *et al.*, 1992), parecen indicar que la regulación de la expresión de la tropoelastina es controlada por mecanismos pos-transcripcionales. El promotor del gen de la elastina se activa durante el desarrollo embrionario en varios tejidos, sugiriendo que la manifestación del gen de la elastina puede tener un papel en la organización de la estructura cutánea, del esqueleto y del tejido nervioso, estando presente en los animales adultos en diversidad de tejidos (Lakkakorpi *et al.*, 1999). Las microfibrillas se secretan antes que la elastina y proporcionan la base sobre la que se depositan las fibras y las láminas.

#### **1.1.2.2.2.- Proteoglicanos**

Los proteoglicanos (PGs) están constituidos por un conjunto de glicosaminoglicanos (GAGs) unidos por conexiones covalentes a una proteína central (Fig. 2). Debido a que poseen un 95% de hidratos de

carbono, estas macromoléculas se comportan más como azúcares que como proteínas (Lodish *et al.*, 1995).

Los **GAGs** son unidades de disacáridos (en los que uno de los azúcares es un amino sulfatado), cuyas principales características químicas son el poseer grupos aniónicos sulfato y carboxilo, que les proporcionan una carga negativa, y la propiedad de ser moléculas ácidas. Existen cinco tipos distintos de GAGs, siendo cuatro de ellos sulfatados: sulfato de dermatano, sulfato de condroitina (4 y 6), sulfato de heparano y queratosulfato y uno no sulfatado: el ácido hialurónico. (Alberts *et al.*, 1989). Estos glicosaminoglicanos se pueden distinguir entre sí por el tipo de unión entre los disacáridos y por la localización de los grupos sulfato.

Dado el predominio de grupos ácidos, los GAGs tienden a repelerse mutuamente por lo que permanecen unidos únicamente por la proteína central, formando una estructura arborizada. Estos agregados se mantienen unidos como una red tridimensional con grandes espacios internos llenos de agua. Tal disposición permite la fácil difusión de agua y sales disueltos en la matriz (Banks, 1992).

Los proteoglicanos tienen la capacidad de formar grandes agregados, después de ser segregados por las células. Esos agregados de proteoglicanos pueden alcanzar pesos moleculares superiores a 5000 kDa. Este fenómeno de agregación depende del ácido hialurónico. A pesar de que esta molécula existe en pequeña cantidad en el cartílago, su papel en la estructura de la MEC es muy significativo. El ácido hialurónico puede corresponder apenas a 0,01% de los GAGs del agregado de proteoglicanos, pero puede conectar hasta 250 veces su peso en proteoglicanos. Estos agregados de proteoglicanos poseen tres funciones significativas en el cartílago: la estabilización de la matriz, la definición del volumen de la matriz y la gestión de las fuerzas compresivas de la matriz (Knudson y Tool, 1987).

La síntesis de proteoglicanos empieza por la síntesis de la proteína axial en el retículo endoplasmático rugoso, seguida de la adición de las cadenas de GAG y su sulfatación. La adición y la

modificación de las cadenas de GAG tienen lugar en el aparato de Golgi (Bargmann, 1968).

El cartílago contiene varios tipos de proteoglicanos: el agrecano, el ácido hialurónico, la decorina, el biglicano, la fibromodulina, el sindecano-2, el versicano, el epifcano y el perlecano (Banks, 1992; Junqueira *et al.*, 1998; French *et al.*, 1999).

El **agrecano** es el proteoglicano más común y mejor descrito de la matriz del cartílago, que puede formar grandes complejos macromoleculares en presencia del ácido hialurónico, aumentando la viscosidad relativa de la matriz. Este gran proteoglicano (225-250 kDa) está compuesto por conexiones de más de 100 cadenas de glicosaminoglicanos a la proteína central. Los GAGs mayoritarios en el agrecano son el sulfato de condroitina y queratosulfato (Knudson y Knudson, 2001).

El **ácido hialurónico** (AH) se sintetiza sobre la forma de un polímero de cadena larga no ramificado y cargado negativamente. Está compuesto por disacáridos de ácido glucorónico y de N-acetilglucosamina, unidos por conexiones alternadas del tipo  $\beta_{1-3}$  y  $\beta_{1-4}$ . La síntesis del ácido hialurónico, es distinta de los otros proteoglicanos, ya que éste no va a ser sulfatado después de la síntesis (Toole, 2004).

El AH posee características hidrodinámicas remarcables. Esto permite el establecimiento de una viscosidad elevada, capaz de retener grandes cantidades de agua. De esta manera, juega un papel importante en la homeostasis e integridad tisular. El ácido hialurónico interacciona con los proteoglicanos en el cartílago articular, así como con otras moléculas igualmente importantes para la construcción de la matriz extracelular (Toole, 2001). Debido a sus propiedades lubricantes, el AH se utiliza en inyección intra-articular, en el tratamiento del dolor asociado a artrosis (Moreland, 2003).

La **proteína de unión** (*link protein*) es indispensable para la formación estable de agregados de proteoglicanos, con expresión aumentada durante la condrogénesis (Liu *et al.*, 1997).

Dentro del grupo de **pequeños proteoglicanos ricos en leucina** (SRLP) incluimos la decorina, la fibromodulina, biglicano y epifcano. Su estructura se compone por un dominio central rico en leucina, encuadrado por diversos dominios de cisteína. Las cadenas de GAG están localizadas al nivel N-terminal, sobre su dominio central. Estos pequeños proteoglicanos pueden intervenir en la adhesión celular mediante sus interacciones con la fibronectina o trombospondina (Hocking *et al.*, 1998; Iozzo, 1998).

La **decorina** y la **fibromodulina** pueden regular la fibrinogénesis de los colágenos organizando el espaciamiento de las fibras entre las fibrillas de colágeno tipo II (Scott *et al.*, 1993). Por otro lado, la **decorina** se conecta a los factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ , regulando su estabilidad, su biodisponibilidad y sus actividades biológicas (Scott, 1996).

El **biglicano** parece tener una distribución pericelular en el cartílago adulto humano (Miosge *et al.*, 1994).

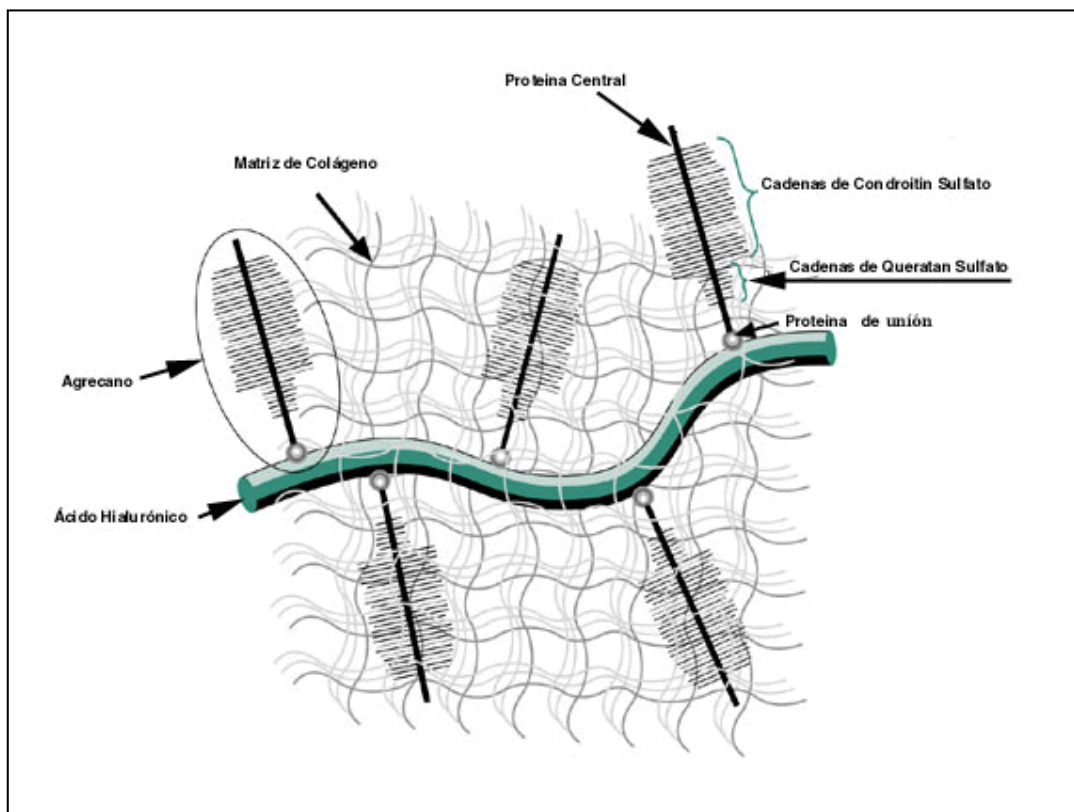
El **epifcano** es un miembro de la superfamilia de los proteoglicanos de pequeña dimensión ricos en leucina (SRLP) (Hocking *et al.*, 1998; Iozzo, 1998). Estudios de Johnson *et al.*, en 1999, demostraron que el epifcano es un marcador intermediario de la condrogénesis, y que este proteoglicano está presente en la matriz extracelular que envuelve los condrocitos en reposo, en proliferación e hipertróficos.

Se denominan **proteoglicanos de superficie** a los proteoglicanos conectados a la membrana plasmática del condrocito. Éstos se dividen en cuatro familias de acuerdo con el tipo de asociación con la membrana plasmática. Los miembros pertenecientes a este grupo actúan como receptores o correceptores para ligandos de las citocinas o

para elementos de la matriz extracelular, como la fibronectina (Bernsfield *et al.*, 1999; Iozzo, 2001).

Los **sindecanos** son proteoglicanos con la base de heparán sulfato (HS-PGs). Los **sindicanos** y **betaglicanos** se conectan directamente a la membrana gracias a una región hidrófoba de su eje proteico. El **glipicano** está ligado a la membrana plasmática indirectamente mediante un grupo glicosil fosfatidil inositol.

El **versicano** es un proteoglicano con base de condroitín sulfato, que está presente durante el inicio de la formación de la matriz, desapareciendo después de la deposición del agregano. A medida que la diferenciación de los condrocitos se desarrolla, tiene lugar la sustitución de la matriz inicial, donde predomina la fibronectina y el versicano, por la matriz cartilaginosa madura, donde aparece el colágeno tipo II y el agregano (Knudson y Knudson, 2001).



**Figura 2**– Imagen representativa de la constitución de un proteoglicano, concretamente del agregano (Imágenes obtenidas y modificadas de internet [www.peprotech.co.krfa\\_sub4](http://www.peprotech.co.krfa_sub4)).



El **perlecano** también presenta una cierta importancia en la condrogénesis, no sólo como marcador útil, sino también por potenciar la diferenciación condrogénica (Freench *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2004).

La presencia adicional de elevadas concentraciones de ácido hialurónico y proteína de unión sugiere el confinamiento pericelular de estas moléculas, lo que puede ser importante en la construcción del complejo proteico ácido hialurónico-agrecano-proteína de unión (Poole *et al.*, 1997).

#### **1.1.2.2.3.- Otras proteínas y glicoproteínas no relacionadas con el colágeno**

Además de los proteoglicanos y colágenos, el cartílago contiene proteínas no fibrilares y glicoproteínas. Algunas de estas moléculas se piensa (Buckwalter y Mankin, 1997a) que estén implicadas en la organización y manutención de la estructura de la MEC.

La **fibronectina** (FN) es una molécula de elevado peso molecular (440 kDa), que Lodish *et al.*, (1995) describieron como pertenecientes a la familia de proteínas multiadhesivas de matriz. La molécula de fibronectina tiene, a lo largo de toda su estructura lugares, de conexión para glicoproteínas celulares, integrinas, colágeno, GAGs, y heparina. Debido a estas características estructurales, las fibronectinas desempeñan un papel importante en la organización de la matriz extracelular mediante la unión a colágenos fibrilares, a la tenascina, a los pequeños proteoglicanos heparán-sulfato y en las interacciones célula-matriz por receptores de adhesión, (como la integrina  $\alpha 5\beta 1$ ). Las fibronectinas influyen también en la forma y movimiento de las células y organización del citoesqueleto (Burton-Wurster *et al.*, 1997).

Diversos autores (Bennett *et al.*, 1991; Rencic *et al.*, 1995) comprobaron la expresión de la fibronectina en el cartílago mediante la extracción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Previamente, en

1985, Glant *et al.*, habían demostrado la expresión de la fibronectina en la región pericelular.

Su función en el tejido cartilaginoso articular aún no es bien conocida, pero puede tener un papel importante en la organización de la matriz, en las interacciones célula-célula, en la respuesta a las interacciones célula-matriz, y las respuestas del tejido en la artritis inflamatoria y osteoartritis.

La **tenascina** está presente en el cartílago hialino normal, en la matriz pericelular territorial, siendo que su presencia en la matriz interterritorial es menor. Pfander *et al.*, (2004), han demostrado que en pacientes con osteoartritis, la presencia de esta glicoproteína aumenta.

La asociación de la tenascina-c con el desarrollo cartilaginoso fue observada por primera vez por Chiquet y Frambrough (1984), que describieron la presencia de esta proteína en el pericondrio, en modelos cartilaginosos de huesos largos de embrión de pollo. Estas observaciones, conjuntamente con estudios *in vitro*, llevaron a investigaciones más detalladas sobre la expresión de patrones de tenascina-c durante el desarrollo cartilaginoso, proporcionando sus posibles funciones. La tenascina-c aparece en las condensaciones mesenquimatosas celulares, que preceden la diferenciación celular, pero está ausente en el mesénquima condrogénico circundante (Mackie *et al.*, 1987).

Se llevaron a cabo estudios de inmunohistoquímica en embriones de roedores, y de esta manera se confirmó (Mackie *et al.*, 1998) la observación anteriormente descrita, no sólo para las condensaciones mesenquimatosas procedentes de los modelos cartilaginosos en la osificación endocondral, sino también, para las condensaciones que procedían del cartílago hialino permanente (cartílago traqueal) y del fibrocartilago (discos intervertebrales).

La expresión de tenascina-c se pierde gradualmente a medida que los condroblastos se diferencian y se separan unos de los otros, por deposiciones de componentes específicos de la matriz extracelular

(incluyendo el colágeno tipo II y agregano), pero se mantienen en los condroblastos, en la periferia del cartílago en desarrollo (Gluhak *et al.*, 1996).

Las **trombospondinas (TSP)** pertenecen a una familia en expansión de proteínas de la matriz, y están compuestas por módulos de unidades repetitivas. Las TSP -1 y -2, manifiestan una distribución similar a la tenascina-c en los tejidos condrogénicos del pollo. Ambas están presentes en el mesénquima condensado; sin embargo, su presencia va disminuyendo a medida que el condrocito se diferencia, manteniéndose únicamente en la periferia del modelo cartilaginoso (O'Shea y Dixit, 1988; Tucker, 1993). Las TSP-1 y -2 están ausentes en la matriz de los condrocitos proliferativos e hipertróficos de la placa de crecimiento de las aves (Tucker *et al.*, 1997). Sin embargo parece haber diferencias interespecíficas. En el desarrollo de las ratas existe una expresión adicional de TSP-1 en la región de los condrocitos hipertróficos, y de TSP-2 en la última zona proliferativa de la placa de crecimiento (Iruela-Arispe *et al.*, 1993).

La TSP-3 surge más tardíamente en la condrogénesis que las TSP -1 y -2, aparece en gran cantidad en la zona de proliferación de los condrocitos, en los condrocitos hipertróficos y en reposo (Iruela-Arispe *et al.*, 1993; Tucker *et al.*, 1997). La TSP -4, en el cartílago en desarrollo existe apenas de forma tenue, estando presente en los condrocitos en proliferación de la placa de crecimiento de las aves (Tucker *et al.*, 1995).

En el cartílago adulto articular normal, la TSP-1 está presente principalmente en la zona media y en la zona profunda. La expresión de ARN se encuentra predominantemente, en condrocitos de la zona media. CD36, el receptor de TSP-1 aparecía en los condrocitos de la zona superficial y media. En el cartílago moderadamente osteoartrítico, se observó un número aumentado de condrocitos expresando TSP-1 y un aumento de la tinción pericelular. En el cartílago severamente osteoartrítico se observó una disminución en el número de condrocitos

que sintetizan TSP-1 con una reducción de la tinción de la matriz (Pfander *et al.*, 2000).

La **proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa** (COMP) (también denominada trombospondina-5) es una proteína ácida, está concentrada principalmente en la matriz territorial del cartílago y parece tener la capacidad de conectar a los condrocitos (Hedbom *et al.*, 1992; DiCesare *et al.*, 1994).

La COMP tiene elevados niveles de expresión en los estadios más avanzados de la condrogénesis, con efectos importantes en la diferenciación de los condrocitos por actuación conjunta con la BMP-2, y permanece en la matriz del cartílago maduro. Una mutación en el gen que codifica esta proteína promueve un defecto en la organización de la matriz cartilaginosa (Franzen *et al.*, 1987; Hedbom *et al.*, 1992; Kipnes *et al.*, 2003).

Lohmander *et al.*, (1994), afirman que esta molécula puede tener valor como marcador del “turn-over” cartilaginoso y de la progresión de la degeneración del cartílago en pacientes con osteoartritis.

La **laminina** es un heterotrímero, constituido por tres cadenas distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), que se combinan de forma que originan 15 tipos diferentes de lamininas (Ekblom *et al.*, 2003). El trabajo de Tavella *et al.*, en 1997, demostró que la expresión de las tres cadenas de laminina  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  y  $\gamma_1$  (Laminina-1) alcanza su punto máximo en el momento en que ocurre la condensación celular, decreciendo, sin embargo, durante el proceso de diferenciación, hasta el punto de que los condrocitos hipertróficos apenas contienen niveles de  $\gamma_1$  (Dürr *et al.*, 1996). Se observó que la expresión pericelular de laminina en el cartílago articular adulto de pacientes saludables, era abundante en las capas superficiales, estando sin embargo ausente en las capas más profundas (Dürr *et al.*, 1996).

Las proteínas **CCN** (cyr61, ctgf, nov), son importantes factores reguladores de la señalización celular. Esta familia participa en la

angiogénesis, condrogénesis y osteogénesis, e intervienen, posiblemente, en el control de la proliferación y de la diferenciación celular (Perbal, 2004).

La *cyr61* promueve la agregación celular y la adhesión del tejido mesenquimal. Esta proteína favorece la condrogénesis en cultivos en micromasa, y su inhibición la impide (Wong *et al.*, 1997).

#### **1.1.2.2.4.-Receptores de membrana**

La mayor parte de las interacciones célula/matriz están mediadas por receptores transmembranales. Los condrocitos demostraron ser capaces de expresar varios receptores para los componentes de la matriz extracelular. Más concretamente las integrinas, anexina V y CD44. Todos ellos, miembros de cada clase de receptores, por las interacciones con sus principales ligandos, permiten a los condrocitos detectar las alteraciones de la matriz extracelular. Como respuesta a esas alteraciones tenemos: la reparación, la remodelación de la matriz o la quiescencia celular (Knudson y Loeser, 2002).

Las **integrinas** engloban una vasta familia de receptores de superficie celular, que se encuentran en muchas especies animales, desde las esponjas a los mamíferos, siendo en los vertebrados los receptores más importantes para los componentes de la matriz extracelular. Estas proteínas tienen un papel importante en la mediación de las interacciones célula-célula y de la célula con los componentes de la matriz, regulando actividades biológicas como la migración, la diferenciación, la adhesión y la apoptosis (Svoboda, 1998; Aszodi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003b; Yamada *et al.*, 2003).

El nombre integrina fue propuesto por primera vez para estos receptores celulares por Tamkun *et al.*, en 1986. Estructuralmente están compuestas por dos cadenas polipeptídicas: una  $\alpha$  y una  $\beta$ , covalentemente asociadas, siendo que cada combinación  $\alpha\beta$  tiene su

propia especificidad de conexión y de señalización. Hasta el momento se conocen 18 cadenas  $\alpha$  y 9 cadenas  $\beta$ , que se pueden combinar de tal manera que formen 24 tipos diferentes de integrinas (Hynes, 1992; Hynes, 1996).

Sin embargo, en un estudio realizado sobre el genoma humano, fueron identificadas 24 cadenas  $\alpha$  y 9 cadenas  $\beta$ , sugiriendo, de esta forma, que todavía pueden descubrirse 6 polipéptidos  $\alpha$  más, además de las 18 ya identificadas (Venter *et al.*, 2001).

Las integrinas están constituidas por una cabeza globular (con un grupo N-terminal, que está en contacto con las moléculas de la matriz extracelular) un cuerpo y una cola citoplasmática (con un grupo C-terminal que está en contacto con el citoesqueleto y las cinasas del citoplasma (Hynes, 1992).

Para que los componentes de la matriz extracelular puedan conectarse a las integrinas, deberán tener en su composición el péptido RGD (secuencia Arg-Gly-Asp), que permite la conexión de esta estructura a un locus específico de la cabeza globular, denominado de Midas (*Metal ion dependent adhesion site*) (Humphries *et al.*, 2003).

Las colas citoplasmáticas están constituidas normalmente por 50 aminoácidos, con las secuencias de la subunidad  $\beta$  muestran una mayor homología entre sí que las de las subunidades  $\alpha$ . Estas diferencias moleculares parecen reflejarse a nivel funcional. De esta forma, la subunidad  $\beta$  podrá ser el locus de conexión al citoesqueleto y las moléculas de señalización, en cuanto que la subunidad  $\alpha$  podrá tener un efecto regulador en esta unión. Esta hipótesis implica que las dos subunidades interaccionen una con la otra (Humphries *et al.*, 2003).

La interacción entre los condrocitos y su matriz extracelular se considera un factor esencial para la estabilidad del fenotipo condrogénico (Loeser, 2002). La MEC del cartílago adulto además de proporcionar una estructura de soporte importante para los condrocitos, también transmite un conjunto de señales por receptores de superficie celular (integrinas), que permiten la regulación de un

número importante de funciones celulares. La unión de las integrinas a los ligandos de la MEC (RGD y otros), conduce a la formación de complejos de señalización, con un papel relevante en la regulación de la supervivencia celular, en la proliferación, en la diferenciación y en la remodelación de la matriz. La activación de las integrinas, también es coordinada por el citoesqueleto, por los factores de crecimiento y por receptores de las citocinas (Adams y Watt, 1993; Loeser, 2002). Concluyendo que es probable que no todas las integrinas expresadas por los condrocitos, hayan sido ya descubiertas.

En realidad, la influencia del colágeno, de la fibronectina, de la laminina y de la trombospondina en el comportamiento celular de los condrocitos depende de la presencia de las integrinas, que participan activamente en las interacciones entre el condrocito y estos componentes de la matriz extracelular (Shakibaei *et al.*, 1997; Shakibaei, 1998; Danen *et al.*, 2002).

Los condrocitos expresan uniformemente la subunidade  $\beta 1$  (Tabla 3), siendo ésta de vital importancia para la unión de la integrina a la laminina, a la fibronectina, a la trombospondina y al colágeno (Dürr *et al.*, 1993; Enomoto *et al.*, 1993). Las cadenas  $\alpha$ , no demostraron una uniformidad tan grande en su expresión, variando el tipo de cadena con el estado de diferenciación de la célula y las interacciones con la matriz circundante.

**Tabla 3** – Integrinas de condrocitos y sus ligandos.

<b>Integrina</b>	<b>Ligandos</b>	<b>Autor</b>
$\alpha 1\beta 1$	Colágeno tipo VI,II	Loeser <i>et al.</i> , 2000
$\alpha 2\beta 1$	Colágeno tipo II,VI, condroaderina	Loeser <i>et al.</i> , 2000; Shakibaei <i>et al.</i> , 1997
$\alpha 3\beta 1$	Fibronectina (de baja afinidad)	Loeser <i>et al.</i> , 2000
$\alpha 4\beta 1$	NE/Condrocitos	Loeser <i>et al.</i> , 2000
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina	Dürr <i>et al.</i> , 1993; Enomoto <i>et al.</i> , 1993
$\alpha 6\beta 1$	Laminina	Loeser <i>et al.</i> , 2000
$\alpha 10\beta 1$	Colágeno tipo II	Camper <i>et al.</i> ,1998; Camper <i>et al.</i> , 2001; Shakibaei <i>et al.</i> , 1997
$\alpha v\beta 3$	Vitronectina,Trombospondina, sialoproteina ósea, Fibronectina	Woods <i>et al.</i> , 1994

El **CD44** es una glicoproteína de membrana expresada en muchos tipos celulares, incluyendo los condrocitos. Esta glicoproteína contiene un dominio hidrofóbico (codificado por el exón 18), seguido por un dominio intracelular de 70 aminoácidos (exón 20). El dominio intracelular del CD44 contiene motivos con el potencial para traducir señal y controlar la organización espacial del receptor en la membrana plasmática (Knudson y Loeser, 2002).

En condrocitos, el CD44 representa el receptor primario responsable de la conexión para el AH (Knudson *et al.*, 1996). Sin embargo en el cartílago, el AH raramente está presente como una molécula pura. Frecuentemente, más de 50 monómeros de agreganos (proteoglicanos) se conectan a un único filamento de AH (Buckwalter y Rosenberg, 1982). Por lo tanto, la conexión de AH a el CD44 en el cartílago facilita la retención de largas cadenas, fuertemente hidratadas, procedentes de los complejos AH/PG/proteína de unión en la superficie de los condrocitos.

La **anexina V** (ancorina II), un miembro de una gran familia de proteínas definidas por su capacidad de unirse a fosfolípidos, de una forma dependiente de calcio, están distribuidas en la superficie de condrocitos aislados en fresco, en condrocitos sembrados y en secciones cartilaginosas. El potencial de conexión de los condrocitos al colágeno *in vivo*, se sugiere por la capacidad de la anexina V de conectarse al colágeno tipo II y X (von de Mark y Mullenhauer, 1997; Reid *et al.*, 2000; Lucic *et al.*, 2003).

El **NG2** es un proteoglicano transmembranal que contiene cadenas laterales de condroitín sulfato, y se expresa en el cartílago adulto (Nishiyama *et al.*, 1991; Midwood y Salter, 2001) teniendo como ligandos al colágeno tipos V y VI (Burg *et al.*, 1996; Tillet *et al.*, 1997). Este receptor tiene un papel en la transducción de señales al interior



celular, regulación de la proliferación celular y adhesión (Burg *et al.*, 1996; Fukushi *et al.*, 2004).

#### **1.1.2.2.5.- Fluido tisular**

El agua representa cerca del 80% del peso húmedo del cartílago articular, y la interacción del agua con las macromoléculas de la matriz, influencia substancialmente las propiedades mecánicas del tejido. El fluido tisular contiene gases, pequeñas proteínas, metabolitos y un gran número de cationes (para equilibrar los proteoglicanos que tienen carga negativa) (Buckwalter y Mankin, 1997a).

Este fluido normalmente contiene 3-4 mg/ml de ácido hialurónico sintetizado por la membrana sinovial y se secreta a la cavidad articular para aumentar la viscosidad. Las interacciones entre la carga negativa de los grandes proteoglicanos agregantes y los cationes dentro del fluido tisular, ayudan a retener agua en el interior del tejido y contribuyen a mantener las propiedades mecánicas de los diferentes tipos de cartílago (Buckwalter y Mankin, 1997a).

Los nutrientes de la corriente sanguínea, atraviesan el pericondrio para alcanzar las capas más profundas del cartílago, por mecanismos que incluyen la difusión y transporte de solutos, promovidos por una acción intermitente de la compresión y descompresión cartilaginosa. Por esta razón, el grosor del cartílago es limitado (Eurell y Sickle, 1998).

De entre las proteínas que están presentes en este fluido, destacamos la lubricina y la proteína de la zona superficial (PZS). La lubricina es una proteína de 227 kDa presente en el líquido sinovial y que participa en la lubricación de la articulación (Elsaid *et al.*, 2005). La lubricina está codificada por el gen PRG4 y se secreta por los fibroblastos sinoviales. La PZS es una proteína de 345 kDa que es igualmente producto del gen PRG4. La PZS presenta una fuerte homología con la lubricina, y es secretada por los condrocitos de la zona superficial del cartílago articular (Rhee *et al.*, 2005). La degradación del cartílago observada en los casos de poliartritis reumatoide se debe a un

aumento de las fuerzas de fricción en la articulación. Este aumento de las fuerzas de fricción es originado en parte, por una disminución de la lubricación, resultante de la disminución de la síntesis de lubricina por parte de los fibroblastos sinoviales y de PZS por parte de los condrocitos superficiales (Elsaid *et al.*, 2007).

### **1.1.3.- TIPOS DE CARTÍLAGO**

Los tejidos cartilagosos están localizados en diferentes lugares anatómicos, tienen diferentes necesidades fisiológicas y están sujetos a fuerzas mecánicas específicas. En respuesta a estas condiciones fisiológicas y mecánicas, o como consecuencia de los mecanismos de desarrollo, el cartílago tiene una constitución diversa en el organismo.

Bargmann (1968), subdivide al cartílago en hialino (hyalus=cristal), fibrocartílago (muy rico en colágeno) y cartílago elástico (con una red adicional de elastina).

#### ***Cartílago hialino***

El cartílago hialino es el tipo de cartílago más común, ya que forma el esqueleto cartilaginoso primitivo de los vertebrados y en el adulto se localiza en los cartílagos epifisarios y articulares, en la tráquea, en los bronquios, cartílago nasal, cartílagos costales y en otras localizaciones orgánicas. Cuando el esqueleto embrionario se convierte en hueso, principalmente por osificación endocondral, el cartílago hialino continúa presente en los cartílagos epifisarios y articulares de las articulaciones sinoviales, proporcionando una superficie muy lisa y muy resistente al desgaste y la compresión.

El cartílago articular no se osifica en condiciones normales, porque no tiene condrocitos hipertróficos; tampoco tiene pericondrio. Dellmann y Brown (1987), describen que el colágeno característico de este tipo de cartílago es el tipo II, conteniendo también fibronectina y colágeno tipo VI y IX.

### ***Fibrocartílago***

El fibrocartílago es un tejido conjuntivo denso y fasciculado de color blanco, que contiene fibroblastos y pequeños grupos interfasciculares de condrocitos. Estos últimos están rodeados por matriz con estriaciones concéntricas (Cormack, 1996; Freemont y Hoyland, 2006). Se localizan en los discos intervertebrales, en el esqueleto cardíaco y en algunos tendones, cerca de sus inserciones en el hueso. Este tejido es distinto de otros tipos de cartílago por poseer en su matriz un elevado porcentaje de colágeno tipo I (Bargmann, 1968).

### ***Cartílago elástico***

El cartílago elástico pertenece a un grupo de cartílagos secundarios o accesorios, ya que no forman parte del primordio cartilaginoso del esqueleto. Aparece en los mamíferos, en un periodo más avanzado del desarrollo embrionario, incluso se piensa que el cartílago elástico se diferencia a partir de un molde de cartílago hialino, estando completamente diferenciado en el momento del nacimiento (Schaffer, 1930). Se distribuye por el cartílago auricular, epiglotis y otros cartílagos laríngeos.

En 1987, Cormack describió que los cartílagos secundarios se caracterizan por tener una gran variabilidad en la estructura y en las propiedades mecánicas, entre las especies de mamíferos, e incluso en varias razas de la misma especie.

Estudios realizados por Bradamante en 1991, demostraron que el proceso de desarrollo del cartílago elástico incluía los siguientes pasos: la aparición de las fibras de colágeno, de las fibras elásticas, de los proteoglicanos de la matriz, y posteriormente la transformación de los condrocitos.

Este cartílago posee una estructura idéntica al cartílago hialino, pero contiene abundantes fibras elásticas que dan un color amarillo, excepto alrededor de las lagunas, donde la matriz pericelular recuerda

la matriz hialina típica con fibrillas finas de colágeno tipo II. Se localiza en la epiglotis y en otros cartílagos de la laringe, y en el cartílago auricular (Bloom y Fawcett, 1975).

## **1.2.- INGENIERÍA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO**

Las patologías cartilagosas tienen una elevada incidencia en la población mundial, causando todos los días enormes pérdidas financieras (Jackson *et al.*, 2001; Cherubino *et al.*, 2003).

Dentro de las enfermedades imputables a la degeneración del cartílago se incluyen: enfermedades congénitas, enfermedades pediátricas de la placa de crecimiento, lesiones inducidas por traumas, osteoartritis y otras patologías degenerativas relacionadas con la edad, artritis reumatoide y neoplasias. De todas ellas, se estima que sólo la osteoartritis es la responsable del 50% de las patologías crónicas en una población envejecida (Sun *et al.*, 2007; Reginster *et al.*, 2002).

Según el estudio EXPERT Artrosis en España, la artrosis es la enfermedad articular más prevalente en la actualidad, con una incidencia y prevalencia en aumento, se considera que para el año 2010 la incidencia será de 4 nuevos casos x1000 habitantes/año y la prevalencia de 4,1 nuevos casos x1000 habitantes/año, no existiendo diferencias entre comunidades autónomas. La incidencia aumentará progresivamente en varones de 30 años en adelante, siendo el grupo de edad más afectado a partir de los 60 años, lo mismo que sucederá con la incidencia femenina de la artrosis.

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinar emergente, que se destaca como una nueva área de la medicina y puede ser definida como el arte de reconstruir los tejidos, ya sea estructural, o funcionalmente (Hunzinker *et al.*, 2001). El cartílago una vez lesionado tiene poca capacidad de reparación espontánea debido a la naturaleza avascular de este tejido. En este contexto la ingeniería del tejido cartilaginoso, pretende ser una solución para este problema intentando alcanzar un sustituto funcional (Salgado *et al.*, 2006).

En principio las intervenciones iniciales para reparar el cartílago lesionado estaban dirigidas más hacia el tratamiento de síntomas clínicos que hacia la regeneración del cartílago hialino (Vacanti, 2006).

El desarrollo del concepto de la ingeniería de tejidos como solución para la reparación cartilaginosa fue propuesto por primera vez por el cirujano ortopédico infantil Dr. W. T. Green en la década de 70, cuando intentó implantar condrocitos en la rodilla de conejo. En este caso, los condrocitos crecen en un ambiente *ex vivo* que puede ser transplantado en un defecto cartilaginoso. Con este estudio se concluyó que con el uso de un biomaterial de calidad sería posible generar nuevo tejido implantable (Green, 1977; Vacanti, 2006).

Este nuevo campo de la ciencia tiene por bases el uso combinado de células, biomateriales y factores bioactivos que permiten regenerar y reemplazar las funciones biológicas del cartílago dañado o degenerado (Fig. 3) (Dietrich *et al.*, 2004).



**Figura 3** - Esquema de ingeniería de tejidos.

A pesar de que en las últimas cuatro décadas se han desarrollado muchas técnicas, ninguna de ellas ha sido capaz de lograr una regeneración de forma eficaz del cartílago hialino. Las distintas técnicas de la ingeniería de tejidos tales como el transplante de condrocitos aislados, demostraron un enorme potencial clínico en la regeneración

de defectos cartilagosos y tratamientos de lesiones condrales (Tabla 4)(Unsworth, 2004).

El tipo celular utilizado en la ingeniería del cartílago es un de los puntos decisivos en el desarrollo de esta ingeniería. Se han investigado diferentes poblaciones celulares en estudios experimentales como condrocitos maduros, células troncales (Wei *et al.*, 2007b).

A continuación describiremos detalladamente los diferentes componentes que son necesarios en la ingeniería del tejido cartilaginoso: las células, sustancias bioactivas y matrices.

**Tabla 4** – Resumen de estudios de ingeniería del cartilago (Adaptado de Unsworth, 2004).

<b>Fuente celular</b>	<b>Tipo de biomaterial</b>	<b>Sistema de cultivo</b>	<b>Tiempo de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
Cartilago Articular de Bovino	Gel de Agarosa	Cultivos estáticos	10 semanas	Buschmann <i>et al.</i> , 1992
Cartilago Articular de Bovino	PGA	Cultivos estáticos	6 semanas	Freed <i>et al.</i> , 1993
Cartilago Articular de Bovino	PGA	Cultivos estáticos	8 semanas	Freed <i>et al.</i> , 1994a
Cartilago Articular de Bovino	PGA	Agitación en frascos	6 semanas	Freed <i>et al.</i> , 1994b
Cartilago Articular de Bovino	PGA	<i>In vivo</i> (implantado subcutáneo en un ratón knock-out)	12 semanas	Puelacher <i>et al.</i> , 1994
Cartilago Articular de Conejo	PGA	<i>In vivo</i> (implantado en el interior de defectos en conejos)	7 semanas	Vacanti <i>et al.</i> , 1994
Cartilago Articular de Conejo	PGA	“Cartrige” perfundido	4 semanas	Dunkelman <i>et al.</i> , 1995
Cartilago Articular de Bovino	PGA	Rotación de la pared del birreactor. Spinner Flash	1 semana	Freed y Vunjak-Novakonic, 1995
Cartilago Articular de Bovino	PGA	Pared rotación bioreactor	40 días	Freed <i>et al.</i> , 1998
Cartilago Articular de Bovino	PGA/ Colágeno poroso	Sistema de recirculación en circuito cerrado.	35 días	Grande <i>et al.</i> , 1997
Medula ósea embrionaria de pollo	PGA	Placa en agitación	4 semanas	Martin <i>et al.</i> , 1998
Cartilago de perro	Colágeno tipo I/ Esponja de GAG Colágeno tipo II/ Esponja de GAG	<i>In vivo</i> (Defectos cartilaginosos superficiales)	15 semanas	Nehrer <i>et al.</i> , 1998
Cartilago de menisco de bovino	Colágeno tipo I/ Esponja de GAG Colágeno tipo II/ Esponja de GAG	No declarada por el autor	3 semanas	Mueller <i>et al.</i> , 1999
Cartilago articular de bovino	PGA	Placa de petri revestida con agarosa	6 semanas	Martin <i>et al.</i> , 1999



<b>Fuente celular</b>	<b>Tipo de biomaterial</b>	<b>Sistema de cultivo</b>	<b>Tiempo de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
Cartilago Articular de Bovino	PGA	Cultivo estático / Frasco en agitación y bioreactor con rotación de la pared	6 semanas	Vunjak-Novakovic <i>et al.</i> , 1999
Cartilago Articular de Bovino	Suspensión célula-Fibrinogénio en PGA	Perfusión de flujo seguida por in vivo (implantación subcutánea en un ratón atímico knock-out)	In vitro 8 días seguido de 12 semanas <i>in vivo</i>	Duda <i>et al.</i> , 2000
Cartilago articular de perro	Copolimero de Colágeno tipo I/ GAG Copolimero de Colágeno tipo II/ GAG	Cultivo estático (placas de 24 pocillos)	14 días	Lee <i>et al.</i> , 2000
Cartilago articular de bovino	Células encapsuladas en alginato dentro de la matriz ósea bovina Células encapsuladas en alginato no interior de la matriz PGA	In vivo (subcutáneamente implantada en ratas atímicas)	8 Semanas	Marijnissen <i>et al.</i> , 2000
Cartilago auricular de conejo	Ethisorb 210 (polydioxanona/poliglactin)  PLLA	Estática (96 pocillos)	4 semanas	Rudert <i>et al.</i> , 2000
Medula ósea humana	PLA  PLA-Alginato	Estática (12mm placa de cultivo)	21 días	Caterson <i>et al.</i> , 2001
Cartilago articular bovino	PGA	Varias condiciones	4 semanas	Gooch <i>et al.</i> , 2001
Cartilago articular humana	Ninguna (Cultivos agregados)	Tubos cónicos	2 semanas	Jacob <i>et al.</i> , 2001
Cartilago articular rata	Esponjas de alginato Esponjas de Alginato-hialurónico Células encapsuladas en alginato	Estática (Placas de 24 pocillos)	1 mes	Miralles <i>et al.</i> , 2001
Epifisis bovina fetal	Difenilfosforilazida cross linked con esponja de colágeno	Cultivo estático (placa de 24 pocillos)	1 mes	Roche <i>et al.</i> , 2001

<b>Fuente celular</b>	<b>Tipo de biomaterial</b>	<b>Sistema de cultivo</b>	<b>Tiempo de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
Cartilago articular bovino	Esonja PGA Esonja de colágeno PGA-esponja de colágeno	<i>In vivo</i> (implantación subcutánea en una rata atimica)	8 semanas	Sato <i>et al.</i> , 2001
Cartilago articular bovino	PGA	Placas de 6 pocillos	7 semanas	Kellner <i>et al.</i> , 2001
Cartilago articular bovino	Colágeno-Sulfato de condroitina	Cultivos estáticos (Placas de 96 pocillos)	14 días	van Susante <i>et al.</i> , 2001
Cartilago articular humano	Ester hialuran-benzil	Cultivos estáticos	60 días	Grigolo <i>et al.</i> , 2002
Cartilago articular bovino Cartilago nasal bovino Cartilago articular humano Cartilago nasal humano	PGA	Agitador orbital (75 rpm)  Agitador orbital (75 rpm), seguido de implantación <i>in vivo</i> de ratón atimico.	40 días  <i>in vitro</i> 40 días seguido de <i>in vivo</i> 6 semanas	Kafienah <i>et al.</i> , 2002
Cartilago auricular humano	Alginato	Cultivos estáticos (placas de 24)	21 días	Mandl <i>et al.</i> , 2003
Cartilago articular porcino	Tri-copolimero gelatina-condroitin-hialurónico	Cultivos estáticos (Frascos de petri) Frascos en rotación	5 semanas	Chang <i>et al.</i> , 2003
Cartilago articular bovino	Matriz porosa de poliuretano  Matriz porosa de PLA	Cultivos estáticos (placas de 12 pocillos)	42 días	Grad <i>et al.</i> , 2003
Cartilago Meniscal Ovino  Cartilago Articular Humano	PGA PCL poroso PGA poroso Polietileno glicol dimetacrilato hidrogel	Cultivos estáticos	4 semanas	Huckle <i>et al.</i> , 2003
Cartilago Articular Bovino	Alginato	Cultivos estáticos (Placas de 24 pocillos)	14 días	Masuda <i>et al.</i> , 2003
Cartilago Articular de Bovino	Fosfato de calcio	Cultivos estáticos	8 semanas	Walkman <i>et al.</i> , 2003

<b>Fuente celular</b>	<b>Tipo de biomaterial</b>	<b>Sistema de cultivo</b>	<b>Tiempo de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
Cartilago articular bovino	Matriz porosa Poli(Ácido l-láctico-caprolactona)	Cultivos estáticos (placas de 10 cm) seguido por <i>in vivo</i> (implantación subcutánea en un ratón atímico)	<i>In vitro</i> 1 semana seguido por <i>in vivo</i> 40 días	Isogai <i>et al.</i> , 2004
Cartilago oreja humano Cartilago nasal humano Cartilago costal humano	Ninguno (cultivo agregados)	Cultura Pellet ( <i>orbital shaker</i> a 30 rpm)	2 semanas	Tay <i>et al.</i> , 2004
Cartilago articular bovino	Macroporoso hidrogel alginato	<i>In vivo</i> (implantación subcutánea en ratón inmunocomprometido)	24 semanas	Thornton <i>et al.</i> , 2004
Cartilago articular bovino	PEGT/PBT PEGT/PBT	<i>Spinner flask</i>	<i>In vitro</i> 14 días seguido por <i>in vivo</i> 28 días	Malda <i>et al.</i> , 2005
Cartilago oreja humano	Colágeno Alginato	Cultivos estáticos	3 semanas	Yamaoka <i>et al.</i> , 2006
Cartilago nasal humano	Fibrina	-	<i>In vivo</i> 3 semanas	Vinatier <i>et al.</i> , 2008

### **1.2.1.- CÉLULAS UTILIZADAS EN INGENIERÍA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO**

Las células utilizadas en ingeniería de tejidos deben ser biosintéticamente activas y tener disponibles nutrientes, metabolitos y otras moléculas reguladoras (Jackson y Simon, 1999). La edad del donante, el origen y el estado de diferenciación de las células son factores fundamentales que pueden variar los resultados obtenidos en los estudios realizados hasta la fecha (Buckwalter y Mankin, 1997b, Huckle *et al.*, 2003, Vunjak-Novakovic, 2003).

En el organismo de los mamíferos adultos existe un número aceptable de células condroprogenitoras, que tienen el potencial de diferenciarse en condrocitos, formando tejido cartilaginoso, y que pueden ser utilizados en ingeniería de tejidos (Salgado *et al.*, 2006). En el grupo de células con capacidad condroprogenitora podemos incluir: los condrocitos y las células troncales.

#### **1.2.1.1.- Condrocitos y condroblastos**

Los condrocitos maduros y diferenciados son a priori la primera elección para la regeneración cartilaginosa por ser la población celular nativa del cartílago y sintetizar los componentes propios de la matriz (Grande *et al.*, 1999; Freed *et al.*, 1999).

Los condrocitos se aíslan fácilmente, pero es complicado obtener un número apropiado de células con capacidad para regenerar el cartílago completo (Huckle *et al.*, 2003). Es posible expandir *in vitro* las poblaciones celulares usando técnicas de cultivos celulares, sin embargo, se observó que en monocapa los condrocitos se desdiferencian, toman una apariencia fibroblástica y secretan una matriz fibrosa (Holtzer *et al.*, 1960). Se ha demostrado que el cultivo de células en un medio tridimensional, como una matriz tridimensional porosa puede ayudar a mantener el fenotipo condrocítico (Freed y Vunjak-Novakovic, 1998).

Como describimos en el capítulo anterior, en los diversos tipos de cartílago están presentes diferentes poblaciones condrocíticas. Las células se pueden obtener y cultivar de diversas fuentes, concretamente: condrocitos embrionarios, fetales y adultos (**cartílago nasal** (van Osch *et al.*, 2001; Kafienah *et al.*, 2002; Richmon *et al.*, 2005; Miot *et al.*, 2005; Vinatier *et al.*, 2007), **costal** (Kato y Gospodarowicz, 1985; Jonhson *et al.*, 2004; Tay *et al.*, 2004; Idrus *et al.*, 2005; Isogai *et al.*, 2006), **auricular** (Panossian *et al.*, 2001; van Osch *et al.*, 2004; Jonshon *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2006b), **articular** (Brittberg *et al.*, 1994; Vunjak-Novakovic *et al.*, 1999; Mauck *et al.*, 2000; Bryant y Anseth, 2002; Klein *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2004; Mesa *et al.*, 2006), **disco intervertebral** (Aota *et al.*, 2006)).

Los condrocitos auriculares son células que han adquirido mayor importancia en los últimos años por el hecho de que pueden ser usadas en una gran variedad de aplicaciones como la reparación del tejido auricular (en casos de microtía) (Shieh *et al.*, 2004), la corrección del septo nasal (Yanaga *et al.*, 2006), el recubrimiento de superficies luminarias de prótesis artificiales del sistema cardiovascular (Scott-Burden *et al.*, 2002), reparación del núcleo pulposo (Gorensek *et al.*, 2004) y tratamiento de la deficiencia intrínseca del esfínter vesical (Bent *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que este tipo celular tiene como principal ventaja, en relación con el otro tipo de condrocitos, poseer una elevada tasa de proliferación y baja morbilidad local (van Osch *et al.*, 2004). La utilidad de los condrocitos auriculares es mayor que la sustitución pura y simple del cartílago elástico, siendo, por lo tanto, de gran utilidad en varios campos.

#### **1.2.1.2.- Células troncales**

Las células troncales son las formadoras de cada órgano, tejido y células del cuerpo (Paratore y Sommer, 2006). Estas células tienen como principales características el ser células indiferenciadas, capaces

de dividirse y autorenovarse durante largos períodos, formando unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) (Baksh *et al.*, 2004; Boquest, 2005), y poseen el potencial de diferenciarse en diversas líneas celulares (Blau *et al.*, 2001).

Las células troncales pueden clasificarse en relación con su plasticidad y en función al origen (Tabla 5). La plasticidad puede ser definida como la capacidad para diferenciarse en células especializadas y pueden ser denominadas como totipotentes, pluripotentes y multipotentes. En cuanto al origen de estas células pueden clasificarse como células embrionarias y células adultas (post-nacimiento).

**Tabla 5-** Resumen de la clasificación de las células troncales.

<b>Origen</b>	<b>Plasticidad</b>		<b>Localización</b>
<b>Embrionarias</b>	Totipotentes	Potencial de transformarse en cualquier tipo de células del cuerpo adulto y en cualquier célula de las membranas extraembrionarias (e.g. placenta).	Cigoto y las primeras 4 blastómeras durante la segmentación
	Pluripotentes	Capaces de transformarse en cualquier célula diferenciada del organismo, pero no pueden formar las membranas extraembrionarias (que derivan del trofoblasto).	Todas las otras células embrionarias, excepto el disco embrionario y las primeras 4 células
<b>Adultas</b>	Multipotentes	Capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares.	Periostio, pericondrio, hueso trabecular, tejido adiposo, sinovia, músculo esquelético, pulmón dientes deciduos, cerebro, dermis, hígado, páncreas, cordón umbilical

#### **1.2.1.2.1.- Células troncales embrionarias**

Como hemos comentado anteriormente existen dos tipos distintos de células troncales embrionarias: las pluripotentes y las totipotentes. Las totipotentes, debido a la dificultad de su obtención y a los

problemas éticos asociados a su uso (en la especie humana), no son empleadas con tanta frecuencia en la ingeniería de tejidos (Kiatpongsan *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2008).

Por lo que respecta a las células pluripotentes, han sido ampliamente estudiadas, estando descritos tres tipos celulares distintos: las células troncales embrionarias propiamente dichas, las células de carcinoma embrionarios y las células embrionarias germinales.

Las células troncales embrionarias propiamente dichas, son las que más aplicaciones tienen y son las células aisladas a partir de la masa celular interna (MCI) del blastocisto pre-implantatorio (3 a 5 días de edad). Estas células fueron estudiadas en varias especies como por ejemplo el ratón, primates no humanos y humanos (Vats *et al.*, 2002; Bishop *et al.*, 2002). Los otros dos tipos distintos de células troncales embrionarias, son las células de carcinoma embrionario y las células embrionarias germinales. Las primeras se aíslan a partir de teratocarcinomas, un tumor que aparece ocasionalmente en la gónada fetal, las segundas son aisladas de los esbozos de las gónadas de fetos abortados (Dewey *et al.*, 1977; Blau *et al.*, 2001).

El cultivo de estas células presenta problemas éticos y legales debido al uso de embriones excedentarios. Los críticos defienden que estos embriones darán origen, si se implantasen a un nuevo ser humano, lo cual es rebatido por otros autores que afirman que estos embriones acabarían por ser descartados de cualquier forma. La investigación se ha dirigido hacia lograr el desarrollo de métodos que eviten los problemas éticos, habiéndose propuesto la utilización de métodos que no impliquen la destrucción de los embriones (Kaji y Leiden, 2001; Grompe, 2005).

En el intento de usar células troncales embrionarias para la reparación cartilaginosa, el mayor desafío es traspasar la respuesta inmunológica del receptor del trasplante, a no ser que la fuente isogénica de las células troncales embrionarias, provenga de la clonación terapéutica. Una alternativa más viable es crear un banco de

células troncales con diferentes genotipos, así como distintas isoformas del complejo principal de histocompatibilidad, que puedan en el futuro coincidir con el del receptor, evitando, de esta manera, problemas de rechazo.



### **1.2.1.2.2.- Células troncales adultas**

Estas células se denominan frecuentemente células troncales mesenquimatosas (CTM) o células troncales estromales (Alhadlaq y Mao, 2004). Poseen una mayor capacidad proliferativa y potencial regenerativo comparadas con las células somáticas maduras. Pueden encontrarse en la mayor parte de los órganos del cuerpo en los cuales pueden sustituir las células muertas y lesionadas (Baksh *et al.*, 2004).

Las CTM demostraron ser multipotentes con capacidad para diferenciarse en las del tipo de los tejidos mesenquimales incluyendo músculo, hueso, cartílago y grasa (Pittinger *et al.*, 1999), teniendo en cuenta que evidencias recientes sugieren que subpoblaciones de estas células troncales, a pueden tener la capacidad de diferenciarse en otras líneas no mesodérmicas, como células neuronales (Safford *et al.*, 2002), hepatocitos (Talens-Visconti *et al.*, 2007), pensándose incluso que pueden originar la mayoría de los tejidos después de su inyección en un blastocisto (Jiang *et al.*, 2002).

Las células troncales son altamente replicativas y con capacidad de diferenciación múltiple, tienen en la célula troncal hematopoyética su caso más significativo, que genera todos los tipos de células sanguíneas y del sistema inmunitario. Las CTM son menos tumorigénicas que sus homólogas embrionarias. La ventaja del uso de células troncales embrionarias en lugar de las células troncales adultas para regenerar el cartílago, es el hecho de que las células troncales embrionarias son inmortales y pueden, teóricamente, proporcionar una fuente ilimitada de condrocitos diferenciados. En cambio, la renovación y capacidad proliferativa de las CTMs disminuye con la edad (Baksh *et al.*, 2004). Ésto obviamente, limita el uso y el trasplante de células autólogas en el tratamiento de enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, como la osteoartritis.

Las células troncales mesenquimatosas adultas pueden tener más anormalidades genéticas que las células troncales embrionarias,

causadas por las exposiciones a tóxicos metabólicos y errores en la replicación del ADN acumulados durante la vida del individuo.

### **Localización de las células troncales multipotentes en los tejidos adultos**

Las células troncales fueron identificadas por primera vez en los estudios pioneros de Friedenstein y Petrakova, en el interior del compartimento estromal de la médula ósea en 1966. La médula ósea contiene dos tipos de células troncales, las células troncales hematopoyéticas, que dan origen a las células sanguíneas y del sistema inmunitario (Kondo *et al.*, 2003) y las células estromales progenitoras, ahora denominadas células troncales mesenquimales (CTM), que tienen la capacidad de originar una gran diversidad de tejidos.

Hasta hace poco tiempo, la médula ósea era el tejido de elección para la obtención de CTMs adultas, sin embargo, trabajos recientes han proporcionado nuevos y relevantes progresos presentando nuevas teorías sobre nichos tisulares específicos, sobre la movilización de las células troncales y sobre cuestiones de diferenciación local. De esta forma, se han publicado en diversos estudios, nuevas fuentes de CTMs adultas concretamente : **periostio** (Zarnett y Salter, 1989; Nakahara *et al.*, 1990; O'Driscoll *et al.*, 2001; Fukumoto *et al.*, 2003), **pericondrio** (Arai *et al.*, 2002), **hueso trabecular** (Noth *et al.*, 2002; Sottile *et al.*, 2002; Tuli, 2003a), **tejido adiposo** (Zuk *et al.*, 2001; De Ugarte, *et al.*, 2003), **sinovia** (De Bari *et al.*, 2001; Sakaguchi *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005b; Kurth *et al.*, 2007), **músculo esquelético** (Deasy *et al.*, 2001), **pulmón** (Lama *et al.*, 2007 ) **dientes deciduos** (Miura *et al.*, 2003), **cerebro** (Kukekov *et al.*, 1999; Hinsch y Zupanc, 2006), **dermis** (Ferraris *et al.*, 2000), **hígado** (Malouf *et al.*, 2001), **páncreas** (Abraham *et al.*, 2002), **cordón umbilical** (Carlin *et al.*, 2006).

Actualmente, los lugares ideales para la recogida y aislamiento de células troncales adultas permanecen bajo una cierta controversia. A pesar de que las células de la médula ósea han sido las más estudiadas y mejor conocidas, las células obtenidas de otros lugares están

ocupando un papel cada vez más relevante. Dentro de ellas las obtenidas del tejido adiposo, debido a su relativa facilidad de obtención y que no existen diferencias significativas de morfología, rendimiento, inmunofenotipo, cinética de crecimiento, senescencia celular, tasa de aislamiento, capacidad de diferenciación y eficiencia de transducción genética en relación con las células provenientes de la médula ósea y cordón umbilical (De Ugarte *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2005; Izadpanah *et al.*, 2006).

Además, los aspirados de médula ósea tienen problemas asociados, que pueden ir desde que una porción muy pequeña de células de medula ósea (1 en cada 100 000) pueda ser considerada una verdadera CTM, la infección de la herida y las complicaciones potenciales de sepsis (Frazer *et al.*, 2006).

#### **1.2.1.2.2.1.- Células multipotentes a partir del tejido adiposo**

El tejido adiposo representa una fuente alternativa de enorme potencial de células troncales adultas y puede tener aplicaciones terapéuticas en diversos campos de la medicina (Zuk *et al.*, 2001). Este tejido es un derivado del mesénquima embrionario y contiene un estroma de soporte que se aísla fácilmente, teniendo la capacidad para sufrir una notable transformación de volumen durante la vida del individuo. Pequeños aumentos de volumen, pueden deberse al aumento en la cantidad de lípidos almacenados en los adipocitos individualmente (hipertrofia); las grandes modificaciones en el tamaño están causadas por la generación de nuevos adipocitos (hiperplasia). Estas modificaciones están mediadas por una población de células progenitoras o células troncales (Frazer *et al.*, 2006).

La nomenclatura de estas células ha sido objeto de controversia, habiéndose utilizado muchos términos para caracterizar las células adherentes incluyendo: células precursoras de los adipocitos (Hauner, 1989), pre-adipocitos, células troncales adultas derivadas del tejido adiposo (Gimble, 2003), células estromales derivadas del tejido adiposo (Safford *et al.*, 2002), células estromales adherentes derivadas del tejido adiposo (Katz *et al.*, 2005), células del procesado lipoaspirado (Zuk, 2001). De acuerdo con el consenso alcanzado por los investigadores presentes en el “Second Annual International Fat Applied Technology Society Meeting”, el nombre que debe ser adoptado es Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo (CTDTA).

Durante varios años estas células fueron estudiadas principalmente para determinar su potencial adipogénico (Deslex *et al.*, 1987; Zuk *et al.*, 2001; Dicker *et al.*, 2005), pero más recientemente estas células han demostrado tener también potencial para diferenciarse en diversas y definidas vías *in vitro* (Tabla 6 ) más específicamente en: **cartílago** (Zuk *et al.*, 2001; Erickson *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2003; Awad *et al.*, 2004), **células endoteliales** (Miranville *et al.*, 2004; Wosnitza *et al.*, 2007), **soporte hematopoyético** (Cousin *et*

*al.*, 2003), **hepatocitos** (Seo *et al.*, 2005), **células neuronales** (Ashjian *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Safford *et al.*, 2002), **músculo esquelético** (Mizuno *et al.*, 2002; Bacou *et al.*, 2004), **músculo cardíaco** (Rangappa *et al.*, 2003; Gaustad, *et al.*, 2004; Planat-Benard *et al.*, 2004) y **osteoblastos** (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002; Huang, *et al.*, 2002; Cowan *et al.*, 2004), cuando son tratadas con medios de diferenciación específicos.

**Tabla 6**– Factores utilizados experimentalmente para inducir la diferenciación de las células troncales del tejido adiposo. Adaptado de Schäffler y Büchler, 2007.

<b>Tipo de Diferenciación</b>	<b>Factores de diferenciación</b>
Adipogénico	Insulina, IBMX, Dexametasona, Rosiglitane, indometacina
Condrogénica	BMP-6,BMP-7, FGF-2, TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$ , dexametasona e IGF-1
Osteogénica	1,25(OH) $_2$ D $_3$ , $\beta$ - Glicerofosfato, ácido ascórbico, BMP-2, Dexametasona, ácido valproico
Biogénica	Microambiente específica
Cardiomiogénica	IL-3,IL6, SCF
Endotelial	ECGM VEGF, IGF-1, FCS
Neurogénico	B-mercaptanol; Ácido valproico, insulina, hidroxianisol, hidrocortisona, EGF y FGF
Pancreático/ Endocrino	Activina-A, Exendina-4, pentagastrina, HGF, nicotinamida, concentración elevada en glucosa,
Hepático	HGF, OSM, DMSO
Hematopoyético	IMDM, VEGF, SCGF-b, FCS, BSA, b-mercaptoetanol

Lista de Abreviaturas- 1,25(OH) $_2$ D $_3$  1,25-dihydroxy-cholecalciferol; BMP- Proteína morfogenética ósea; DMSO- Dimetilsulfóxido; EGF-Factor de crecimiento epidérmico; FGF- Factor de crecimiento de los fibroblastos; HGF- Factor de crecimiento del hepatocito; IBMX- 3-isobutil-1-metilxantina; IGF-Factor de crecimiento tipo insulina; IL- Interleucina; OSM- Oncostatina M; SCF- Factor de célula troncal; TGF $\beta$ -Factor de crecimiento y transformación beta.

La obtención de células troncales derivadas del tejido adiposo es más sencilla que las de médula ósea, y con técnicas mínimamente invasivas. El lugar de procedencia del tejido varia mucho, habiéndose

descrito la grasa abdominal, inguinal y grasa infrapatelar (Dicker *et al.*, 2005; Tholpady *et al.*, 2003; Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006).

Las CTDTA tienen un enorme potencial para ser utilizadas en biotecnología, sobre todo en medicina regenerativa debido a sus características únicas, más concretamente:

- Los depósitos subcutáneos de tejido adiposo son accesibles, abundantes y pueden ser repuestos, proporcionando, de esta forma, un potencial reservorio para cada individuo (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002).
- Pueden ser aisladas rápidamente (en un período de una hora) (Zuk *et al.*, 2001).
- Es un método más seguro, porque el paciente recibe sus propias células sin necesidad de que éstas hayan sufrido grandes expansiones.
- Estas células presentan gran plasticidad y existen en mayor cantidad que en la médula ósea (Wexler *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2005; Kern *et al.*, 2006).

#### Obtención y caracterización de las CTDTA

Se observa en la literatura una enorme diversidad de métodos de obtención de este tejido, en relación con el tipo de procedimientos quirúrgicos y con el lugar de obtención de la grasa (Tabla 7).

Después de obtenida, la grasa se disocia con colagenasa y realizamos una centrifugación que permite separar los adipocitos (que flotan) de los otros tipos celulares. La fracción celular originada por centrifugación se denomina fracción estromal vascular (FEV) (Zuk *et al.*, 2001).

**Tabla 7** – Métodos de recogida utilizados en la obtención de las células troncales del tejido adiposo.

<b>ESPECIE DE RECOGIDA</b>	<b>LUGAR</b>	<b>FORMA DE RECOGIDA</b>	<b>AUTOR</b>
Humano	Subcutáneo (zona abdominal y coxal)	Lipoaspiración	Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Zuk <i>et al.</i> , 2001; Ugarte <i>et al.</i> , 2003; Aust <i>et al.</i> , 2004; Boquest <i>et al.</i> , 2005; Dicker <i>et al.</i> , 2005; Katz <i>et al.</i> , 2005; Guilak <i>et al.</i> , 2006
	Subcutáneo y tejido visceral (región omental)	Pacientes de cirugía abdominal y lipoaspiración	van Harmelen <i>et al.</i> , 2004; Festy <i>et al.</i> , 2005
	Subcutáneo (zona abdominal y coxal)	Recesión, lipoaspiración tumescente y lipoaspiración asistida por ultrasonidos	Oedayrajsingh-Varma <i>et al.</i> , 2006
	Grasa infrapatelar	Recesión quirúrgica	Liu <i>et al.</i> , 2006
Conejo	Tejido Adiposo Cervical	Recesión quirúrgica	Wei <i>et al.</i> , 2006
	Tejido adiposo paraescapular	Recesión quirúrgica	Dragoo <i>et al.</i> , 2007
Rata	Grasa visceral (adyacente al intestino y estómago)	Recesión quirúrgica	Tholpady <i>et al.</i> , 2003
	Grasa subcutánea	Recesión quirúrgica	Yoshimura <i>et al.</i> , 2006
Ratón	Grasa inguinal	Recesión quirúrgica	Xu <i>et al.</i> , 2007

Algunos grupos centran su atención exclusivamente en el mínimo procesamiento de la fracción estromal vascular, mientras que otros trabajan en expandir la subpoblación de CTDTA adherentes en varios países.

Para que las CTDTA puedan ser utilizadas rutinariamente como agentes de terapia celular, es necesario que sean caracterizados los parámetros que definen esta población celular.

De esta forma, diversos autores han procurado estudiar la presencia de varios marcadores de superficie celular, utilizando numerosos anticuerpos monoclonales (Tabla 8) (Barry y Murphy, 2004; Gomillion y Burg, 2006). Este trabajo se ha visto dificultado por diversos factores; uno, el hecho de existir una superposición entre estos marcadores y los expresados por otras células y otro, presentarse modificaciones en la expresión de algunos de los marcadores superficiales en cultivo (Mitchell *et al.*, 2006). De esta forma se ha intentado realizar la caracterización tanto de la FEV, como de la CTDTA.

La FEV está constituida por una población heterogénea que incluye preadipocitos, fibroblastos, células del músculo liso, pericitos, eritrocitos, células endoteliales (Robdell, 1964; Greenwood y Hirsch, 1974), macrófagos (Weisberg *et al.*, 2003) y linfocitos (Casper-Baugil *et al.*, 2005). Recientemente, se han desarrollado trabajos en los cuales se ha intentado purificar esta fracción estromal vascular, de forma que la contaminación por células indeseadas sea mínima.

Mitchell *et al.*, en 2006 realizó un trabajo en tejido adiposo humano, en el cual constató que la fracción estromal vascular exhibía bajos niveles de expresión de marcadores estromales (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166), siendo que en países más tardíos se observaba un aumento significativo de estos marcadores. Estos cambios también se verifican en las células troncales de médula ósea (Pittinger *et al.*, 1999).

La expresión negativa del marcador de superficie panhematopoyético CD45, demuestra que estas células no derivan de las células troncales de médula ósea en circulación (Aust *et al.*, 2004).



Se ha discutido la utilidad del CD90 (Thy-1) como un marcador fiable para constatar la diferenciación osteoblástica. La expresión de esta proteína de 25-30 kDa de membrana ligada glicosilfosfatidilinositol (GPI), cuya función biológica no está todavía descrita, disminuye a medida que los osteoblastos maduran (Wiesmann *et al.*, 2006).

El anticuerpo SH-2/Endoglina reacciona con un epítipo del Cd105. El potencial condrogénico parece estar relacionado con la expresión de CD105, un receptor del TGF- $\beta$  presente en las células estromales derivadas de la médula ósea (Barry *et al.*, 1999).

Además de estos marcadores de células troncales, estas células también expresan, el CD29 (Integrina beta1) que tiene un papel fundamental en la angiogénesis terapéutica, el CD44 (receptor del ácido hialurónico, que tiene un papel crucial en el desarrollo de la matriz extracelular y tiene un papel importante en numerosos eventos patológicos y fisiológicos) y el CD49e (Integrina Alpha5, importante para la adhesión celular a la fibronectina).

Las CTDTAs también expresan elevados niveles de CD54 (ICAM-1) comparado con las células troncales de la medula ósea (CTMO). ICAM puede ser sobreexpresada en respuesta a numerosos mediadores inflamatorios y citocinas.

Se demostró, que las células derivadas clonalmente del tejido adiposo son inmunoprivilegiadas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se piensa que ésto puede deberse a que menos del 1 % de las CTDTA expresan la proteína HLA-DR y las moléculas de MHC Clase I. Las CTDTA no provocan aloreactividad de linfocitos incompatibles y suprimen la reacción mixta y respuesta linfocítica mixta a los mitógenos (Mcintosh *et al.*, 2006). Esto sugiere que las CTDTA, pueden tener un potencial inmunoprivilegiado como donantes universales con capacidad de ser utilizadas en los trasplantes alogénicos y reducción del rechazo de los injertos (Puissant *et al.*, 2005).

**Tabla 8** – Marcadores comunes de las células troncales. Adaptado de Gomillion y Burg, 2006.

<b>Marcadores positivos</b>	<b>Referencias</b>	<b>Marcadores negativos</b>	<b>Referencias</b>
CD9 (tetraspan)	Zuk <i>et al.</i> , 2002; Guilak <i>et al.</i> , 2006; Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; Strem <i>et al.</i> , 2005	CD 11b	Aust <i>et al.</i> , 2004
CD10 (CALLA)	Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Aust <i>et al.</i> , 2004 ; Strem <i>et al.</i> , 2005	<b>CD14</b>	Minguell <i>et al.</i> , 2001 ; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Lee <i>et al.</i> , 2004
CD 11 (α-integrin)	Barry y Murphy <i>et al.</i> , 2004	CD18(Integrina β2)	Gimble, 2003
CD13 (Aminopeptidase)	Aust <i>et al.</i> , 2004 Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; Strem <i>et al.</i> , 2005 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003	CD31	Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Strem <i>et al.</i> , 2005; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003
CD29	Gronthos <i>et al.</i> , 2001 ; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Lee <i>et al.</i> , 2004 ; Guilak <i>et al.</i> , 2006	<b>CD34 *</b>	Minguell <i>et al.</i> , 2001; Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Lee <i>et al.</i> , 2004; Strem <i>et al.</i> , 2005; Festy <i>et al.</i> , 2005
CD44	Gronthos <i>et al.</i> , 2001 ; Minguell <i>et al.</i> , 2001; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Aust <i>et al.</i> , 2004	<b>CD45 (LCA)</b>	Minguell <i>et al.</i> , 2001; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Aust <i>et al.</i> , 2004; Strem <i>et al.</i> , 2005
CD49d	Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Gronthos <i>et al.</i> , 2001 ; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003	CD50 (ICAM-3)	Minguell <i>et al.</i> , 2001
CD49e	Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Aust <i>et al.</i> , 2004	CD51*	Katz <i>et al.</i> , 2005
CD54	Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003	CD56	Zuk <i>et al.</i> , 2002
CD55	Gronthos <i>et al.</i> , 2001 ; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003	CD61 (beta3 int)*	Katz <i>et al.</i> , 2005
CD59	Gronthos <i>et al.</i> , 2001 ; Aust <i>et al.</i> , 2004 ; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003	CD62	Zuk <i>et al.</i> , 2002

Marcadores positivos	Referencias	Marcadores negativos	Referencias
CD71	Zuk <i>et al.</i> , 2002	CD80	Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Gimble, 2003; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Aust <i>et al.</i> , 2004 ; Lee <i>et al.</i> , 2004; Strem <i>et al.</i> , 2005
<b>CD73</b>	Dicker <i>et al.</i> , 2005	CD104	Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Gimble, 2003
<b>CD90</b>	Zuk <i>et al.</i> , 2002; Gimble, 2003 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Aust <i>et al.</i> , 2004; Lee <i>et al.</i> , 2004; Strem <i>et al.</i> , 2005	CD106*	Gronthos <i>et al.</i> , 2001 ; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Erickson <i>et al.</i> , 2002; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Strem <i>et al.</i> , 2005
<b>CD105</b>	Dicker <i>et al.</i> , 2005, Zuk <i>et al.</i> , 2002, Guilak <i>et al.</i> , 2006, Gronthos <i>et al.</i> , 2001, Erickson <i>et al.</i> , 2002, Strem <i>et al.</i> , 2005 ; Lee <i>et al.</i> , 2004; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003	CD133	Prentice <i>et al.</i> , 2004
CD117	Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Strem <i>et al.</i> , 2005	Factor VIII-related Antigen	Gimble, 2003
CD146	Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Zuk <i>et al.</i> , 2002; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Strem <i>et al.</i> , 2005	<b>HLA-DR</b>	Aust <i>et al.</i> , 2004 ; Barry y Murphy <i>et al.</i> , 2004
CD166	Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; Erickson <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003 ; Aust <i>et al.</i> , 2004 ; Strem <i>et al.</i> , 2005 ; Guilak <i>et al.</i> , 2006	STRO-1*	Gronthos <i>et al.</i> , 2001; Zuk <i>et al.</i> , 2002 ; De Ugarte <i>et al.</i> , 2003
ALPHA ACTINA	Minguell <i>et al.</i> , 2001		
Colágeno I	Minguell <i>et al.</i> , 2001		
Colágeno II	Minguell <i>et al.</i> , 2001		
HLA-ABC	Aust <i>et al.</i> , 2004; Barry y Murphy <i>et al.</i> , 2004		
Osteopontina	Minguell <i>et al.</i> , 2001		
Osteonectina	Gimble, 2003		
Vimentina	Minguell <i>et al.</i> , 2001		

\*Son marcadores que ya fueron descritos como positivos y negativos por autores diferentes. En negrita están señalados los considerados de mayor relevancia por el **Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee for the International Society for Cellular Therapy**.

### 1.2.2.- SUSTANCIAS BIOACTIVAS EN LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓCÍTICA

La condrogénesis está regulada por una red multifactorial de vías metabólicas. Esta red puede ser influenciada por un conjunto de citocinas, hormonas y factores de crecimiento, que tendrán un papel fundamental en el desarrollo del tejido a implantar (Risbud y Sittinger, 2002; Raghunath *et al.*, 2005). Debido a que el proceso de condrogénesis está tan interconectado con la osteogénesis, muchas de las citocinas y factores de crecimiento que inducen la diferenciación condrocítica, están, de algún modo, implicados en la diferenciación osteogénica (Mastrogiacomo *et al.*, 2001; Shea *et al.*, 2003). Tenemos, por tanto, el desafío de optimizar la combinación de las sustancias bioactivas dirigiendo la diferenciación hacia la línea condrogénica, evitando la aparición de efectos pleotrópicos no específicos, que pueden ser atribuibles a la activación de múltiples vías de señalización intracelulares (Freench y Athanasiou, 2003; Heng *et al.*, 2004; Galois *et al.*, 2005).

Cuando intentamos usar las células troncales para la reparación cartilaginosa *in vitro*, es importante el desarrollo de protocolos bien definidos y eficientes para mantener el fenotipo condrocítico o la diferenciación de las células troncales en una línea condrogénica estable (Tabla 9). Ésto puede lograrse mediante una purificación selectiva de la subpoblación diferenciada antes de su trasplante al receptor, de esta forma disminuirá la probabilidad de diferenciación espontánea de las células troncales en líneas divergentes en el lugar del trasplante, aumentando la eficacia e integración de los implantes cartilagosos (Heng *et al.*, 2004; Paratore y Sommer, 2006).

En este capítulo abordamos la influencia de las principales sustancias en la diferenciación condrocítica (Tabla 10), y su posible utilización en ingeniería del tejido cartilaginoso.

**Tabla 9-** Diferentes protocolos utilizados para la diferenciación condrogénica.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Suero/ Albúmina</b>	<b>Suplementación</b>	<b>Autores</b>	<b>Días en cultivo</b>	<b>Origen Celular</b>
DMEM	SFB (1%)	6,25 µg/ml insulina, 10ng/ml TGF- β1, 50nM ascorbato-2-fosfato	Zuk <i>et al.</i> , 2001; Tholpady <i>et al.</i> , 2003	14 días y 28 días	CTDTA
DMEM-HG	SFB (10%)	Insulina-transferrina y selenio (ITS), 0,15mM de ascorbate-2-phosphate, 100 nM Dexametasona, 10 ng/ml rh TGF- β1	Awad <i>et al.</i> , 2004; Erickson <i>et al.</i> , 2002	28 días y 30 días	CTDTA
DMEM HG	SFB (10%)	500 ng/ml BMP-6, 37,5 µg/ml ascorbato-2-fosfato, 1% Insulina-transferrina y selenio	Estes <i>et al.</i> , 2006b	7 días	CTDTA
DMEM-HG	1,25 mg/ml Albúmina sérica bovina	500 ng/ml de BMP-6, 10 ng/ml recombinante TGF- β1, 1 mM Piruvato de Sodio, 0,1mM ascorbato-2-phosphate, 100 nM dexametasona, 1%ITS	Boquest <i>et al.</i> , 2005	28 días	CTDTA
DMEM-HG	1,25 mg/ml Albúmina sérica bovina	6,25 µg/ml ITS, 5,35 Ácido Linoleico, 110 mg/L piruvato sodio, 37,5 µg/ml ascorbato-2-fosfato, 100nM dexametasona, 10ng/ml TGF-β1	Johnstone <i>et al.</i> , 1998	21 días	BCTM
DMEM-HG	1,25 mg/ml Albúmina sérica bovina	5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml ácido selénico, 0,1 µM dexametasona, 0,17 ácido ascórbico 2-fosfato, 1mM piruvato de sodio, 0,35 mM de prolina, 1,25 mg/ml BSA, 10 µg/ml TGF-β3	Winter <i>et al.</i> , 2003	14 días	CTDTA BCTM
DMEM	SFB (10%)	Transferrina, selenio y 100 ng/ml de IGF-I	Longobardi <i>et al.</i> , 2006	7 días	BCTM
DMEM	Ninguno	10 ng/ml de IGF-1, 1ng/ml de TGF- β1, 0,61 mM FGF-1,-2,-4,-5,-6,-7,-8 y -9	Praul <i>et al.</i> , 2002	65 horas	Condrocitos
DMEM	Ninguno	100 ng/ml IGF-1, 100 ng/ml BMP-7, 100 ng/ml bFGF	Loeser <i>et al.</i> , 2005	21 días	Condrocitos

**Tabla 10-** Resumen de los efectos principales de las sustancias bioactivas en la condrogénesis.

<b>Factor</b>	<b>Efecto</b>
TGF- $\beta$	Reúne los factores de crecimiento más implicados en los fenómenos de diferenciación celular.
BMP	Representan elementos favorables, no solamente para estimular la expresión del fenotipo condrocítico diferenciado, sino también por inhibir la expresión eventual de enzimas de degradación, en el biomaterial o en el tejido de soporte.
IGF-I	Aumenta la producción de proteoglicanos de forma dosis dependiente.
FGF	Efecto importante en la proliferación celular de los condrocitos, y en el mantenimiento del estado indiferenciado en células troncales durante la expansión.
bFGF	Tiene una acción particularmente interesante sobre la proliferación celular.
Insulina	Efecto anabólico y diferenciador de la condrogénesis
Ascorbato	Diferenciación condrogénica más precoz, con expresión de proteínas de la matriz
Dexametasona	Regulador de la hipertrofia y maduración condrocítica

### **Superfamilia TGF- $\beta$**

Esta superfamilia está constituida por numerosos factores de crecimiento y de diferenciación, siendo algunos de vital importancia en la condrogénesis como los factores de crecimiento y transformación beta (TGF- $\beta$ s) y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

#### **TGF- $\beta$ s**

Los TGF- $\beta$ s son factores de crecimiento peptídeos, que pertenecen a la superfamilia de los TGF- $\beta$ s, que se expresan en el cartílago, por lo menos en tres isoformas ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3) (Frazer *et al.*, 1991). Son moléculas multifuncionales, capaces de regular una gran variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento, la diferenciación, la

síntesis de matriz extracelular, la degradación, la inflamación y la reparación de los tejidos (Sporn *et al.*, 1987).

Los TGF- $\beta$ s pueden ser identificados en diversos tejidos del organismo. La expresión de TGF- $\beta$ 1 está restringida a la zona proliferativa y pre-hipertrófica del cartilago. El TGF- $\beta$ 2 se expresa en todo el cartilago de la placa de crecimiento y con más intensidad se expresa en la zona hipertrófica y mineralizada, lo mismo ocurre con el TGF- $\beta$ 3 (Horner *et al.*, 1998).

Un aspecto interesante de la superfamilia TGF- $\beta$  es la modulación de su actividad por las proteínas de la matriz extracelular como el biglicano, fibromodulina, decorina y endogлина. Estas proteínas funcionan como reguladores fisiológicos de la biodisponibilidad del TGF- $\beta$  (Hildebrand *et al.*, 1994).

Se ha demostrado que el **TGF- $\beta$ 1** estimula la producción de fibronectina y de sus receptores que, a su vez, actúan como moléculas de adhesión y activan las MAC y las caderinas (N-CAD), promoviendo la formación de las condensaciones de células pre-condrogénicas (Hall y Myaki, 1995). El ARNm de la fibronectina, aumenta 5 veces cuando se inicia la condensación (Ohya y Watanabe, 1994) y, por la estimulación de la producción de fibronectina, el TGF $\beta$ 1 facilita la iniciación de las condensaciones pre-condrogénicas, seguida de una expresión selectiva de productos específicos del cartilago. Se sabe que el TGF- $\beta$ 1, provoca un aumento del ARNm del colágeno tipo II y de los proteoglicanos, promoviendo la diferenciación cartilaginosa de las células mesenquimatosas (Kulyk *et al.*, 1989; Erickson *et al.*, 2002).

Algunos grupos aplicaron sistemas similares a los usados con las CTMs para demostrar la capacidad de las CTDTA para seguir la línea de diferenciación condrocítica. Estos sistemas utilizan cultivos en elevada densidad celular, suplementados con TGF- $\beta$ 1 para generar agregados ricos en proteoglicanos, que expresan colágeno tipo II, agrecano, decorina y otros marcadores consistentes con la condrogénesis (Zuk *et al.*, 2001; Erickson *et al.*, 2002).

Miura y Shiota en 2000, concluirán que el **TGF $\beta$ 2** actuaba como activador del desarrollo de la condrogénesis. La inyección *in vivo*, de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en la región periosteal de fémures de ratas inducen la osificación endocondral, provocando la aparición de osteocitos (van Beuningen *et al.*, 1998; Gelse *et al.*, 2001).

La adición de **TGF- $\beta$ 3** en cultivos tridimensionales de células CTMs, promueven la diferenciación condrocítica *in vitro*. Barry *et al.*, compararon los efectos de los TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 en la condrogénesis de agregados de las células CTMs. La utilización de TGF- $\beta$ 2 y - $\beta$ 3 dio lugar a una mayor producción de proteoglicanos y de colágeno II que el TGF- $\beta$ 1, se observó también, que todos los agregados a los cuales se les añadió los factores de crecimiento producen más matriz que aquellos en los que no se adicionó factores de crecimiento. El TGF- $\beta$ 3 parece no tener el mismo potencial en promover la diferenciación condrogénica en las CTDTA, que en las CTM de la médula ósea (Estes *et al.*, 2006a; Afizah *et al.*, 2007).

Más recientemente surgió la evidencia de regulación cruzada entre las cascadas de señalización activadas por el TGF- $\beta$  y la vía Wnt durante la diferenciación condrogénica (Tuli *et al.*, 2003b; Zhou *et al.*, 2004).

## **BMPs**

El nombre por el cual son denominadas estas proteínas tiene origen en el hecho de que han sido originalmente descubiertas en el hueso, a pesar de que actualmente, se conozca que están implicadas en el desarrollo de muchos tejidos, como por ejemplo: el corazón, el cartílago, el timo, el bazo y el intestino.

Hasta el momento se han identificado varios miembros de esta familia de proteínas glicosiladas, que se encuentra dividida en grupos, de acuerdo con su homología en la terminación carboxilo. Las BMP-2 y BMP-4 son las que están más relacionadas entre sí, compartiendo cerca de 92 % de la identidad de aminoácidos (Celeste *et al.*, 1990).



Una de las razones que explican la gran diversidad de los efectos observados con las BMPs, tienen que ver con la existencia de varios receptores para estas proteínas. Estos receptores transmembranarios de serina-treonina están conectados a una quinasa, y pueden ser de dos tipos I ó II (ten Dijke *et al.*, 1994; Noho *et al.*, 1995). Estudios recientes, demostraron que la activación de los receptores, sobretodo los de tipo II, por las BMPs es necesaria para el mantenimiento del fenotipo de diferenciación y para el control de la proliferación celular (Enomoto-Iwanamoto *et al.*, 1998).

Muchas BMPs, demostraron ser capaces de inducir la condrogénesis o la formación ósea, bien solas o bien en combinación con otras moléculas. Las **BMP-5** están presentes en las condensaciones mesenquimatosas antes del desarrollo cartilaginosa (King *et al.*, 1994) y las **BMP-2** y **BMP-4**, parecen tener la capacidad para desencadenar la diferenciación de células mesenquimatosas en condrocitos, inhibiendo la diferenciación miogénica (Duprez *et al.*, 1996). La **BMP-2** es capaz de aumentar la producción de colágeno tipo II y agregano en los condrocitos articulares (Grunder *et al.*, 2004).

La BMP-2 se conecta al procolágeno tipo IIA, pero no al tipo IIB. Ésto apunta hacia el papel del procolágeno tipo IIA durante la condrogénesis por modulación de la biodisponibilidad de las BMP-2 (Zhu *et al.*, 1999).

Las células troncales del tejido adiposo, parecen tener menos potencialidad para alcanzar la diferenciación condrocítica debido a una deficiencia del receptor TGF-  $\beta$ 1, que puede ser compensado por la **BMP-6** (Estes *et al.*, 2006a), ésta parece tener la capacidad de potenciar el efecto condrogénico del TGF-  $\beta$ 1. La BMP-6 induce la sobreexpresión de agregano-1 y la cadena  $\alpha$ 1 del colágeno tipo II. Parece ser un importante factor a utilizar en la ingeniería del tejido cartilaginosa.

Células transfectadas con **BMP-7** (OP-1) muestran una acelerada remodelación cartilaginosa en modelos animales (Raghunath *et al.*, 2005). La BMP-7 también parece tener influencia en la diferenciación

condrocítica, promoviendo la expresión de agrecano a los 14 días (Knippenberg *et al.*, 2006). Esta BMP es capaz de frenar procesos catabólicos inducidos por la IL-1, como la inducción de Metaloproteasas (MMP 1 y 13) y la disminución de la síntesis de proteoglicanos (Chubinskaya *et al.*, 2007; Chubinskaya y Kuettner, 2003). La BMP-7, vía señalización Small Mother Against Decapentaplegic (Smad), estimula la síntesis de las proteínas matriciales como el colágeno tipo II y agrecano (Saas *et al.*, 2006) y la acumulación de lubricina (Khalafi *et al.*, 2007).

La BMP-7 es más eficaz estimulando la síntesis de la matriz y suprime la infiltración fibroblástica (Kaps *et al.*, 2002).

El BMP -2, -4, -7 y 14 pueden estimular la diferenciación terminal hipertrófica de células condroprogenitoras derivadas del periostio (Raghunath *et al.*, 2005; Gruber *et al.*, 2001).

Uno de los problemas asociados con la adición de las BMP, es que estimula la producción de marcadores específicos de hipertrofia de los condrocitos (Chimal-Monroy *et al.*, 2003). Por su parte, el TGF-  $\beta$ 1 está asociado al tratamiento con BMP-2, ésto lleva a la formación de una MEC abundante y una inhibición de la hipertrofia.

Los **factores de crecimiento y diferenciación tipo 5, 6 y 7** (GDF -5,-6 y 7), son miembros de la misma superfamilia de las BMPs y están implicados en la condrogénesis. El GDF-5 presenta una expresión escasa en el pericondrio, sin embargo, tiene una manifestación elevada en las extremidades cartilagosas, donde en el futuro se formarán las articulaciones (Storm y Kingley, 1999; Pacifi *et al.*, 2005). El GDF-5 asociado al TGF- $\beta$ 1 mejora la diferenciación de las CTM en condrocitos (Bai *et al.*, 2004). La presencia de TGF- $\beta$ 3 lleva a mejorar la reparación de defectos cartilagosos articulares con células CTM transfectadas con el gen de GDF-5 (Katayama *et al.*, 2004). El GDF-5 estimula la producción de agrecano y glicosaminoglicanos *in vitro* e *in vivo* (Hotten *et al.*, 1996).

### **Factor de crecimiento tipo insulina (IGF)**

Los **IGF-I y -II** son polipéptidos hormonales de cadena sencilla que intervienen en la proliferación y diferenciación celular. Sus efectos mitogénicos parecen estar regulados por el receptor IGF tipo I. En los fluidos extracelulares, los IGFs se presentan unidos a sus proteínas de conexión (**IGFBPs**), que modulan su acción (Jones y Clemmons, 1995). Varios trabajos evidencian que estos factores, sus receptores y las IGFBPs se expresan en los condrocitos y por vía autocrina/paracrina regulan la proliferación de estas células, considerándose el mayor factor anabólico que existe en el cartílago adulto (McQuillan *et al.*, 1986; Kleffens *et al.*, 1999; Fukumoto *et al.*, 2003).

Mcqueeny y Dealy, en 2001, observaron que existe una co-expresión entre el IGF-I y la IGFBP2 en el núcleo central de las condensaciones formadas en el inicio de la condrogénesis, pensándose que tiene un papel importante en la formación inicial de las condensaciones pre-condrogénicas de los miembros. En el mismo trabajo, se obtuvieron resultados *in vitro* consistentes con el papel de regulación de la condrogénesis por parte del IGF-I, verificándose que por la administración de este factor de forma exógena se promovía la diferenciación condrogénica y la síntesis de matriz. Sin embargo, la expresión de la IGFBP2 inhibe la diferenciación condrogénica y la síntesis de matriz en cultivos en micromasa. La co-expresión del IGF-I y de la IGFBP2 en condensaciones pre-cartilaginosas y en condrocitos recién diferenciados, parece tener efectos estimuladores (IGF-I) e inhibidores (IGFBP2), regulando, de esta forma, la diferenciación (Mcqueeny y Dealy, 2001; Fukumoto *et al.*, 2003).

La IGF-I modula la condrogénesis de las CTM, estimulando la proliferación, regulando la apoptosis celular e induciendo la expresión de marcadores condrocíticos. Este factor tiene un efecto sinérgico con elementos de la familia TGF- $\beta$ , en la condrogénesis de las células progenitoras (Fukumoto *et al.*, 2003; Longobardi *et al.*, 2006).

Las IGFBPs son las responsables de la difusión de la IGF en el cartílago, ya que regulan el transporte y disponibilidad de IGF-I en los condrocitos, contribuyendo en sus actividades paracrinas (Bhakta *et al.*, 2000). El conjunto IGFBP3/IGF-I se acumula cada vez más con la edad en la matriz territorial del cartílago por la conexión a la fibronectina (Martin y Buckwalter, 2000). Esta conexión aumenta la actividad inhibitoria de la IGFBP3 (Bhakta *et al.*, 2000).

Estudios inmunomorfológicos detectaron la presencia de grandes cantidades de IGF-II en el esclerotomo, miotomo, condensaciones mesenquimatosas y en el cartílago en desarrollo, cualquiera que fuese su origen. A medida que los condrocitos se diferenciaban, la expresión de IGF-II disminuía en el lugar de la diferenciación, manteniendo sin embargo, su expresión en el pericondrio (Beck *et al.*, 1987; Kleffens *et al.*, 1999).

### **Factor Básico de Crecimiento Fibroblástico (bFGF)**

El bFGF es un agente mitogénico que estimula la proliferación de los condrocitos. El bFGF favorece la confluencia de condrocitos de conejo y la síntesis de una MEC cartilaginosa *in vitro*. El bFGF puede producir, igualmente un factor inhibidor sobre la diferenciación terminal de los condrocitos y sobre la osificación (Kato y Iwamoto, 1990; Loeser *et al.*, 2005).

También se demostró que el bFGF conduce a la síntesis de varias proteínas condrocíticas incluyendo las metaloproteinasas -1 y 3, las inhibidoras tisulares de las metaloproteinasas-1 y la glicoproteína 38, sugiriendo que este factor tiene un papel importante en la remodelación cartilaginosa (Vincent *et al.*, 2002).

### **FGF**

La familia de los FGF está constituida por lo menos por 22 miembros, que interaccionan con al menos cinco receptores (FGFR)

(Issa-Abu *et al.*, 2002). Los FGF (-2, -4, -8, -9,-10 y -18) y los receptores (FGFR -1,-2 y -3) coordinan el crecimiento y desarrollo de los huesos largos (Ornitz, 2005). El FGF-2-4-9 estimulan intensamente la proliferación de los condrocitos, los FGF-6 y -8 estimulan en menor grado que el anterior la proliferación (Praul *et al.*, 2002).

Los FGF conectan pequeños proteoglicanos de heparán sulfato a la MEC, concretamente el perlecano. El perlecano tiene una expresión relevante en los condrocitos, y produce un incremento de la conexión de las células al FGF (Mongiat *et al.*, 2001).

El **FGF-2** es un agente mitótico de los condrocitos articulares y se almacena en la MEC del cartilago adulto. Tras una lesión cartilaginosa se libera el FGF-2, el cual va a participar en la remodelación de la MEC lesionada (Vincent *et al.*, 2002). Sin embargo, en dosis elevadas puede inhibir la actividad anabólica de la IGF-1 y de la BMP-7 en condrocitos (Loeser *et al.*, 2005). El FGF-2 además de favorecer la proliferación de los condrocitos humanos también favorece el inicio del proceso de desdiferenciación en células en monocapa. Por otro lado, los condrocitos implantados sobreexpresan FGF-2 e implantados en un defecto cartilaginoso mejoran la reparación al estimular la condrogénesis (Kaul *et al.*, 2006).

FGF-2 tiene también un papel en la condrogénesis, induciendo la proliferación de las CTM, y promoviendo el mantenimiento de la capacidad de multipotencia (Raghunath *et al.*, 2005).

Los **FGF-9 y 18** incrementan la síntesis matricial de los condrocitos maduros (Ellsworth *et al.*, 2002), y el FGF-18 demostró favorecer la reparación en un modelo de ratas artrósicas (Moore *et al.*, 2005). Estos dos FGF pueden ser considerados candidatos interesantes para promover la reparación del cartilago.

Los condrocitos expresan FGF-1 y -2, y los receptores del factor de crecimiento fibroblástico -2 y -3. Mancilla *et al.*, en 1998, describieron los siguientes efectos del FGF-2 en la diferenciación de los condrocitos: disminución de la proliferación de la placa de crecimiento,

disminución de la hipertrofia celular y, en elevadas concentraciones, disminución de la producción de la matriz cartilaginosa.

En un estudio realizado por Minina *et al.*, en 2002, demostraron que la manifestación del FGF, tiene una función inhibidora sobre la proliferación condrocítica, en la expresión de la Ihh y en el proceso de diferenciación hipertrófica. En el mismo estudio, se concluyó también que el equilibrio entre los FGFs y las BMPs, ajusta el ritmo de la tasa de proliferación y del proceso de diferenciación de los condrocitos.

### **Insulina**

La insulina es un péptido hormonal con un peso molecular aproximadamente de 6000 kDa, desempeñando un papel importante en la condrogénesis (Banks *et al.*, 1992; Stevens *et al.*, 1981; Stevens *et al.*, 1983). La identificación de la insulina y receptores de la insulina en el embrión de pollo 48 horas después de la fertilización, lleva a la conclusión, que en las concentraciones fisiológicas, la insulina puede actuar como mitogénico para determinados tipos celulares fetales (De Pablo *et al.* 1982; Bassas *et al.*, 1985). A bajas concentraciones, la insulina aumenta los parámetros de crecimiento, metabolismo y diferenciación muscular en embriones de pollo (Girbau *et al.*, 1987). La insulina demostró tener *in vitro* un efecto estimulante en la proliferación condrocítica y efecto en la actividad *in vivo* de la placa de crecimiento.

Los receptores de la insulina y de la IGF-I tienen estructuras heterodiméricas  $\alpha_2\beta_2$  similares y presentan una gran homología para el receptor de la tirosina quinasa (Ullrich y Schlessinger, 1990). A pesar de las similitudes entre los receptores, los efectos biológicos de estas dos moléculas varían mucho (Milasincic *et al.*, 1996). El efecto fisiológico de la insulina en los condrocitos es de difícil análisis debido a la presencia simultánea de receptores para la insulina (IR), receptores para el IGF-I (IGF-IR) y receptores híbridos IR y IGF-IR. Además, la insulina y la IGF-I pueden unirse a los receptores de cada uno, aunque con menos afinidades que a sus propios receptores (Steele-Perkins *et al.*, 1988).

Se observó que los condrocitos embrionarios de pollo, cuando se someten a 60 ng/ml de insulina mantienen su potencial proliferativo, pero no se transforman en hipertróficos, sugiriendo que la insulina puede afectar la regulación de la maduración e hipertrofia (Torres *et al.*, 2003).

La línea celular ATDC5 es una línea condrogénica bien caracterizada, que se utiliza regularmente para la diferenciación en condrocitos por exposición de las células a elevadas concentraciones de insulina (10 µg/ml) (Atsumi *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 2008). Phornphutkul *et al.*, en 2006 observaron que la exposición de ATDC5 a la insulina a concentraciones 10 a 50 nM, producían la estimulación de la diferenciación, medida por la expresión de colágeno tipo X y azul de Alcian. A estas concentraciones, la insulina activa solamente los IR, siendo que los efectos proliferativos son menos intensos que los obtenidos por la IGF, pero parece ser más selectivo como agente diferenciador.

### **Dexametasona**

Los glucocorticoides (GCs) se utilizan como drogas anti-inflamatorias. Durante su uso en la práctica clínica, pacientes que toman GCs, sufren frecuentemente efectos secundarios incluyendo retraso del crecimiento en niños y adolescentes y baja calidad del hueso formado en adultos. A nivel fisiológico, los GCs están implicados en la regulación de la condrogénesis y diferenciación osteoblástica, así como en el mantenimiento de la homeostasis en el cartílago y hueso. Para mimetizar los efectos de los GCs se utiliza *in vitro* un glucocorticoide sintético, denominado dexametasona (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005). Se identificó también el receptor del glucocorticoide (GR), que tiene un potencial regulador de la hipertrofia condrocítica en cultivo en micromasa, permitiendo la maduración de los condrocitos (James *et al.*, 2007).

## **Ascorbato**

El l-enantiómero del ácido ascórbico es la vitamina C, y su nombre deriva de su capacidad para prevenir y tratar el escorbuto.

Se ha demostrado que el ascorbato causa un aumento en la actividad fosfatasa alcalina y la expresión de colágeno tipo X, en los condrocitos de pollo (Farquharson *et al.*, 1995; Habuchi *et al.*, 1985; Sullivan *et al.*, 1994). La capacidad del ascorbato para estimular la diferenciación condrocítica precoz y tardía está relacionada con ser requerido como cofactor por las prolil y lisil hidroxilasas, que tienen un papel importante en la síntesis y secreción del colágeno (Franceschi, 1992).

La adición de ascorbato a la línea celular ATDC5, produjo el acortamiento de la fase proliferativa pre-condrogénica, produciendo una diferenciación condrogénica más precoz, aumentando la expresión génica de proteínas de la matriz y la hipertrofia de los condrocitos, lo cual conlleva una menor necesidad de tiempo de cultivo y cambio de medio (Altaf *et al.*, 2006).



### 1.2.3.- MATRICES UTILIZADAS EN INGENIERÍA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO

Se han utilizado una gran variedad de matrices en estudios de ingeniería del tejido cartilaginoso tanto *in vitro* como *in vivo*. Es crucial que las matrices sean producidas a partir de un material biocompatible que permita la adhesión de las células, secreción de matrices extracelulares y formación de tejidos sin la inducción de una respuesta inflamatoria o tóxica (Chapekar, 2000; Middleton y Tipton, 2000; Temenoff y Mikos 2000b; Agrawal y Ray, 2001).

Un buen biomaterial debe tener como propiedades fundamentales: porosidad de acuerdo con la célula a implantar (de forma que favorezca la migración celular), funcionar como transportador (alojamiento y liberación de sustancias de señalización), permitir la adhesión celular, buenas propiedades biomecánicas, biodegradabilidad (para permitir la remodelación fisiológica) y estabilidad del volumen (Raghunath *et al.*, 2007).

La sustancia transportadora celular ideal es aquella que mimetice con más intensidad el medio natural de la matriz del cartílago articular. Se ha demostrado que los componentes específicos de la MEC, como el colágeno tipo II y los glicosaminoglicanos (GAG) tienen un papel importante en la regulación de la expresión del fenotipo condrocítico y estimular la condrogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (Mizuno *et al.*, 2001; Derfoul *et al.*, 2007).

El biomaterial utilizado debe ser fácilmente procesado en su estructura, forma requerida y que resista los procesos de esterilización (Middleton y Tipton, 2000; Temenoff y Mikos 2000a, Ishaug-Riley *et al.* 1999). Finalmente, es importante que el biomaterial tenga propiedades mecánicas que permitan una buena implantación y experimentos de carga *in vivo* (Chapekar, 2000, Agrawal y Ray, 2001; Kuo y Ma, 2001).

Los biomateriales pueden ser categorizados con respecto al tipo de material usado (natural o sintético, degradable o no degradable) y configuración del biomaterial (matrices tridimensionales, hidrogeles y

micronanopartículas y compuesto de liberación lenta) (Vunjak-Novakovic, 2003).

### **1.2.3.1.- Tipo de biomaterial**

Se han probado diferentes tipos de matriz *in vitro*, en animales de experimentación y en pacientes humanos, por su eficacia en facilitar o promover la reparación (Tabla 11).

#### **1.2.3.1.1.- Polímeros naturales**

Se han investigado una gran variedad de polímeros naturales debido a su similitud con varios componentes de la MEC, como por ejemplo el hialurónico (Brun *et al.*, 1999, Lindenhayn *et al.*, 1999) y el colágeno (Fujisato *et al.*, 1996; Uchio *et al.*, 2000). Otros materiales naturales usados en ingeniería de tejido cartilaginoso incluyen agarosa (Saris *et al.*, 2000), alginato (Fragonas *et al.*, 2000) y citosano (Suh y Mathew, 2000). Estos polímeros naturales tienen muchas ventajas para las aplicaciones de ingeniería de tejidos, porque pueden intervenir en interacciones celulares específicas (Grande *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso de materiales naturales está limitado por una variación entre lotes, falta de grandes stocks para el uso comercial, y como normalmente son derivados de tejidos no humanos, acarrean el riesgo de transmisión de zoonosis (Marler *et al.*, 1998; Temenoff y Mikos, 2000 b).

**Tabla 11-** Tipos de matrices utilizadas en ingeniería de tejidos de cartilago. Adaptado de Vinatier, 2007

<b>Tipo de biomaterial</b>		<b>Referencias</b>	
<b>Naturales</b>	<b>Matrices a base de proteínas</b>	Colágeno	Wakitani <i>et al.</i> , 1989; Ochi <i>et al.</i> , 2002; Kuroda <i>et al.</i> , 2007
		Gelatina	Chang <i>et al.</i> , 2004; Fan <i>et al.</i> , 2006
		Fibrina	Hendrickson <i>et al.</i> , 1994; Sims <i>et al.</i> , 1998, van Susante <i>et al.</i> , 1999
		Laminina (Matrigel®)	Bradham <i>et al.</i> , 1995, Bulic <i>et al.</i> , 1996
	<b>Matrices a base de polisacárido</b>	Agarosa	Awad <i>et al.</i> , 2004; Rahfoth <i>et al.</i> , 1998
		Alginato	Almqvist <i>et al.</i> , 2001; Fragonas <i>et al.</i> , 2000
		Ácido hialurónico	Facchini <i>et al.</i> , 2006
		Citosano	Montebault <i>et al.</i> , 2006
		Celulosa	Müller <i>et al.</i> , 2006; Taguchi <i>et al.</i> , 2005
<b>Sintéticos</b>	<b>Biodegradables</b>	Ácido poliglicólico	Douchis <i>et al.</i> , 2000; Yan y Yu, 2007
		Ácido poliláctico	Freed <i>et al.</i> , 1994a
		Poliesteruretano	Grad <i>et al.</i> , 2003
		Ácido Polibutírico	Kose <i>et al.</i> , 2005
		Fosfato de calcio	Chang <i>et al.</i> 2004; Huang <i>et al.</i> , 2007; Müller <i>et al.</i> , 2006
	<b>No-Biodegradables</b>	Fibras de carbono	Carranza-Bencano <i>et al.</i> , 2000; Atik <i>et al.</i> , 2005
		Dacron ®	Messner, 1993; Messner <i>et al.</i> , 1993
		Téflon ®	Messner, 1994; Messner y Gillquist, 1993
	Polyetilenometacrilato	Estrada <i>et al.</i> , 2001	

## *A. Matrices basadas en proteínas*

### *Colágeno*

Las matrices o esponjas de colágeno, son probablemente, las matrices más usadas en ingeniería del cartilago, siendo utilizadas experimentalmente desde hace más de 20 años (Wakitani *et al.*, 1989; Schuman *et al.*, 1995). Los colágenos tipo I y II son los más habituales para la construcción de los biomateriales. Su degradación puede ser controlada por las células presentes en los tejidos (Drury y Money, 2003).

Una de las grandes ventajas de este biomaterial es que sus productos de degradación son fisiológicos y, por lo tanto, no tóxicos, siendo las principales desventajas para el uso clínico de este biomaterial su inmunogenicidad y seguridad (McCoy *et al.*, 1985; Schuman *et al.*, 1995; Ochi *et al.*, 2002).

Para intentar resolver el problema de la inmunogenicidad algunos autores han utilizado el atelocolagéno (colágeno al que se le han eliminado los determinantes antigénicos) (Ochi *et al.*, 2002).

El colágeno también se ha utilizado en estudios *in vivo*, implantados con condrocitos (Ochi *et al.*, 2002) o con BMSC (Kuroda *et al.*, 2007), estos estudios tuvieron resultados prometedores permitiendo la restauración del cartilago articular de la rodilla.

### *Gelatina*

Las matrices compuestas de gelatina, que son básicamente colágeno desnaturalizado, fueron utilizados *in vitro* para el cultivo de condrocitos (Chang *et al.*, 2004) y de células troncales para la reparación de defectos del cartilago articular en conejos (Ponticiello *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2006). Existe una gelatina obtenida a partir de piel de cerdo (Gelfoam®), que cuando fue implantada en la rodilla de conejo

demonstró ser biocompatible, sin evidencia de respuesta inmune, o infiltración linfocítica por parte del receptor (Ponticiello *et al.*, 2000).

### *Fibrina*

El fibrinógeno y su forma polimerizada, la fibrina, son componentes del espacio intravascular. Como polímero, el fibrinógeno existe fisiológicamente en estado líquido en la corriente sanguínea, su polimerización se activa en las situaciones de lesión vascular y otras situaciones patológicas. La fibrina se ha utilizado ampliamente, no sólo como soporte sino también como transportador para las células y factores de crecimiento, no siendo tóxicos sus productos de degradación.

La adhesión de la fibrina se consigue *in vitro* por polimerización del fibrinógeno en presencia de trombina (Sims *et al.*, 1998).

Algunos investigadores utilizaron la fibrina como matrices para reparar el cartílago articular (Fussenegger *et al.*, 2003; Patwari *et al.*, 2003, van Susante *et al.*, 1999). La adhesión de fibrina, fue también utilizada como soporte de condrocitos en la reparación de defectos cartilagosos en caballos. Esto permite la formación de un tejido cartilaginoso de tipo hialino, presentando un elevado contenido en proteoglicanos y colágeno tipo II.

La fibrina se utiliza también para implantar las CSM de médula ósea en defectos cartilagosos del caballo. Pero debido a las concentraciones elevadas (no fisiológicas) y la alta densidad impiden, en lugar de facilitar, la invasión celular, no soportando la reparación (Wilke *et al.*, 2007).

Las matrices fibrina-CS mimetizan la matriz extracelular del cartílago nativo, teniendo la capacidad para promover la diferenciación de las CTDTA en condrocitos (Wei *et al.*, 2007a).

*B. Matrices basadas en carbohidratos*

Los polisacáridos forman una clase de biomateriales, que han sido infrutilizados en el campo de los biomateriales. Sin embargo, el reconocimiento de la potencial utilidad de esta clase de biomateriales está aumentando.

La **agarosa** es un polisacárido que contiene residuos de L y D-galactosa, es aislado y purificado a partir de ciertas algas asiáticas. Su importancia como matriz para el cultivo de condrocitos, tiene que ver con el hecho descrito en 1970, por Horwitz y Dorfman de tener la capacidad de diferenciarse y mantener el fenotipo condrocítico.

El hecho de ser una materia inerte llevó a que la agarosa haya sido muy utilizada en el estudio de las actividades fisiológicas de los condrocitos *in vitro* (Awad *et al.*, 2004). Si este polisacárido es implantado sólo inhibe la reparación espontánea. Su escasa biodegradabilidad (debido a la ausencia de los sistemas enzimáticos de degradación en los tejidos de los mamíferos), hace que sea un candidato no muy atractivo para los estudios de reparación *in vivo*.

El **alginato** es un carbohidrato gelatinoso, compuesto esencialmente por ácido D-manúrico y L-Glucorónico, que puede aislarse y purificarse a partir de las algas castañas. Su polimerización depende de la presencia de iones de calcio, y la red resultante está influenciada por su contenido en ácido glurónico. *In vivo*, el alginato no sufre una degradación específica, pero sí una lenta disolución (Drury y Money, 2003). Es un polímero que favorece la condrogénesis y el mantenimiento del fenotipo condrocítico en sistemas de cultivo tridimensional (Genes *et al.*, 2004; Bonaventure *et al.*, 1994; Carossino *et al.*, 2007). El alginato demostró ser útil en la rediferenciación de los condrocitos desdiferenciados, conduciendo a la síntesis de proteínas de la matriz (Almqvist *et al.*, 2001).

El **ácido hialurónico** es un componente fisiológico de la matriz del cartílago. Conforman macromoléculas con pesos moleculares que son perfectamente biocompatibles y biodegradables. En teoría, el ácido hialurónico será la matriz ideal para soportar la reparación cartilaginosa, si se implanta en la forma no modificada. Sin embargo, para alcanzar las propiedades físico-químicas y la organización estructural, habitualmente se mezcla por esterificación con otros medios. Como resultado, su biocompatibilidad queda comprometida.

Matrices compuestas únicamente por ácido hialurónico al ser aplicadas no mejoraron las respuestas espontáneas, pero se usan frecuentemente como transportadores para los condrocitos o células troncales derivadas de médula ósea. Las matrices de ácido hialurónico sembradas con células demostraron permitir la deposición de matriz extracelular cartilaginosa (Naumann *et al.*, 2003), y parece ocurrir lo mismo *in vivo*.

Estas construcciones demostraron tener también capacidad de soportar los procesos de diferenciación celular. Sin embargo, la degradación del hialuronato puede dar lugar a condrolisis dentro de ciertas condiciones.

Estas matrices asociadas a los condrocitos son capaces de aumentar la formación de MEC cartilaginosas *in vitro* e *in vivo* (Tognana *et al.*, 2005). El ácido hialurónico puede, igualmente, estar asociado a otras matrices, un tripolímero de gelatina/condroitín sulfato/ácido hialurónico permitió el mantenimiento del fenotipo condrocítico y la síntesis de colágeno II *in vitro* (Chou *et al.*, 2007). Un estudio clínico con 141 pacientes con 3 años de seguimiento, obtuvo buenos resultados (Marcacci *et al.*, 2005). Otro estudio realizado con el Hyalograft (Fidia Advanced Biopolymers, Italia), que asocia condrocitos autólogos e implantados sobre defectos osteocondrales, ha permitido mejorar la función articular en los 8 pacientes tratados (Podskubka *et al.*, 2006). Después de 1 año, 7 de los pacientes presentaban un tejido mixto compuesto de fibrocartilago y de cartilago hialino, solamente uno presentó un tejido naturalmente hialino.

El **chitosano** es un derivado de la quitina, que puede ser encontrado en el exoesqueleto de los artrópodos. Estructuralmente es un polisacárido lineal, formado por D-glucosamina y N-acetilglucosamina, teniendo varias similitudes estructurales con los GAGs y el ácido hialurónico, presentes en el cartílago articular. Diversos estudios realizados *in vitro*, evidencian el valor potencial en la reparación cartilaginosa, y como transportador de factores de crecimiento. Parece tener un potencial bastante aceptable y prometedor con fines de utilización en la ingeniería del cartílago (Suh y Matthew, 2000).

La **celulosa** es un polímero semi-cristalino de glucosa de fórmula general  $(C_6 H_{10} O_5)_n$ , pudiendo ser n un valor comprendido entre 500 a 5.000 residuos. Es el polímero natural que se encuentra con mayor frecuencia en la naturaleza, podemos encontrarlo en la forma semi-cristalina en los vegetales, como es el caso del algodón o en la madera. La celulosa se degrada por enzimas, las celulasas, y su solubilidad en el agua depende del tamaño de su cadena (Müller *et al.*, 2006). La biocompatibilidad de la celulosa y de sus derivados está bien establecida (Martson *et al.*, 1998). La celulosa y sus derivados se impregnan sobre las membranas o geles adhesivos (Andrews *et al.*, 2005).

La celulosa se utilizó también en ingeniería del tejido cartilaginosa y se probó la celulosa bacteriana, que permite la proliferación de condrocitos funcionales (Svensson *et al.*, 2005). Mediante estudios *in vitro*, se descubrió un polímero con base de celulosa que permitía una buena proliferación de condrocitos y demostró una buena biocompatibilidad (Müller *et al.*, 2006). Sin embargo, no se han realizado suficientes estudios *in vivo* dirigidos a controlar la reparación cartilaginosa.



### **1.2.3.1.2.- Polímeros sintéticos**

Los polímeros sintéticos se usan con preferencia frente a los materiales naturales, por ser posible producirlos en grandes cantidades con propiedades estandarizadas. Los biomateriales basados en polímeros sintéticos biodegradables incluyen el ácido poliglicólico (PGA) (Douchis *et al.*, 2000; Yan y Yu, 2007), ácido poliláctico (PLA) (Freed *et al.*, 1994a), policaprolactona (PCL) (Oh *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007), poliuretano (Grad *et al.*, 2003), ácido polibutírico (Kose *et al.*, 2005), fosfato de calcio (Nehrer *et al.*, 1998, Freed *et al.*, 1999; Wyre y Downes, 2000). Varios investigadores también utilizaron con cierto éxito algunos polímeros no-biodegradables, como el Dacron (polietileno tereftalato-PET) (Neves *et al.*, 2005), Teflón (politetrafluoretileno-PTFE) (Springer *et al.*, 2001), polimetilmetacrilato (Arévalo-Silva *et al.*, 2000), hidroxiapatita, fibras de poliéster, que también facilitan la regeneración de la superficie articular. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder evaluar objetivamente sus méritos en comparación con otros biomateriales.

El perfil de degradación de los polímeros sintéticos puede controlarse de tal forma que coincida con la tasa en que el tejido normal se desarrolla, asegurando que la integridad estructural de la construcción se mantiene por la regeneración tisular (Woodfield *et al.*, 2002). Además, es posible incorporar factores de crecimiento biológicamente activos que faciliten respuestas celulares específicas, por ejemplo la diferenciación (Whitaker *et al.*, 2001).

#### **A. Biodegradables**

##### *Ácido Poliláctico y Poliglicólico*

El ácido poliláctico y el ácido poliglicólico, son poliésteres alifáticos que pertenecen a un grupo alfa-hidroxi (Agrawal y Ray, 2001). Estos polímeros fueron originalmente elaborados para ser utilizados como materiales de suturas (DEXON®), pero desde hace más de dos

décadas se está estudiando su potencial valor en la reparación cartilaginosa (Temenoff y Mikos, 2000a). Se han estudiado intensamente distintas modificaciones estructurales en estos polímeros, dando origen a redes formadas por finas fibrillas utilizables en ingeniería de tejidos. En la ingeniería de tejidos de cartilago, son bastante utilizados el PGA, PLLA y el copolímero PGA-PLLA, debido a su eficacia como transportadores de condrocitos *in vivo* e *in vitro* (Banu *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2006). Las estructuras químicas del PLA y del PGA son similares, excepto que el PLA tiene un grupo metil, contribuyendo esta característica a producir diferentes cinéticas de degradación de los dos biomateriales (Agrawal y Ray, 2001). Uno de los grandes atractivos de este polímero para aplicaciones biomédicas, es que el producto de degradación del ácido poliglicólico es un metabolito natural del organismo (Gunatillake y Adhikari, 2003).

En muchos estudios *in vitro* se han utilizado estos polímeros con la perspectiva de una posible aplicación futura en la ingeniería de tejidos del cartílago, siendo utilizadas para estos propósitos, células del pericondrio, condrocitos, células de la sinovia y células troncales (Vunjak-Novakovic *et al.*, 1999).

En la mayor parte de estos trabajos se estudió la influencia de las propiedades de los polímeros, su geometría y varios parámetros celulares. Aunque se haya probado con un éxito relativo en modelos animales, preferentemente en conejos, su aplicación en seres humanos, está todavía limitada porque inducen la producción de células gigantes y encapsulación del cuerpo extraño y el substrato del polímero sufre actividad hidrolítica, que da lugar a productos tóxicos (parcialmente citotóxicos) y productos de degradación (Unsworth, 2004).

## **B.No Biodegradables**

### *Fibras de carbono*

Desde hace más de dos décadas se vienen utilizando en ingeniería ortopédica, mallas compuestas por fibras de carbono. Aunque químicamente inerte, estas fibras pueden transportar material no biológico, extraño a los tejidos animales. De esta forma, no es sorprendente que al ser utilizada para la reparación cartilaginosa, presente reacciones de cuerpo extraño, reacciones celulares y respuestas inmunológicas. Estas actividades adversas pueden extenderse a la sinovia, donde producen sinovitis (Atik *et al.*, 2005).

Las mallas de fibras de carbono se aplicaron en diversos animales de laboratorio, como conejos y cobayas, con la intención de expandir y realizar la extensión a defectos profundos del cartilago articular. Los datos aportados revelan que la respuesta de regeneración, lleva a un mayor volumen de relleno, sin embargo se produce una disminución en la calidad del tejido producido (Carranza-Bencano *et al.*, 2000).

### Dacron y Teflón

Se han aplicado mallas compuestas por Dacron (polietilenotereftalato) o Teflón (politetrafluoroetileno), en modelos de experimentación animal, para observar el potencial de estos materiales en la regeneración. Se vió un aumento del tejido producido, pero no de la calidad del tejido (Messner, 1993; Messner, 1994).

### **1.2.3.2.- Configuración de un biomaterial**

La arquitectura de un biomaterial, define la forma final que tendrán los nuevos tejidos reparados. La morfología tridimensional facilita de una forma más eficaz la retención, infiltración, adhesión, proliferación y diferenciación celular (Schaefer *et al.*, 2000; Sherwood *et*

*al.*, 2002). En este capítulo nos centraremos en las distintas configuraciones que pueden tener los biomateriales, concretamente: matrices tridimensionales porosas, hidrogeles, micropartículas y compuestos de liberación controlada.

### **1.2.3.2.1.- Matrices tridimensionales porosas**

Las matrices porosas tridimensionales se utilizan en técnicas de ingeniería de tejidos para facilitar la adhesión y la subsiguiente formación de tejido tanto *in vitro* como *in vivo*. Para que permitan que las células se infiltren uniformemente en la estructura, deben contener un gran número de poros interconectados (Chapekar, 2000; Kuo y Ma, 2001).

El tamaño del poro es importante para permitir la infiltración y la adhesión de las células. Para los condrocitos se ha sugerido que el tamaño óptimo de poro será entre los 100 y 200  $\mu\text{m}$  (Agrawal y Ray, 2001). El biomaterial también debe ser permeable, para permitir la difusión de nutrientes en la matriz y la eliminación de los productos de degradación y metabolismo (LeBaron y Athanasiou, 2000).

En el caso particular de los cultivos tridimensionales de condrocitos éstos pueden prevenir la desdiferenciación, normalmente estos cultivos eran inducidos en sistemas de cultivo en dos dimensiones (Schnabel *et al.*, 2002).

Muchos investigadores desarrollaron técnicas de fabricación de matrices tridimensionales con elevada porosidad y área de superficie, incluyendo tecnologías textiles, *solvent casting*, *particulate leaching*, *membrana lamination*, *melt molding*, *rapid phototyping*, *three-dimensional printing*, y *fused deposition molding*. Por ejemplo, Xie *et al.*, en 2006 recoge en sus trabajos el cultivo de condrocitos en un molde 3D bajo una fuerza mecánica compresiva, que estimulaba significativamente la regeneración del tejido cartilaginoso. Además de éstos datos, las matrices tridimensionales pueden tener un papel útil como transportadores para suministrar factores de crecimiento como

BMP y TGF- $\beta$ , que pueden ser liberados de forma controlada y seguidamente estimular la diferenciación condrogénica para lograr la regeneración cartilaginosa tisular, hasta que las matrices estén completamente degradadas (Guo *et al.*, 2006).

#### **1.2.3.2.2.- Hidrogeles**

Los hidrogeles son redes elásticas porosas tridimensionales y pueden absorber hasta un 90 % de agua, que les permite soportar y transmitir cargas, presentándose como un material atractivo para aplicaciones biomédicas e ingeniería de tejidos. Los hidrogeles tienen propiedades lubricantes, bajos coeficientes de fricción y una elevada fuerza mecánica (Spiller *et al.*, 2008).

Los hidrogeles inyectables son candidatos muy atractivos, para ciertas aplicaciones de ingeniería de tejidos debido a su capacidad para rellenar defectos irregulares, permitiendo procedimientos mínimamente invasivos como cirugías artroscópicas, con fácil incorporación de células y agentes bioactivos (Kuo y Ma, 2001; Mann *et al.*, 2001).

Se han desarrollado varias técnicas para introducir macroporosidad en hidrogeles como: *poragen extraction*, *phase separation*, *foaming* y *rapid prototyping* y *solid free form*. El control de la porosidad y tipo de monómero son factores limitantes en este tipo de biomaterial para cualquiera de estos métodos (Karande *et al.*, 2004).

Al contrario de las matrices porosas (los condrocitos quedan adheridos a la superficie de la matriz), los hidrogeles encapsulan los condrocitos (formando el complejo hidrogel-célula) que de esta forma puede mantener el fenotipo condrocítico, sin desdiferenciación.

A pesar de la amplia aplicación de los hidrogeles, la rápida difusión de factores de crecimiento de un hidrogel puede producir problemas. Generalmente, los factores de crecimiento son moléculas suficientemente pequeñas para atravesar fácilmente la red del hidrogel y consecuentemente, difunden hacia el exterior demasiado rápido como para poder estimular las células incluidas en el hidrogel. Para evitar

este problema, frecuentemente se utilizan micro o nanopartículas cargadas de factores de crecimiento para mantener la liberación controlada y posteriormente son encapsulados en el hidrogel (Elisseeff *et al.*, 2001; Holland *et al.*, 2005; Defail *et al.*, 2006).

#### **1.2.3.2.3.- Micro o nanopartículas**

Recientemente, se ha utilizado con éxito el sistema de micropartículas (o nanopartículas) para la distribución de factores de crecimiento (Kim *et al.*, 2003a; Isogai *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005a; Weber *et al.*, 2002]. Las micropartículas pueden prepararse usando polímeros biosintéticos (PGA, PLA y PCL) o polímeros naturales (gelatina y alginato). En las micropartículas derivadas de polímeros sintéticos, los factores de crecimiento son liberados por difusión, de tal manera que la tasa de liberación puede ajustarse dependiendo de las propiedades de la matriz tales como tamaño del poro, peso molecular, cristalinidad y composición del copolímero. Weber *et al.* en 2002, demostró que un poro amplio de micropartículas de PGA puede liberar lentamente las BMP, consiguiendo una mejor regeneración del tejido *in vivo*. El uso de micropartículas de gelatina también permite una liberación sostenida del TGF- $\beta$  durante un período experimental de regeneración (28 días) (Park *et al.*, 2005a). Un gran número de trabajos relataron que la liberación lenta de factores condrogénicos, incluyendo BMPs, TGF- $\beta$ , IGF, FGF en micropartículas estimulaban más eficientemente la formación de cartílago, comparadas con medios pre-condicionados (Simmons *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2006; Maissen *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2007).

#### **1.2.3.2.4.- Compuestos que permiten la liberación controlada de factores de crecimiento**

La liberación controlada de drogas y proteínas constituyen un importante campo de investigación para la industria farmacéutica. Los

factores de crecimiento son polipéptidos que transmiten señales que modulan distintas actividades celulares (Nimni *et al.*, 1997). Para realizar su acción, cada factor de crecimiento tiene un periodo de vida media propio, requiriendo diferentes dosis y diferentes tiempos de exposición a las células (Mark y Baldwin, 1998).

Muchos trabajos, demostraron que estos factores pueden estimular la función condrocítica y, consecuentemente facilitar la regeneración cartilaginosa. En distintos trabajos, estos factores de crecimiento se inyectaban conjuntamente con células o se añadían incluídos en matrices poliméricas (Elisseff *et al.*, 1999; Giannoni y Hunziker, 2003). Sin embargo, se observó que la adición de estos factores podían producir efectos secundarios indeseados cuando eran aplicados de forma incorrecta o aparecían a nivel sistémico (van Beuningen *et al.*, 1998; van Beuningen *et al.*, 2000).

Las distintas propiedades de los factores de crecimiento, conjuntamente con los requisitos de los modelos *in vivo*, condujeron al desarrollo de estrategias de liberación controlada de factores de crecimiento por parte de las matrices. En condiciones óptimas es posible que varios factores de crecimiento sean liberados simultáneamente de la misma matriz (Sohier *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha descrito la técnica de revestimiento por emulsión, en la cual la liberación de TGF- $\beta$ 1 fue retardada desde 12 hasta más de 50 días, variando estos resultados la composición del copolímero (Sohier *et al.*, 2007).

Con el fin de mejorar la afinidad celular y la eficiencia de la administración de los factores de crecimiento para la regeneración tisular del cartílago, se han combinado polímeros naturales, incluyendo citosano, fibrina, gelatina y ácido hialurónico con polímeros sintéticos (Becker *et al.*, 2005; Prabakaran *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2006).

## **2.-OBJETIVOS**





Como venimos recogiendo en todos los antecedentes expuestos, la regeneración articular constituye un problema clínico muy importante y de difícil abordaje terapéutico. Por ello, es cada vez mayor el interés por desarrollar nuevas técnicas que reparen las lesiones del cartílago. Los tratamientos aplicados y propuestos son múltiples y variados, así como los resultados. Estudios recientes han demostrado que las células mesenquimales podrían solventar estos problemas. La bibliografía más actual demuestra el gran potencial de las células troncales adultas y sus posibles aplicaciones terapéuticas, constituyendo un modelo muy útil en aplicaciones clínicas para un gran número de enfermedades, tanto en terapia regenerativa como en terapia génica. Con el fin de avanzar en el desarrollo del campo de la ingeniería de tejidos, en este estudio nos hemos planteado una serie de objetivos bien diferenciados en tres capítulos. En el primer capítulo incluimos todo el trabajo correspondiente al estudio del comportamiento de los condrocitos adultos en cultivo. Esta parte nos sirvió de base para aplicar los conocimientos adquiridos en la diferenciación condrocítica de las células troncales adultas. Abordada, en el segundo y tercer capítulo.

A continuación enumeramos los objetivos planteados y desarrollados durante este trabajo:

1.- Caracterizar el cartílago auricular, estudiando la influencia de la matriz celular en su fenotipo diferenciado.

1.1.- Estudiar la expresión de las integrinas en cartílago auricular adulto y en cultivo.

1.2.- Estudio del comportamiento de los condrocitos en diferentes condiciones de cultivo.

2.- Cultivo y caracterización de células troncales procedentes de tejido adiposo de rata.

2.1.- Identificación de los marcadores de células troncales.

2.2.- Demostrar la multipotencia de estas células.

2.3.- Determinar la influencia de diferentes biomateriales (colágeno tipo I, ácido poliglicólico y agarosa) en el comportamiento de las células troncales del tejido adiposo.

3.- Cultivo y caracterización de células troncales derivadas del tejido adiposo del caballo (grasa infrapatelar).

3.1.-Evaluar el potencial de diferenciación condrogénica de células troncales derivadas del tejido adiposo del caballo (grasa infrapatelar).

3.2.- Determinación de la influencia de la tensión de oxígeno en la diferenciación condrocítica.

3.3.- Crear un modelo de diferenciación condrocítica hipertrófica a partir de células troncales derivadas del tejido adiposo de caballo.

## **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**



## **A.- CONDROCITOS**

### **A.1.- MATERIALES**

En el presente trabajo se ha empleado como animal de experimentación el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza New Zealand. Estos animales adultos, de entre 1,5 y 2 kg de peso, procedían del Animalario de la Universidad de León, en el cual se observan las normas establecidas en relación con la experimentación animal.

Los conejos fueron anestesiados mediante la administración intramuscular de 35-50 mg/kg de peso vivo de Ketamina (Imalgene®) y 5 mg/kg de Xilazina (Rompun®), para proceder a la recogida de cartílago elástico mediante biopsia de una muestra de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, procedente de la zona más medial de la oreja.

Una vez obtenidas las biopsias, se procedió seguidamente al aislamiento del cartílago auricular eliminando de forma completa y meticulosa la piel, el tejido conectivo subcutáneo y el pericondrio. Este proceso de limpieza se realizaba en condiciones estériles, bajo campana de flujo laminar (Telstar®) y manteniendo las muestras en PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma®), con una solución antibiótica-antimicótica (Sigma®). Finalmente, el cartílago auricular así obtenido se seccionó en pequeños fragmentos de 1-2 mm<sup>3</sup> para utilizarlos posteriormente en los cultivos celulares.

### **A.2.- CULTIVO DE CONDROCITOS**

Para el cultivo de condrocitos, se llevó a cabo la disociación de los fragmentos procedentes de las biopsias de cartílago auricular colocándolos en un frasco de cultivo con 2 mL del siguiente medio de disociación:

- Medio de cultivo DMEM (SIGMA®).
- 2 mg/mL de colagenasa tipo II-S (Sigma®).
- 2'5 mg/mL de hialuronidasa testicular tipo IV-S (Sigma®).

Después de 8 horas de disociación a 37°C, la suspensión celular resultante, que aún presentaba pequeños fragmentos no totalmente disociados, fue filtrada a través de una malla de nylon para eliminar los residuos de mayor tamaño, centrifugada para eliminar los residuos de las enzimas de disociación, y las células se resuspendieron en el siguiente medio de cultivo:

- 90% Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con l-Glutamina y 1000 mg/ml de glucosa (Sigma®)
- 10 % Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma®)
- 4 µl/ml de solución antibiótica-antimicótica (Sigma®) formulada con 10000 U.I. de penicilina G, 10 mg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B.

### **A.2.1.-Cultivo en monocapa**

Las células fueron cultivadas en monocapa hasta su confluencia, en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua y un 5% de CO<sub>2</sub>, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

Una vez alcanzada la confluencia en 1 a 2 semanas de cultivo, se llevó a cabo la tripsinización. Para ello se lavaron los frascos con PBS; a continuación se añadió una solución conteniendo 0'05 g de tripsina 1:250 (DIFCO®) y 0'02 g de EDTA (Sigma®) en 100 mL de PBS durante de 5-10 minutos a 37°C. Una vez desprendidas las células del sustrato plástico, se realizó un conteo en una cámara de conteo celular y se determinó su viabilidad mediante una tinción de exclusión con azul

Trypan (Sigma®). Posteriormente se sembraron en multiplacas de 24 pocillos, sobre portaobjetos plásticos circulares, de 13 mm de diámetro (Thermanox®). La densidad celular de la siembra realizada fue de  $2.5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>.

Además, se llevó a cabo un control diario de los cultivos mediante el microscopio de contraste de fases.

### **A.2.2.- Cultivo en agregación**

En una serie de cultivos de condrocitos aislados se cubrió la superficie de los frascos de cultivo o de las multiplacas, según el caso, con una capa de agar (2% en PBS, previamente solidificado), que impide el contacto de los condrocitos con el plástico, con el objeto de evitar que éstos se adhieran al sustrato plástico y no conformen una monocapa, obteniendo así agregados celulares de condrocitos.

Estos agregados se mantuvieron creciendo durante 3 a 4 semanas.

Sobre estos cultivos se realizaron pruebas de inmunofluorescencia indirecta para detectar colágeno tipo II; histoquímicas Hematoxilina/Eosina y para detectar la presencia de proteoglicanos y fibras elásticas.

## **A.3.- TÉCNICAS MICROSCÓPICAS**

### **A.3.1. - Técnicas de microscopía óptica**

#### **A.3.1.1.- Técnicas generales de procesamiento de las muestras para microscopía óptica**

En este caso se tomaba la biopsia del cartílago y se preparaba para su observación al microscopio óptico.



Las piezas de cartilago se fijaban en formaldehído 10 % tamponado, incluyéndolas en parafina para hacer después cortes seriados y realizar las tinciones sobre ellos.

Para observación mediante microscopía óptica, de los cortes y de las células, se realizó la tinción de fibras elásticas mediante la coloración de van Gieson y de otros componentes de la matriz extracelular con azul Alcian 8 GX (Sigma®). También se llevaron a cabo técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta, para detectar la presencia de las integrinas  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V\beta 3$  y de colágeno tipo II respectivamente.

#### **A.3.1.1.1.-Fijación**

Las técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia necesitaron previamente de fijación por paraformaldehído (Merck®):

-Disolver 16 gramos de paraformaldehído en aproximadamente 80 mL de agua destilada agitando a 70 °C (en campana de gases).

- Adicionar algunas gotas de NaOH 1N para despolimerizar el paraformaldehído. Ajustar el pH a aproximadamente 7,0 y medir con un papel de pH. Enfriar a temperatura ambiente y llevarlo a 100 mL. Filtrar con un filtro Millipore de 0'45  $\mu\text{m}$  y mezclar con la misma cantidad de tampón 2X. Dividir en alícuotas adecuadas y almacenar congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Lavar las células con PBS a temperatura ambiente.

- Fijar en 3-4% paraformaldehído en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- Lavar 3 veces durante 5 minutos cada vez con PBS.

**A.3.1.1.2.- Inclusión en parafina**

Se llevaron a cabo dos protocolos distintos conforme el tipo de material que se quería analizar. Uno para los fragmentos de cartílago auricular (Tabla 12) y otro para los agregados (Tabla 13). Los protocolos son muy similares entre sí, pero en el caso de los agregados se realizan menos pasos porque son muy frágiles y se pueden disgregar.

1. Fijar el tejido con Etanol al 70% a 4°C, durante la noche.
2. Poner el tejido en un procesador de tejidos y procesar con los siguientes tiempos y temperaturas:

**Tabla 12-** Inclusión en parafina en el caso de los fragmentos de cartilago.

Pase	Solución	Concentración	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Etanol	70%	30	40
2	Etanol	80%	30	40
3	Etanol	95%	45	40
4	Etanol	95%	45	40
5	Etanol	100%	45	40
6	Etanol	100%	45	40
7	Xileno	100%	45	40
8	Xileno	100%	45	40
9	Parafina		30	58
10	Parafina		30	58
11	Parafina		30	58
12	Parafina		30	58

**Tabla 13-** La inclusión del agregado en parafina.

Pase	Solución	Concentración	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Etanol	70%	10	40
2	Etanol	95%	10	40
3	Etanol	100%	10	40
4	Etanol	100%	10	40
5	Xilol	100%	10	40
6	Parafina	100%	20	58

3. Los cortes seriados se realizan en un criostato (Kryost 1720 Leitz®) con un grosor entre 5 y 10 micras. Los cortes útiles se recogen directamente con un portaobjetos previamente tratado con Silane. Los portas se dejan secar en una estufa durante, por lo menos, 24 horas a 37 ° C.

4. Almacenar a temperatura ambiente.

**Protocolo para tratamiento de los portas con Silane (Sigma®)**

1. Lavar los portas en acetona durante 30 minutos.
2. Dejar secar a temperatura ambiente.
3. Colocar las portas en Silane diluido al 2 % en acetona durante 30 minutos.
4. Lavar con agua destilada.
5. Colocarlo en un soporte y llevarlo a la estufa a 37° C para secar.

**A.3.1.1.3.- Histoquímica**

Se realizaron distintas técnicas de histoquímica con el fin de observar mejor la morfología del cartílago, determinar la presencia de

fibras elásticas, o de mucopolisacáridos, según el caso. Para ello se utilizaron los siguientes protocolos:

**a. Coloración de Hematoxilina- Eosina (Gabe, 1968)**

**b. Azul Alcian 8 GX (Sigma®)(Gabe,1968)**

Esta técnica se utiliza para determinar la presencia de mucopolisacáridos ácidos en los cortes de cartílago y cultivos celulares. Tiñe los grupos sulfóxido de los glicanos de color azul.

**c. Tinción de Van Gieson (Gabe,1968)**

Esta técnica se utilizó para determinar la presencia de fibras elásticas en los cortes de cartílago y en los agregados. Tiñe de color rosado las fibras elásticas.

**A.3.1.1.4.- Inmunohistoquímica**

Las técnicas de inmunohistoquímica se llevaron a cabo para detectar la presencia de las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 3$  en las células.

- Incubar en 1% de BSA (Albúmina Sérica Bovina), disuelta en PBS pH 7.5 durante 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos.
- Bloquear la actividad peroxidasa interna con 3% de  $H_2O_2$  durante 10 minutos a 37°C.
- Lavar con PBS.
- Incubar con el anticuerpo primario *mouse anti-human integrin*  $\beta 1$  (MAB1951Z-20) y  $\beta 3$  (MAB1957Z-20) (Chemicon ®) disuelto

en PBS pH 7.5 conteniendo 1% BSA, durante 60 minutos a temperatura ambiente (o durante toda la noche a 4°C dependiendo de la concentración de anticuerpo y la accesibilidad del antígeno). La dilución de trabajo del anticuerpo primario es de 1:500.

- Lavar con PBS pH 7.5, 3 veces 10 minutos cada vez.
  
- Proceder con el anticuerpo secundario biotinilado, siguiendo las instrucciones del kit de tinción Peroxidase Extravidin (Sigma®):
- Lavar abundantemente en un baño de PBS durante 5 minutos (con un agitado lento y continuo).
- Dejar escurrir los portas, eliminar el exceso de líquido y enjuagar los portas como hemos hecho anteriormente.
- Diluir el Biotinylated Goat Anti-Mouse IgGs en PBS conteniendo 1% BSA (Dilución de trabajo 1:15, 1:20). Para eliminar los restos de tinción del tejido, opcionalmente se puede diluir el anticuerpo secundario biotinilado en PBS con 5% NGS o 1% BSA.
- Añadir 100 µl a cada porta, cubriendo la sección.
- Incubar durante 30 minutos en una habitación humidificada a temperatura ambiente.
- Lavar abundantemente con PBS de un frasco de lavado.
- Colocar los portas en un baño con PBS durante 5 minutos (con un agitado lento y continuo).
- Dejar escurrir los portas. Eliminar el exceso de líquido y enjuagar como antes.
  - Diluir la Peroxidase Extravidin en diluyente para alcanzar su concentración óptima (Dilución de trabajo 1:15, 1:20).
  - Añadir 100 µl a cada porta, cubriendo la sección.
  - Inclinar el porta en las dos direcciones.
  - Incubar 30 minutos en una habitación humidificada a temperatura ambiente.

- Lavar abundantemente con PBS de un frasco de lavado.
- Colocar los portas en un baño de PBS durante 5 minutos (con un agitado lento y continuo).
- El revelado se hizo con un kit de cromógeno DAB (Sigma®):
  - Añadir 30  $\mu$ l (una gota) de la solución cromógena líquida DAB, a 1 ml de una solución tampón líquido de DAB. Mezclar bien. Para obtener buenos resultados, usar la solución de trabajo DAB preparada inmediatamente.
  - Cubrir los pocillos, con 0,2 a 0,5 ml de la solución de trabajo DAB.
  - DAB es un sustrato de acción rápida. Monitorizar atentamente, para prevenir la sobreexposición y la elevada tinción de fondo. La reacción puede ser detenida, añadiendo agua o TBS, y agitando lentamente.
  - Observar en el microscopio.

#### **A.3.1.1.5.- Inmunofluorescencia directa**

La inmunofluorencia directa se realizó incubando las muestras con anticuerpos primarios incubados con FITC frente a las integrinas  $\beta$ 1,  $\beta$ 3,  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 (de ratón, Sigma®, 1:1000). Las muestras fueron lavadas dos veces y montadas en medio de montaje no fluorescente (Sigma®), observados directamente en un microscopio de fluorescencia de contraste de fases. Los experimentos control fueran llevados a cabo en cartílago normal sin el anticuerpo primario y otro tejido diferente del cartílago.

- Incubar en 1% de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma®), disuelta en PBS pH 7,5 durante 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos.

- Incubar con el anticuerpo monoclonal Beta 1, Beta 3, AlfavBeta3, Alfa 5 (Becton Dickinson®) en 1% BSA y 0,1% de suero normal de cabra, disuelto en PBS pH 7'5 durante 60 minutos a temperatura ambiente (o durante toda la noche a temperatura ambiente dependiendo de la concentración de anticuerpo y la accesibilidad del antígeno). Se ha determinado una dilución mínima de trabajo del anticuerpo primario de 1:1000.
- Lavar con PBS pH 7'5, 3 veces 10 minutos cada vez.
- Observar las preparaciones en un microscopio de fluorescencia Nikon® Optiphot y un microscopio Confocal Radiance 2000 (Biorad®).

#### **A.3.1.1.6.- Inmunofluorescencia indirecta**

Esta técnica se empleó para determinar la presencia de colágeno tipo II en cortes y agregados.

- Incubar en 1% de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma®), disuelta en PBS pH 7'5 durante 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos.
- Incubar con el anticuerpo primario monoclonal anticolágeno tipo II (Sigma®) en 1% BSA, disuelta en PBS pH 7'5 durante 60 minutos a temperatura ambiente (o durante toda la noche a temperatura ambiente, dependiendo de la concentración de anticuerpo y la accesibilidad del antígeno). Se ha determinado una dilución mínima de trabajo del anticuerpo primario de 1:1500, mediante tinción con inmunoperoxidasa indirecta de muestras congeladas de tráquea humana fijadas con acetona y tratadas con hialuronidasa.

- Lavar con PBS pH 7.5, 3 veces 10 minutos cada vez.
- Incubar el anticuerpo secundario (anti-mouse IgM FITC conjugate, Sigma®), dilución de 1:50, en 1% de BSA, PBS pH 7.5, 60 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS pH 7.5, 3 veces 10 minutos.
- Montar en un portaobjetos con una gota de medio de montaje y sellar con un cubreobjetos.
- Observar las preparaciones en un microscopio de fluorescencia.



### **A.3.2.-Técnicas de microscopía electrónica**

Para el estudio de la matriz extracelular, se realizó microscopía electrónica de transmisión. El microscopio electrónico de transmisión se empleó para la observación de los fragmentos de cartílago de aproximadamente 2 mm<sup>3</sup>.

#### **Protocolo de microscopía electrónica de transmisión**

##### **FIJACIÓN**

El método de fijación empleado influye, en gran medida, en el grado de preservación de la estructura de las células y de la distribución de los diferentes orgánulos, de lo cual depende la fiabilidad que pueden ofrecer los resultados de un estudio cuantitativo.

Las piezas de cartílago elástico tratadas con las distintas enzimas y los controles, se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % en cacodilato sódico (0'1 M) durante 4 horas a 4°C. A continuación se realizaron tres lavados de 1-2 horas, cada uno con una solución de cacodilato 0'1 M a 4°C. La postfijación se llevó a cabo en tetróxido de osmio al 1% en cacodilato (0'1M) durante 3 horas en oscuridad y a temperatura ambiente, efectuando después tres lavados de 1-2 horas en la misma solución de cacodilato a temperatura ambiente.

##### **DESHIDRATACIÓN**

Este paso se realizó con alcohol etílico según la siguiente secuencia creciente: alcohol de 50° 30 minutos, alcohol de 70° 30 minutos, alcohol de 90° 30 minutos, alcohol de 96° tres pases de 30 minutos y alcohol absoluto, otros tres pases de 30 minutos.

## **INCLUSIÓN**

Para la inclusión de las piezas se utilizó la resina EPON 812, siguiendo la técnica habitual.

## **ULTRAMICROTOMÍA**

Se realizaron cortes semifinos sucesivos de 1  $\mu\text{m}$  de grosor, hasta alcanzar el corte con la imagen que más se ajustase a nuestras pretensiones. Estos cortes semifinos se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo LKB V del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de León. Los cortes resultantes se recogieron en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, que se colocó encima de una placa caliente a 65 °C hasta su desecación y fijación, realizándose después una tinción con azul de toluidina al 0'5% en una solución de borato sódico en agua bidestilada al 1% (Coveñas *et al.*, 1982).

Los cortes ultrafinos se obtuvieron utilizando el mismo ultramicrotomo mencionado anteriormente. Se eligieron para el estudio aquellos de un grosor de 80-100 nanómetros, correspondientes a la interferencia dorada-plateada y se recogieron en rejillas de cobre de 150 mallas (3-4 rejillas con 3-4 ultrafinos cada una).

## **CONTRASTE DE LAS SECCIONES ULTRAFINAS**

Los cortes ultrafinos fueron contrastados siguiendo el método de doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo (Glauert, 1975). El acetato de uranilo se prepara mezclando, a partes iguales, alcohol de 95° y una solución saturada de acetato de uranilo en agua bidestilada.

El citrato de plomo se obtiene de la mezcla de 1'3 g de nitrato de plomo cristalizado con 1'78 g de citrato sódico tribásico en 30 cc de agua bidestilada, que se agita durante un largo período de tiempo (30

minutos) para que se forme el citrato de plomo y, posteriormente, se añaden 8 mL de hidróxido sódico 1N y 9 mL de agua bidestilada.

La técnica de tinción propiamente dicha se lleva a cabo en dos cámaras. En una de las cámaras preparadas, se depositan varias gotas de acetato de uranilo sobre el papel parafinado, y sobre ellas se colocan las rejillas y se mantienen así durante 20-30 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las rejillas se lavan en agua bidestilada por inmersión tres veces consecutivas y se dejan secar al aire. En la otra cámara de tinción se depositan de igual forma las gotas de citrato de plomo, sobre las cuales se depositan las rejillas teñidas con acetato de uranilo una vez secas, y se mantienen durante 3-5 minutos. A continuación se lavan, como antes, por inmersión en agua bidestilada 3 veces consecutivas y se dejan secar al aire sobre papel de filtro.

Una vez secas, las rejillas se recogen en un portarejillas quedando listas para su observación al microscopio electrónico. Su examen se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1010 Japan) empleando voltajes de 80 KV.

## **A.4.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **A.4.1.- Extracción de ARN a partir del tejido**

Mediante esta técnica extraemos ARN total a partir de cartílago auricular.

- Romper el tejido con nitrógeno líquido, en mortero de acero inoxidable.

- Homogenizar las muestras de tejido en TRI REAGENTE® (1 ml por 100 mg de tejido) en un polytron (cerca de 45 segundos), manteniendo la muestra en hielo

- Mantener las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar la mezcla resultante a 12000 g durante 15 minutos a 4 ° C.

- Transferir la fase acuosa a un tubo y añadir 0,2 ml de cloroformo. Cubrir bien la muestra, y agitar vigorosamente durante 15 segundos. Dejar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar la mezcla resultante a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. La centrifugación separa la mezcla en tres fases: una fase orgánica rosa (contiene proteína), una interfase (conteniendo ADN) y una fase acuosa superior incolora (conteniendo ARN).

- Transferir la fase acuosa incolora a un tubo nuevo y añadir 1 ml de Reagent ® Tri. Agitar vigorosamente durante 15 segundos y dejar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionar 0,2 ml de cloroformo. Tapar la muestra, y agitar vigorosamente durante 15 segundos. Dejar las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Centrifugar la mezcla resultante a 12000 g durante 15 minutos a 4°C.

- Transferir la fase acuosa transparente a un tubo nuevo y adicionar 0,5 ml de isopropanol. Agitar vigorosamente durante 15 segundos y dejar las muestras 10 minutos la temperatura ambiente.

- Centrifugar la mezcla resultante a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. El ARN precipitado forma un agregado en las paredes laterales y en el fondo del tubo.

- Eliminar el sobrenadante y lavar el agregado de ARN añadiendo 1 ml de etanol al 75%. Agitar la muestra en el vortex y centrifugar a 7500 g durante 5 minutos a 4 ° C.

- Eliminar el sobrenadante y disolver las muestras en agua libre de RNasa.

- Almacenar a -80°C.

#### **A.4.2.- Extracción de ARN total a partir de células cultivadas utilizando el RNAspin Mini Kit (GE Healthcare®)**

Mediante esta técnica extraemos ARN de células cartilaginosas cultivadas en monocapa y agregados de células cartilaginosas.

##### **1. Homogeneización de la muestra**

- Hasta  $1 \times 10^6$  células eucariotas cultivadas se recogen por centrifugación y se lisan por adición directamente del buffer RA1.

- Si no está todavía homogeneizado para procesar grandes cantidades de células ( $>1 \times 10^6$ ), primero homogeneizar usando agujas de 0,9 mm (20 Gauge), seguido de filtración a través de unidades RNAspin Mini Filter.

##### **2. Lisis celular**

Añadir 350  $\mu$ l del tampón de lisis RA1 y 3,5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol al agregado celular y agitar vigorosamente en un vórtex.

##### **3. Filtrar el lisado**

Para reducir la viscosidad y clarificar el lisado por filtración se utilizan las unidades RNAspin Mini Filter: colocar RNAspin Mini Filter (anillo violeta) en un tubo colector, echar la solución y centrifugar durante 1 minuto a 11000 x g.

Descartar el RNAspin Mini Filter: transferir el filtrado a un tubo nuevo de microcentrífuga, tomándolo con cuidado para evitar aspirar algún agregado formado.

#### **4. Ajustar las condiciones de unión de ARN**

Añadir 350  $\mu$ l de etanol (70%) para homogeneizar el lisado y mezclar por agitación 2 x 5 segundos. Después de la adición del etanol se puede tornar visible un precipitado fibroso. Esto no afectará al aislamiento del ARN.

#### **5. Unión del ARN**

Para cada preparación, usar una columna RNAspin Mini (anillo azul claro) colocado en un tubo de 2 ml de microcentrífuga. Pipetear el lisado arriba y abajo 2-3 veces, y después colocar el lisado en la columna. Centrifugar durante 30s a 8000 x g. Colocar las columnas en un tubo colector nuevo.

La máxima capacidad de carga del RNAspin Mini Column es de 750  $\mu$ l. Repetir el procedimiento si es necesario procesar volúmenes mayores.

#### **6. Desalar la membrana de sílica**

Adicionar 350  $\mu$ l MDB (Membrane Desalting Buffer) y centrifugar a 11000 g 1 minuto. Eliminar el fluido filtrado y volver a poner la columna en el tubo colector.

La eliminación de sal hace que la digestión subsecuente de DNAsa I sea mucho más efectiva. Si la columna exterior ha estado en contacto con el fluido que atraviesa la membrana por alguna razón, eliminar el fluido filtrado y centrifugar otra vez durante 30 segundos a 11000xg.

#### **7. Digestión del ADN**

Preparar la mezcla de reacción de la DNAsa en un tubo estéril de microcentrífuga: para cada aislamiento, añadir 10  $\mu$ l de DNAsa I

reconstituido a 90 µl de tampón de reacción de DNAsa. Mezclar girando el tubo con cuidado. Aplicar 95 µl de la reacción de la mezcla de la DNAsa directamente en el centro de la columna de la membrana de sílica. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

## **8. Lavar y secar la membrana de sílica**

Tener la certeza que el tampón RA3 está equilibrado a temperatura ambiente.

### **1<sup>er</sup> Lavado**

Añadir 200 µl de tampón RA2 a la columna RNAspin Mini. Centrifugar durante 1 minuto a 11000g. Colocar la columna en un tubo colector nuevo.

### **2<sup>o</sup> Lavado**

Adicionar 600 µl de tampón RA3 a la columna RNAspin Mini Columna. Centrifugar durante 1 minuto a 11000 x g. Eliminar el fluido filtrado y colocar la columna en el tubo colector.

### **3<sup>er</sup> Lavado**

Adicionar 250 µl de tampón RA3 a la columna RNspin Mini. Centrifugar durante 2 minutos a 11000 x g para secar la membrana completamente. Colocar la columna en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml libre de nucleasas.

## **9. Elución del ARN muy puro**

Eluir el ARN en 100 µl de H<sub>2</sub>O (RNase-free) y centrifugar a 11000 g durante 1 minuto.

Este ARN debe ser inmediatamente colocado en hielo para prevenir el potencial de degradación. Mantener a -20°C y -80°C para almacenamiento a corto y largo plazo, respectivamente.

#### **A.4.3.- Cuantificación de la cantidad y pureza del ARN**

##### **Nanodrop**

La concentración de ARN de las muestras se midió empleando un espectrofotómetro NanoDrop® (Nanodrop Technologies).

##### **Experion™ RNA stdsens analysis kit**

Para confirmar la concentración y, fundamentalmente, para analizar la pureza del ARN extraído se utilizó el Experion™ RNA stdsens analysis kit.

#### **LIMPIEZA DE ELECTRODOS**

Este procedimiento debería realizarse diariamente. Si se sospecha que ha habido contaminación con RNAsas debe realizarse entre cada ejecución. Si todavía se sospecha que hay contaminación de los electrodos, realizar el procedimiento “*Electrode Manifold Deep Cleaning*” como se describe en el protocolo que se proporciona con el manual del equipo.

NOTA: si el chip de limpieza (Cleaning Chip) se usa por primera vez, tratar éste con el “*Experion electrode cleaner*” para eliminar cualquier contaminación con RNAsa antes de usarlo.

- Rellenar completamente el chip nuevo de limpieza (~800 µL) con el “*Experion electrode cleaner*”.



- Dejarlo actuar durante 5 minutos. Descartar la solución.
  - Llenar perfectamente el chip con agua DEPC (4-5 veces).
1. Llenar el chip de limpieza con 800  $\mu$ L de “*Experion electrode cleaner*”. Asegurarse de que no hay burbujas atrapadas dentro del reservorio. Golpear suavemente un lado del chip para disipar cualquier burbuja. Marcar este chip de limpieza como “*Electrode Cleaner Chip*”.
  2. Abrir la tapa de la estación de electroforesis y poner el chip sobre la plataforma.
  3. Cerrar la tapa y dejar el chip en el equipo durante 2 minutos.
  4. Llenar un chip de limpieza distinto con 800  $\mu$ L de agua DEPC. Marcar este chip de limpieza como “*DEPC water chip*”.
  5. Abrir la tapa y quitar el chip de limpieza. Reemplazarlo por el chip que contiene el agua DEPC.
  6. Cerrar la tapa y dejar el chip en el equipo durante 5 minutos para que enjuague los electrodos.
  7. Repetir el paso de enjuagado con agua DEPC nueva durante 1 minuto.
  8. Abrir la tapa y quitar el “*DEPC water chip*”.
  9. Dejar la tapa abierta y esperar 1 minuto para que se evapore cualquier resto de agua que quede sobre los electrodos.
  10. Eliminar los líquidos de los chips de limpieza.

### **EQUILIBRADO DE LOS REACTIVOS DEL KIT**

1. Sacar de la nevera (4°C) el colorante ARN (tapa azul), el tampón de carga de ARN (tapa amarilla) y un tubo de gel ARN (tapa verde). Equilibrar a temperatura ambiente durante unos 15-20 minutos.  
NOTA: guardar el colorante cubierto con papel aluminio durante todo el proceso para evitar su exposición a la luz.

NOTA: si se ha filtrado el gel previamente, sacarlo de la nevera y equilibrarlo a temperatura ambiente.

2. Agitar en vórtex el contenido de cada tubo y centrifugar brevemente para que las soluciones queden en el fondo del tubo. Asegurarse de que el DMSO en el colorante está completamente descongelado antes de seguir con el protocolo.

### **PREPARAR EL COLORANTE DEL GEL**

NOTA: saltarse los pasos 1 y 2 si ya se tiene el gel filtrado.

1. Pipetear 600  $\mu$ L de ARN gel (tapa verde) en el filtro puesto en un tubo de centrifuga.
2. Centrifugar el gel a 1500 x g durante 10 minutos. Confirmar que todo el gel ha pasado a través del filtro y luego descartar éste.

NOTA: usar el gel filtrado en el mes siguiente a su preparación. Tras este tiempo, el gel filtrado debería ser re-filtrado de nuevo antes de reutilizarse.

3. Pipetear 65  $\mu$ L de gel filtrado en un tubo de microcentrifuga libre de RNasas. Añadir 1  $\mu$ L de colorante de ARN al tubo. Agitar brevemente en vórtex la solución. Guardar la solución gel-colorante (GS) protegida de la luz mediante papel aluminio.

NOTA: hay suficiente solución gel-colorante para 3 chips. Aumentar la cantidad de colorante de gel, si es necesario, usando una proporción 65:1 de gel y colorante. Una solución gel-colorante nueva (fresh) debería prepararse diariamente.

4. Tapar el colorante ARN correctamente, ya que el DMSO es muy higroscópico, y guardar en oscuridad.

### **PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y MARCADOR DE ARN**

NOTA: poner un termoblock a 70°C. Preparar un recipiente con hielo.

1. Sacar el marcador de ARN (ARN ladder, tapa roja) del congelador (-20°C) y dejarlo que se descongele sobre hielo.
2. Determinar la cantidad de marcador de ARN que se necesita. Se requiere un total de 1 µL de marcador de ARN para cada chip, más 1 µL extra para ajustar las variaciones de pipeteo.  
Como ejemplo, cuando se usa 1 chip, se requieren 2 µL de marcador; para 3 chips, deberían usarse 4 µL.  
NOTA: el marcador de ARN puede alicuotarse en lotes de 3 µL para usos individuales para prevenir la contaminación con RNasas.
3. Pipetear la cantidad necesaria de marcador ARN en un tubo de microcentrífuga libre de RNasas.
4. Preparar las muestras pipeteando 2-3 µL de muestra en tubos de microcentrífuga libres de RNasas.  
NOTA: las muestras de ARN deberían estar disueltas en agua libre de RNasas o tampón TE, ya que los tampones con alta fuerza iónica afectarán la sensibilidad y la exactitud de la cuantificación.
5. Desnaturalizar el marcador y las muestras durante 2 minutos a 70°C.
6. Enfriar el marcador desnaturalizado y las muestras poniéndolas inmediatamente los tubos en hielo durante 5 minutos.
7. Centrifugar durante 3-5 segundos (pulso de centrifuga) el marcador y las muestras para que queden en el fondo del tubo. Guardar en hielo hasta que se usen.

### **PREPARACIÓN (CEBADO) DEL CHIP**

1. Abrir la estación de cebado Experion, presionando hacia abajo la palanca delantera.
2. Sacar un chip “*Experion RNA StdSens*” de su bolsa y ponerlo en la plataforma, encajando la flecha del chip con la flecha de

alineamiento de la plataforma. Un tope en el chip previene su inserción en posición incorrecta. No forzar el chip en su posición.

3. Pipetear 9  $\mu$ L de solución gel-colorante en el pocillo inferior marcado como GS (gel priming well). Meter la punta de la pipeta vertical hasta el fondo del pocillo al dispensar. No meter aire al final del paso de pipeteo.

ADVERTENCIA: poner la punta de la pipeta en el borde del pocillo o dejar que el gel se deslice hacia abajo por la pared del pocillo puede conducir a la formación de burbujas en el fondo del pocillo. Es aceptable dejar 1-2 burbujas pequeñas en la superficie. Sacar las burbujas del fondo del pocillo con un a punta de pipeta limpia o quitar el gel-colorante y rellenar el pocillo.

4. Cerrar con cuidado la estación de cebado presionando suavemente hacia abajo la tapa. Ésta debería emitir un chasquido (clic) cuando se cierre.
5. Ajustar la presión en B y el tiempo en 1, como se especifica en el código alfanumérico del chip. La opción seleccionada en la estación de cebado tiene una letra y un número en negrita sobre fondo claro.
6. Presionar el botón de inicio (Start). Se iluminará el mensaje “Priming” en la pantalla LCD, la estación de cebado se presurizará, y comenzará una cuenta atrás. El cebado completo requiere unos 30 segundos. No abrir la estación de cebado durante la cuenta atrás.
7. Una señal audible indica que el cebado es completo, y aparecerá un mensaje de preparado (Ready) en la pantalla. Abrir la estación de cebado presionando hacia abajo la palanca delantera.
8. Mirar el chip por debajo e inspeccionar los microcanales por si hubiera burbujas o una evidencia de un cebado incompleto. El cristal del chip aparecerá opaco y los microcanales se verán con dificultad si están cebados adecuadamente. Si se detecta algún problema, como burbujas o un cebado incompleto, usar un chip nuevo.

9. Poner el chip en una superficie limpia para cargar las muestras.

### **CARGA DE LAS MUESTRAS Y MARCADOR EN EL CHIP**

1. Pipetear 9  $\mu\text{L}$  de solución gel-colorante en el otro pocillo marcado como GS.

2. Pipetear 9  $\mu\text{L}$  de gel filtrado en el pocillo marcado como G.

NOTA: cada chip requiere 18  $\mu\text{L}$  de solución gel-colorante y 9  $\mu\text{L}$  de solución de gel.

3. Pipetear 5  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (tapa amarilla) en cada pocillo de muestra (1-12) y en el pocillo del marcador, marcado como L.

Inspeccionar los pocillos para asegurarse de que no hay una formación excesiva de burbujas tras el pipeteo. Esto puede hacerse colocando el chip sobre un fondo coloreado y mirando a través de los pocillos.

NOTA: usar una punta de pipeta nueva para cada pipeteo para prevenir la contaminación del stock de buffer de carga. Como alternativa, poner 70  $\mu\text{L}$  de buffer de carga en un tubo libre de RNasas y pipetear 5  $\mu\text{L}$  en cada pocillo.

NOTA: asegurarse de que la punta de la pipeta está centrada y posicionada verticalmente hasta el final del fondo de los pocillos. Evitar introducir burbujas en el fondo de los pocillos. Es aceptable dejar 1-2 burbujas en la superficie.

NOTA: todos los pocillos deberían rellenarse con el tampón de carga, aun cuando haya menos de 12 muestras por ejecución. El chip no funcionará adecuadamente a no ser que estén llenas.

4. Pipetear 1  $\mu\text{L}$  de marcador de ARN desnaturalizado en el pocillo marcado como L.

Cada chip debería tener marcador de ARN cargado en el pocillo del marcador para precisar la cuantificación de las muestras y para alinear las mismas.

5. Pipetear 1  $\mu\text{L}$  de muestra en cada uno de los 12 pocillos de muestra.

6. Si se ponen menos de 12 muestras, añadir 1  $\mu\text{L}$  de tampón de carga, TE o agua DEPC en los pocillos de muestra sin usar.
7. Poner el chip en el vórtex Experion, asegurándose de que los clips ajustan el chip correctamente (con fuerza).
8. Encender el vórtex, que funcionará durante 60 segundos y luego se apagará automáticamente. Quitar el chip cuando el vórtex se pare.
9. Comenzar la electroforesis inmediatamente (en menos de 5 minutos) para prevenir una evaporación excesiva y resultados pobre o un error en la ejecución del chip.

### **EJECUCIÓN DE UN ANÁLISIS DE ARN**

1. Encender la corriente de la estación de electroforesis Experion apretando el botón verde que está en el centro del panel frontal. Una luz (LED) verde estable sobre el botón indica que la unidad está encendida.
2. Ejecutar el software Experion.
3. Abrir la tapa de la estación de electroforesis. Poner el chip cebado, cargado con las muestras, en la plataforma para chips. Asegurarse de que el chip está asentado apropiadamente y luego cerrar la tapa con cuidado.
4. Seleccionar “New Run”. Seleccionar el protocolo RNA StdSens (Eukaryotic total RNA, Prokaryotic total RNA, mRNA).
5. Seleccionar el número de muestras a analizar. Presionar el icono “Start” para que comience la electroforesis.
6. Después de que ha comenzado, el LED de color verde en el centro del panel frontal de la estación de electroforesis comenzará a parpadear.
7. Cuando la ejecución se complete aparecerá un mensaje de “Run complete”. Quitar el chip de la estación de electroforesis. Para prevenir la contaminación de los electrodos, no dejar el chip en la estación durante un periodo largo de tiempo. Es una buena

práctica poner inmediatamente el chip “*DEPC water*” tan pronto como se quite el chip de ARN para prevenir que las muestras y/o buffers se sequen sobre los electrodos.

### **LIMPIEZA DE LOS ELECTRODOS TRAS UNA EJECUCIÓN**

1. Llenar el chip marcado como “*DEPC water*” con 800  $\mu$ L de agua DEPC. Golpear suavemente un lateral para eliminar cualquier burbuja atrapada en los pocillos.
2. Abrir la tapa de la estación de electroforesis y poner el chip de limpieza en la plataforma para chips.
3. Cerrar la tapa y dejarla cerrada un minuto.
4. Abrir la tapa y quitar el chip.
5. Dejar que los electrodos se sequen durante unos 30-60 segundos.
6. Cerrar la tapa.
7. Reemplazar el agua del chip de limpieza tras su uso para prevenir su contaminación.

Para guardarlo, eliminar el agua del chip de limpieza y guardarlo en un lugar limpio.

#### **A.4.4.- PCR**

Formación de la copia de ADN copia

Para la obtención de ADN copia del ARN mensajero presente en las muestras, se empleó el kit “ThermoScript RT-PCR system” de Invitrogen del modo siguiente:

- Por un lado se prepararon tubos que contienen 1  $\mu$ l de Oligo (dT)<sub>20</sub>, 7  $\mu$ l de ARN, 2  $\mu$ l de mezcla de dNTPs 10 mM y 2  $\mu$ l de agua tratada con DEPC. Estos tubos se incuban durante 5 minutos a 65°C y se colocan en hielo.

- Por otro lado se preparó en un tubo una mezcla de reacción que contiene 4 µl de Buffer de síntesis, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl RNAsa OUT (40 U/ µl), 1 µl de agua tratada con DEPC y 1 µl de Thermoscript RT (15 units/ µl) por cada muestra analizada.

- Se añaden 8 µl de esta mezcla de reacción a cada tubo en hielo.

- Se colocan los tubos en un termociclador Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems®, USA) precalentado y se mantiene 1 hora a 50 ° C. La reacción se termina incubando 5 minutos a 85°C.

-Se añade 1 µl de RNAsa H y se incuba 20 minutos a 37°C.

Empleando el kit TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems,® USA) y los primers (Tabla 14).

- Se añaden 10 µl de TaqMan® Universal PCR Master Mix Assays (Applied Biosystems®, USA), 1 µl de TaqMan® Gene expresión Assay Mix para el gen correspondiente, 4 µl de agua tratada con DEPC y 5 µl de ADN copia.

- Se coloca en un sistema de detección Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems ®, USA), y se somete a las siguientes condiciones, 10 minutos a 95°C y los 50 ciclos siguientes consistentes en 15 segundos a 95° y un minuto a 60°C.

**Tabla 14-** Primers utilizados.

<b>Gene</b>	<b>Primer directo</b>	<b>Primer inverso</b>
GAPDH	AGGTCATCCACGACCACTTC	TGCTGTAGCCAAATTCGTTG
Agrecano	GTCAGGTACCCCATCCACAC	TGTAGCAGATGGCGTCGTAG
Colágeno II	AGTCGCTGGTGCTGCTGAC	GGGGTCCTTTAGGTCCTACG



#### **A.4.5.- Electroforesis en gel de agarosa**

##### **I. Tampón de carga 6x**

###### **Se compone de:**

- 0,25% azul de bromofenol (Sigma®)	0,25g
- 0,25% Xilencianol (Sigma®)	0,25g
- 40% de sacarosa (Sigma®)	40 g
- Agua destilada	Hasta 100 ml

##### **II. Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE)**

Se preparó una concentración stock 5x que contenía:

Trizma ® base (Sigma®)	54g
Ácido bórico (Sigma®)	27,5g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	2 ml
Agua destilada	Hasta 1 l

El tampón TBE se utilizó a una concentración 0,5x preparada en el momento de su utilización.

##### **III. Tampón Tris-EDTA (TE)**

Está compuesto por:

10 mM Trizma® base	1,21 g
1 mM EDTA, pH 8,0	0,42g
Agua destilada	Hasta 1 L

### **Realización de la electroforesis**

La electroforesis en gel de agarosa horizontal se utilizó para el análisis cuantitativo del ADN. En todos los casos se empleó agarosa comercial como matriz separadora, a concentraciones que oscilaron entre el 1,5% y el 2%. Las concentraciones más bajas de agarosa permiten la separación de los fragmentos mayores, en cuanto las concentraciones altas, facilitan la separación de fragmentos más pequeños (hasta 2 Kb).

Para la realización de la electroforesis, los geles sumergidos en el tampón de electroforesis TBE 0,5x se introdujeron en las cubetas de electroforesis (Biorad®), suministrando una corriente continua de 100 voltios.

El marcador de peso molecular (PM), utilizado fue el GeneRuler™, con bandas de separación de 1Kb.

La tinción de los ácidos nucleicos se realizó mediante el agente intercalante de bromuro de etidio (Sigma®) añadido a los geles de agarosa a una concentración de 0,5 µg/ml. Los geles se fotografiaron mediante un sistema de vídeo (Biorad®).

## **B.- CÉLULAS TRONCALES DE *Ratus norvegicus***

### **B.1.- MATERIALES**

Para la obtención de células troncales, se ha empleado como animal de experimentación machos de rata (*Ratus norvegicus*) de la raza Wistar. Estos animales, con edades comprendidas entre los 9 meses y un año, variando entre los 386 y los 603 g de peso, procedían del Animalario de la Universidad de León, en el cual se observan las normas establecidas en relación con la experimentación animal.

Las ratas fueron anestesiadas mediante la administración intraperitoneal de 75 -100 mg/kg Ketamina y 5-10 mg/kg xilazina; para proceder a la recogida de grasa abdominal y de la región inguinal mediante biopsia de una muestra aproximadamente de 2 a 5 gramos. La cantidad obtenida dependió del peso inicial del animal.

Una vez obtenidas las biopsias, se procedió seguidamente a una serie de lavados con PBS estéril. Este proceso de lavados se realizaba en condiciones estériles, bajo campana de flujo laminar (Telstar®) y manteniendo las muestras en PBS (phosphate buffered saline) (Sigma®) con una solución antibiótica-antimicótica (Sigma®). Finalmente, el tejido obtenido se seccionó en fragmentos más pequeños (aproximadamente de 1 cm<sup>2</sup>) para poder realizar la disociación posteriormente.

### **B.2.- TÉCNICAS DE CULTIVO**

Para el cultivo de células troncales, se llevó a cabo la disociación de los fragmentos procedentes de las biopsias de grasa procedente de la región abdominal e inguinal, colocándolos en un frasco de cultivo de 50 ml con 25 mL del siguiente medio de disociación:

- Medio de cultivo DMEM (Sigma®).
- 0,075 % de colagenasa tipo I (Sigma®).

Después se procede a la disociación en agitación durante 1 hora a 37°C. Para bloquear la actividad enzimática se adiciona una solución de DMEM con 10% de SFB. La suspensión celular resultante, fue centrifugada a 1200 g durante 10 minutos con el fin de separar la grasa del agregado celular. Las células se resuspendieron en el mismo medio de cultivo (DMEM®).

Opcionalmente se pueden lisar las células sanguíneas resuspendiendo el agregado en 1,60 mM de NH<sub>4</sub>Cl e incubandolo 10 minutos a temperatura ambiente.

### **B.2.1.- Cultivos en monocapa**

A continuación se lavan las células con PBS y se centrifugan otra vez. Se filtran a través de una malla de nylon de 100 µm para eliminar los restos celulares. Se incuba toda la noche a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> en un medio control:

- DMEM
- 10% SFB
- 1% solución antibiótica-antimicótica

Posteriormente, se realiza un lavado abundante con PBS para eliminar los restos y las células sanguíneas no adherentes. Las células fueron cultivadas en monocapa hasta su confluencia, en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua y un 5% de CO<sub>2</sub>, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

Una vez alcanzada la confluencia en 5 a 7 días de cultivo, se llevó a cabo la tripsinización. Para ello se lavaron los frascos con PBS; a

continuación se añadió una solución conteniendo 0'05 g de tripsina 1:250 (DIFCO®) y 0'02 g de EDTA (Sigma®) en 100 mL de PBS durante de 5-10 minutos a 37°C. Una vez desprendidas las células del sustrato plástico, se realizó un conteo en una cámara de conteo celular y se determinó su viabilidad mediante una tinción de exclusión con azul Trypan (Sigma®). Posteriormente se sembraron de diversas formas: cultivos en monocapa, cultivos en agregación y cultivos en micromasa.

A los cuatro días de cultivo con estos productos, el portaobjetos plástico (Thermanox®) utilizado fue extraído de cada pocillo para realizar los estudios de inmunofluorescencia indirecta, inmunohistoquímica, microscopía óptica y microscopía electrónica, tal y como se detalla en los apartados correspondientes. Además, se llevó a cabo un control diario de los cultivos mediante el microscopio de contraste de fases.

### **B.2.2.- Cultivo en agregación**

Se realizó del mismo modo que se recoge en el punto A.2.2. del material y métodos, pero utilizando células troncales procedentes del tejido adiposo.

### **B.2.3.- Cultivo en micromasa**

Las células cultivadas y amplificadas en monocapa fueron usadas al final del cuarto pase para preparar agregados celulares. Las células del tejido adiposo fueron subcultivadas hasta que alcanzaron una confluencia de 70 a 80 %, con el fin de evitar favorecer la inhibición del crecimiento y la rediferenciación espontánea. Los cultivos fueron lavados con PBS, para eliminar el SFB que estaba presente en el medio. El PBS se aspiró, y se añadió 0,05% de tripsina-EDTA. Los cultivos fueron recolocados en la estufa a 37°C, durante 5 a 10 minutos. Cuando las células se despegaron, se añadió SFB, para inhibir la tripsina. Las células se recogieron en un tubo de 15 ml, y fueron

centrifugadas durante 10 minutos a 1200 g. El sobrenadante se eliminó, y se añadió una solución de DMEM, SFB y antibiótico/antimicótico.

Las células fueron contadas en el hematocitómetro y el volumen de suspensión se ajustó a la densidad final de  $1,25 \times 10^6$  células/ml. La solución se agitó lentamente para homogeneizarla. Se pusieron 10  $\mu$ l de esta solución en placas de 24 pocillos y se mantuvieron en la estufa a 37°C durante 2 horas para lograr que se adhirieran al plástico. Al final de estas dos horas se añadió el medio condrogénico.

#### **B.2.4.- Cultivo en biomateriales**

##### **B.2.4.1.- Cultivo en poly-d-glicólico**

###### *Preparación del biomaterial*

Se utilizó sutura sintética reabsorbible SA90® (tamaño 0; LorcaMarín s.a. ®), constituida por ácido poliglicólico trenzado y recubierto por policaprolactona y estereato de calcio.

Se trenzaron varios hilos para obtener un biomaterial de mayor tamaño.

###### *Técnica de cultivo de las células*

Se tripsinizaron las células y se contaron en el hematocitómetro. A continuación se resuspendieron las células en 4 ml de medio de cultivo en un tubo de 15 cm<sup>2</sup> y que contiene el biomaterial. Se centrifugaron a 1200 g durante 10 minutos y se mantuvieron en estufa con 5 % CO<sub>2</sub> a 37 ° C.

Se observó el biomaterial en un microscopio de contraste de fases. También se observó en un lupa estereoscópica (Nikon Stereoscopie Zoom Microscopio SMZ 1500®).

#### **B.2.4.2.- Cultivo en agar**

Para poder estudiar el comportamiento de estas células en agar se realizó:

- Tripsinizar.
- Centrifugar 10 minutos a 1200 g, eliminar el sobrenadante y diluir en 100 microlitros de DMEM.
- Preparar el agar a 2%.
- Dejar enfriar hasta justo antes de solidificar y adicionar las células. A continuación mezclar.
- Colocar durante 5 minutos en la nevera.
- Realizar cortes con la ayuda de una espátula y colocar en la multiplaca con medio de cultivo.

#### **B.2.4.3.- Colágeno**

Se añadió a los cultivos colágeno tipo I (Sigma®), conjugado con FITC 0,01 mg/ml de solución.

#### **B.2.5.- Congelación celular**

Con el fin de mejorar la eficiencia de los procesos, tuvimos que optimizar el protocolo de congelación de las células. De esta forma, probamos dos soluciones distintas de congelación.

- 1- Las células son tripsinizadas y lavadas con PBS.
- 2- Son centrifugadas a 1200 g durante 5 minutos.
- 3- Se decanta el sobrenadante.
- 4- Se descomplementa el SFB 1h a 60 ° C.
- 5- Estudiamos dos métodos distintos de congelación celular:

A) Con 10% de DMSO, 10% de medio y 80 % de Suero.

B) Con 10% de DMSO, 80 % de medio y 10% de Suero.

6- Por cada  $7 \times 10^6$  células usamos 350 microlitros de la solución de congelación.

7- Poner en un contenedor de alcohol isoamílico 1 día a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

8- Pasar las muestras a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### **B.3.- TÉCNICAS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR**

#### **B.3.1.- Inducción de la condrogénesis**

Se adicionó a los cultivos en micromasa diversas soluciones con el objetivo de probar su capacidad para la diferenciación condrogénica.

Solución control - 90 % DMEM + 10 % SFB.

Solución diferenciadora - 10 ng/ml de  $\text{TGF}\beta 1$ + 6,25  $\mu\text{g/ml}$  ITS+ 50 nM de Ascorbato-2-fosfato.

#### **B.3.2.- Inducción de la neurogénesis**

Se utilizó el protocolo de Woodbury *et al.* (2000), para la diferenciación neurogénica. De esta forma, se realizó una preinducción con una solución de 20% SFB en DMEM y 1mM de  $\beta$ -mercaptoetanol durante 24 horas. Después las células fueron lavadas con PBS y transferidas a un medio de inducción, compuesto por DMEM sin suero, antibiótico y con una concentración entre 5 -10 mmol/ml de mercaptoetanol, durante un tiempo máximo de 10 días.



## **B.4.- TÉCNICAS DE MICROSCOPIA**

### **B.4.1.- Técnicas de microscopía óptica**

En este apartado se siguieron los mismos pasos que se han descrito previamente en los apartados **A.3.1.1** y **A.3.1.1.3** (Técnicas generales de procesado de las muestras para microscopía óptica).

Para su observación mediante microscopía óptica, las células fueron cultivadas sobre sustrato plástico y Thermanox®.

#### **B.4.1.1.-Fijación**

#### **B.4.1.2.- Inclusión en parafina**

Las células troncales de tejido adiposo de rata incluidas en agar fueran incluidas en parafina.

#### **B.4.1.3.- Histoquímica.**

Se realizaron distintas técnicas de histoquímica con el fin de determinar la presencia en las preparaciones, de mucopolisacáridos, sustancia de Nissl y lípidos. Para ello se utilizaron los siguientes protocolos:

##### **a. Hematoxilina/Eosina**

##### **b. Azul Alcian 8 GX (Sigma®)**

##### **c. Coloración de van Nissl (Gabe, 1968)**

#### **d. Oil Red O**

##### **Preparación de la solución de almacenamiento**

- Diluir 0,5 g de Oil Red O (Sigma®) en 100 ml de isopropanol.

##### **Protocolo de tinción**

- Lavar las placas con PBS.  
- Fijar las células cobriendolas con PBS + 10 % de formaldehído o con formalina disponible comercialmente.

- Dejar las células fijando al menos durante 15 minutos, o toda la noche, a temperatura ambiente, alternativamente las placas pueden mantenerse a 4°C, hasta que las multiplacas sean recogidas.

-Preparar la solución de trabajo de Oil Red O (hacer siempre fresco porque la solución de trabajo es muy inestable, precipita con facilidad) añadiendo 6 ml de solución de almacenamiento en 4 ml de agua ddH<sub>2</sub>O. Mezclar y filtrar a través de un papel de filtro Whatman #1. El proceso de filtración tarda bastante tiempo, y no se aconseja aplicar vacío porque tiene demasiadas impurezas para filtrar. Hacer 5 ml por 10 cm de placa a teñir.

- Eliminar el agente fijador y añadir la solución de trabajo de Oil Red O.

- Esperar por lo menos 1 hora a temperatura ambiente.  
- Lavar varias veces con cuidado, con agua destilada para eliminar el exceso de tinción y algún precipitado que se forma.

- Mantener las células en agua.  
- Quitar el agua destilada y permitir que las placas sequen al aire.

- Observar las placas.

#### **B.4.1.1.4.- Inmunofluorescencia directa**

Las muestras se fijaron como se indica en el punto A.3.1.1.1. La inmunofluorescencia directa se realizó como explicamos en el punto A.3.1.1.5 utilizando los anticuerpos monoclonales de hamsters Anti-Rat CD29 conjugados con FITC (Pharmlngen/BD Biosciences®) con la dilución de 1:1000.

#### **B.4.1.1.5.- Inmunofluorescencia indirecta**

Las muestras se fijaron como se recoge en el punto A.3.1.1.1. La inmunofluorescencia indirecta se realizó de igual modo al descrito A.3.1.1.5 utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal purificado mouse Anti-Rat CD73 (Pharmlngen/BD Biosciences®) con la dilución 1:1000. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo monoclonal Rat anti-mouse IgG<sub>1</sub> conjugado con FITC, con las diluciones 1:25 o 1:50.

### **B.5.- TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

En este trabajo se realizaron, asimismo, estudios mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

El microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010, se empleó para la observación de células troncales del tejido adiposo incluidas en agar.

El microscopio electrónico de barrido JSM-6480 de JEOL, se utilizó para analizar muestras de cultivos de células troncales de tejido adiposo en diversos pases y estas mismas células cultivadas en hilos de poliglicólico.

### **B.5.1.- Protocolo de microscopía electrónica de transmisión**

Como se ha referido en el punto A.3.2.1. del material y métodos, pero utilizando células troncales de tejido adiposo incluidas en agar.

### **B.5.2.- Protocolo de microscopía electrónica de barrido**

Esta técnica de microscopía electrónica de barrido se utilizó para observar células cultivadas en monocapa sobre portaobjetos de plástico de 13 mm de diámetro (Thermanox®) y para células cultivadas en hilo de ácido poliglicólico.

### **FIJACIÓN**

Los portaobjetos se mantuvieron 15-20 minutos a temperatura ambiente en una solución fijadora (Karnowsky: 2% Glutaraldehído y 5% Paraformaldehído en PBS 0'1 M, pH 7'2). A continuación se hicieron 3 lavados consecutivos con una solución tampón de PBS 0'1 M a 4°C, con un intervalo de 10 minutos entre cada uno de ellos.

A continuación se llevaron a cabo los procesos de **deshidratación** y **desección**, siguiendo los protocolos habituales.

### **RECUBRIMIENTO**

Las muestras ya desecadas fueron montadas sobre los portaobjetos metálicos del microscopio electrónico de barrido empleando cinta de carbono conductora. Se realizó el recubrimiento metálico o *sputtering* de las muestras mediante un *sputter coatter* SCD 004 de Balzers obteniendo una capa de oro paladio de 300 Å.

Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-6480 de JEOL.

## **B.6.-CITOMETRÍA DE FLUJO**

### **B.6.1.-Preparación de muestras para su análisis**

Para preparar las muestras, se lavaron los frascos de cultivo con PBS; a continuación se añadió una solución conteniendo 0'05 g de tripsina 1:250 (DIFCO®) y 0'02 g de EDTA (Sigma®) en 100 mL de PBS durante 5-10 minutos a 37°C. Una vez desprendidas las células del sustrato plástico, se realizó un contaje en una cámara de contaje celular y se determinó su viabilidad mediante una tinción de exclusión con azul Trypan (Sigma®).

Se utilizaron técnicas distintas para los diferentes anticuerpos.

#### *Inmunofluorescencia directa*

1- Lavar las células disociadas al menos una vez con 1 ml de tampón frío.

#### TAMPÓN:

PBS 7,4.

2% SFB ó 0,2 %.

0,1 % Azida sódica.

2- Resuspender las células en tampón frío.

3- Mientras tanto, añadir 50 microlitros de tampón y 50 microlitros de anticuerpo monoclonal (dilución 1:100) a los tubos.

4- Añadir 50 microlitros de la suspensión celular a los tubos.

5- Agitar brevemente e incubar durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.

6. Lavar dos veces con 0,5 ml de tampón, centrifugar a 250 g durante 5 minutos (2000 rpm durante 10 minutos).

7. Resuspender las muestras en 0,5 ml de tampón y mantenerlas a 4° C en el frigorífico (o en hielo), antes del análisis.

*Inmunofluorescencia indirecta*

1-5 Procesar las muestras celulares como se describe previamente, utilizando una dilución 1:1000 de trabajo del anticuerpo monoclonal sin marcar (no fluorescente).

6.- Resuspender el agregado celular en 100 microlitros de la dilución de trabajo del anticuerpo secundario marcado con fluoresceína con la dilución 1:50.

7.- Agitar brevemente e incubar 20 minutos en el frigorífico.

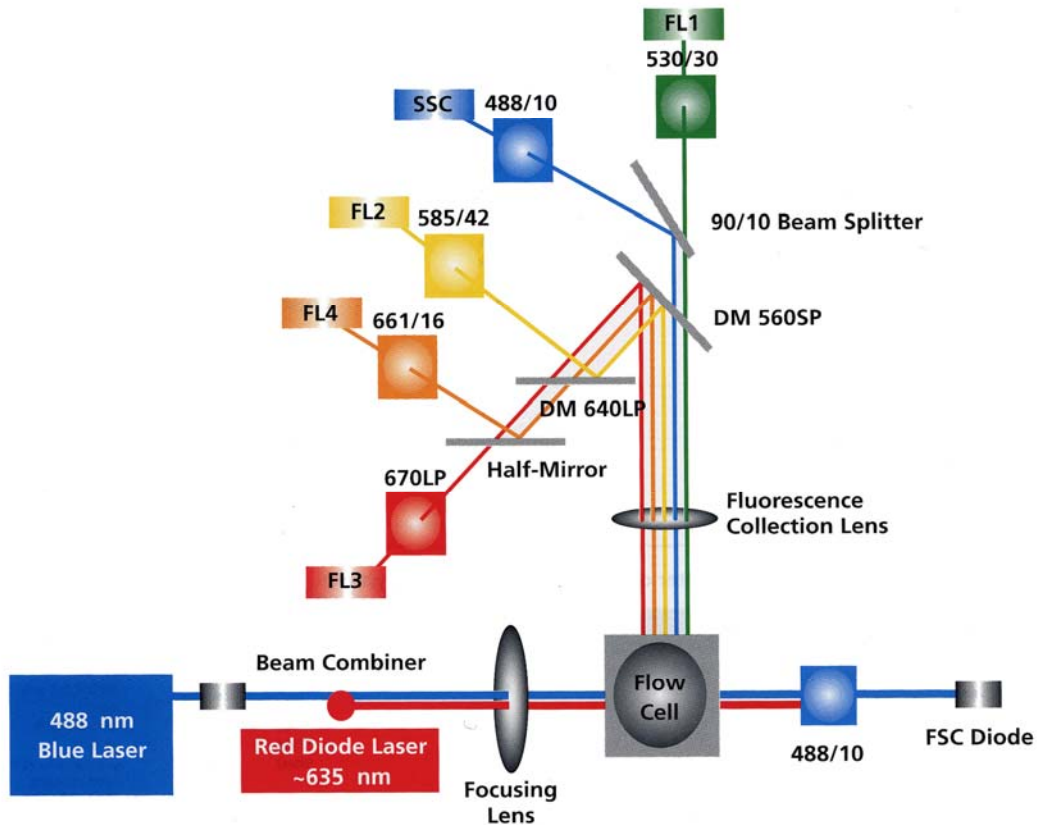
8.- Lavar dos veces con 1 ml de tampón, centrifugar a 250g durante 5 minutos.

9.- Resuspender las muestras en 1 ml de tampón y mantenerlas a 4 ° C en el frigorífico (o en hielo) protegido de la luz antes del análisis.

**B.6.2.- Adquisición y análisis**

En el presente trabajo se utilizó un citómetro de flujo modelo FACSort (Becton Dickinson ®) equipado con un láser de argón Cryonics de 15 mW y operando a una longitud de onda de 488 nm (Fig. 4). La señal SSC fue detectada por un fotomultiplicador IP28. La emisión fluorescente verde fue recogida por el canal fotodetector FL1 con un filtro 530/30 y un fotomultiplicador FMT R1477.

Para poner a punto el método citométrico se procedió a la calibración del citómetro. Ésta se realizó según los parámetros establecidos por el fabricante con el Kit facilitado para tal efecto (Color Lyse/Wash FACSComp, BD Bioscience®) y el software propio (FACSComp 4.1., BD Bioscience®).



**Figura 4** – Esquema general de funcionamiento del citómetro de flujo.

Se analizaron siempre que fue posible, 10.000 células por muestra. Los datos fueron analizados y adquiridos a través del programa CellQuest®. Se creó un primer gráfico de adquisición de datos en el que se representaron las partículas detectadas según señales FSC y SSC. Después de obtener este gráfico, se utilizaron diversas muestras celulares marcadas y no marcadas, con el fin de localizar la población celular, escogiendo la región de estudio. El resto de las partículas detectadas se consideraron residuos contaminantes de la muestra. Las partículas que representan a las CTDTA se trasladaron a otro gráfico representando la señal FL1.

Para cada muestra marcada se utilizó una muestra de células no marcadas que nos va a servir como referencia (cero o fondo), para calcular la autofluorescencia de estas células.

Los resultados fueron analizados en ordenador personal utilizando el programa Win MDI®, versión 2.8. Los datos fueron tratados en programa Microsoft Office Excel 2003. Para la comparación de las medias de tamaño y complejidad se utilizó el test  $t$  de *Student* y, para la comparación de proporciones se utilizó el test  $Z$  (Variable normal estandarizada).



## **C.- CÉLULAS TRONCALES DE *Equus caballus***

### **C.1.- ANIMALES**

Para la obtención de células troncales se ha empleado como animal de experimentación el caballo (*Equus caballus*) de 410 kg de peso y de 39 meses de edad, castrado. Este animal, procedía de la Facultad de Veterinaria de Nantes, en el cual se observan las normas establecidas en relación con la experimentación animal.

El caballo fue sedado mediante la administración intravenosa de romifidina 0,1 mg/kg y butorfanol 0,2 mg/kg. A continuación fue anestesiado mediante la administración intravenosa 50 mg/kg de gliceril guayacol éter (25 gramos en 500 ml solución fisiológica) y ketamina 2,1 mg/kg. Posteriormente se colocó el animal con anestesia inhalatoria con isoflurano y se procedió a la recogida de la grasa infrapatelar.

Una vez obtenida la biopsia, se procedió seguidamente a una serie de lavados con PBS estéril. Este proceso de lavados se realizaba en condiciones estériles, bajo campana de flujo laminar y manteniendo las muestras en PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma®), con una solución antibiótica-antimicótica (Sigma®). Finalmente, el tejido obtenido se seccionó en trozos más pequeños (aproximadamente de 1 cm<sup>3</sup>) para disociarlos posteriormente en los cultivos celulares.

### **C.2.- AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS**

- El tejido adiposo previamente aislado (cerca de 30 ml), fue reducido a pequeños fragmentos con la ayuda de pinzas, tijera y bisturí estéril.
- Se lavan varias veces con PBS o HBSS para eliminar la sangre.
- Se digirió con colagenasa a 0.025% (Sigma®, collagenase crude type I A C2674).

Para 15mL de tejido:

- 5mg de colagenasa.
- 20mL de HBSS.
- Incubar 1H a 37°C., en agitación (se obtiene un producto cremoso).
- Añadir 10 % de SFB a un volumen de DMEM, para parar la reacción.
- Dejar decantar algunos minutos sobre la campana, obtenemos 2 fases:
  - La fase superior conteniendo la grasa y los adipocitos.
  - La fase inferior conteniendo la fracción estromal.
- Centrifugar 5 minutos a 1200 rpm.
- Aspirar la fase adipocitaria superior.
- Resuspender la fase inferior y filtrarla sobre un filtro de 70µm.
- Centrifugar 8mn a 1200 rpm.
- Aspirar el sobrenadante.
- Resuspender las células en el DMEM.

**Lisis de los eritrocitos:**

- Centrifugar 8 minutos a 1200 rpm.
- Aspirar el sobrenadante.
- Añadir 1mL de *red blood cell lysis buffer hybri-max* (Sigma R7757) por cada 100 millones de células.
- Agitar durante 1 minuto.
- Añadir 15 a 20 mL de medio por mL de *red blood cell lysis buffer hybri-max* añadido.
- Centrifugar 8 minutos a 1200 rpm.
- Aspirar el sobrenadante.
- Resuspender las células en DMEM.

Sembrar 3 frascos de 75 cm<sup>2</sup> con aproximadamente 48000 células/cm<sup>2</sup> en 6.5 mL de la solución.

### **C.3.- CULTIVO DE CÉLULAS**

El medio de cultivo utilizado es DMEM alta glucosa, SFB 10%, penicilina/estreptomicina 1% (P/E), L-glutamina 1%. Se mantiene en cultivo 10 días antes de congelar.

#### C.3.1.- Protocolo de cultivo de células en frascos de 75 cm<sup>2</sup>

- Retirar el medio del frasco de 75 cm<sup>2</sup> por aspiración.
- Introducir 5 mL de tripsina/EDTA precalentada a 37°C.
- Colocar 2 minutos en la estufa a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>.
- Durante este tiempo, preparar un frasco de 50 mL con 10 ml de medio.
- Verificar que las células estén bien despegadas e individualizadas.
- Recoger los 5 mL de tripsina/EDTA y lavar el tapete celular.
- Introducir los 5 mL de tripsina/EDTA en el frasco de 50 mL conteniendo los 10 ml de medio.
- Centrifugar 8 minutos a 1200 rpm.
- Aspirar el sobrenadante del frasco.
- Resuspender el sedimento en 10mL de medio.
- Hacer el conteo de las células por coloración con azul trypan y conteo en cámara de Neubauer.
  - Sembrar 10.000 células/cm<sup>2</sup>.

#### C.3.2.- Protocolo de siembra en *cell stack*

- Retirar el medio de 10 F75 por aspiración.
- Introducir 5 mL de tripsina/EDTA precalentada a 37°C.
- Colocar 2 minutos en la estufa a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>.
- Durante este tiempo, preparar 2 frascos de 50 mL con 25 ml de medio.
- Verificar que las células estén bien despegadas e individualizadas.
- Recoger 5 mL de tripsina/EDTA y lavar el tapete celular.

- Añadir los 5 mL de tripsina/EDTA (repetir la etapa precedente con la F75 N°2) en el frasco de 50 ml, conteniendo los 20 ml de medio. Repetir esta etapa con los F75 N°3, 4 y 5 para el frasco N°2)
- Centrifugar los tubos 8 minutos a 1200 rpm.
- Recoger el sobrenadante del tubo, y resuspender el sedimento en 25mL de medio.
- Hacer el conteo de las células por coloración con azul trypan y conteo en cámara de Newbauer.
- Sembrar 10. 000 células/cm<sup>2</sup>

#### **C.4.- CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS**

- Aspirar el medio de los frascos.
- Introducir 5 mL de tripsina/EDTA precalentada a 37°C.
- Colocar 2 minutos en la estufa a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>.
- Durante este tiempo, preparar un tubo de 50 mL con 10 ml de medio.
- Verificar que las células estén bien despegadas e individualizadas.
- Recoger los 5 mL de tripsina/EDTA y lavar el tapete celular.
- Añadir los 5 mL de tripsina/EDTA a un frasco de 50 mL conteniendo los 10 ml de medio.
- Centrifugar 8 minutos a 1200 rpm.
- Recoger el sobrenadante del tubo.
- Resuspender el sedimento celular en 10mL de medio.
- Hacer el conteo en cámara de Newbauer de las células con coloración por azul trypan.
- Centrifugar 8 minutos a 1200 rpm.
- Resuspender el sedimento celular en 6,5 mL de SFB.
- Introducir 500µL de la suspensión en cada criovial.
- Añadir 500µL de SFB a 20% de DMSO (agente criopreservante) para obtener una concentración final en DMSO del 10%.

- Congelar durante la noche a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un contenedor de isopropileno, que permite una disminución lenta de la temperatura ( $1^{\circ}\text{C}$  por minuto).
- Después de 24h introducir las células en nitrógeno líquido anotando el canister y la caña.
- El resto de las células en suspensión (5.000.000 de células) son centrifugadas durante 8 minutos a 1200 rpm, siendo lavadas a continuación en PBS.
- Centrifugar 8 minutos a 1200 rpm. Aspirar el sobrenadante y congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **C.5.- PROTOCOLO DE DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS**

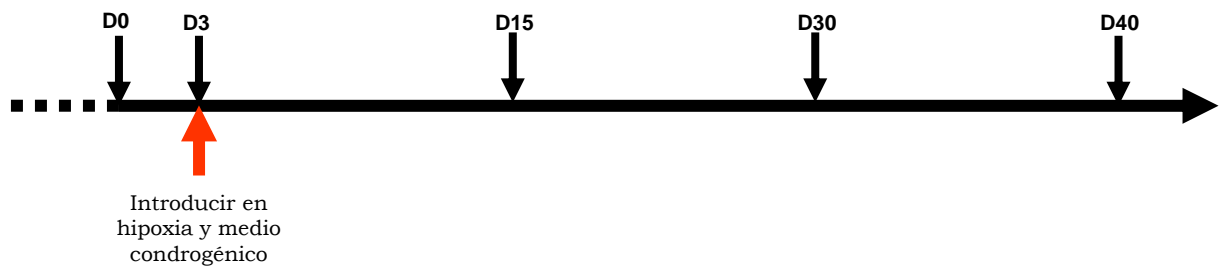
- Las células son conservadas en DMSO (Criopreservante), en nitrógeno líquido.
- Introducir 10 mL de medio de cultivo atemperado a  $37^{\circ}\text{C}$  en un tubo Falcon de 50 mL.
- Colocar el criovial conteniendo las células al baño maria.
- Recoger las células y transferirlas a 10 mL de medio de cultivo.
- Centrifugar 8 minutos a 1200 rpm.
- Colocar 5 mL de medio en un falcon de 75 marcado.
- Retirar el sobrenadante por aspiración.
- Resuspender las células con 10 mL de medio (15 mL totales por un Falcon de 75).
- Verificación de la presencia de células por observación al microscopio.
- Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , sobre atmósfera húmeda, a 5% de  $\text{CO}_2$ .
- Modificar el medio de cultivo después de 24 horas.

## C.6.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE CÉLULAS TRONCALES DE TEJIDO ADIPOSO (GRASA INFRAPATELAR) DE CABALLO

### C.6.1.- Medio condrogénico normal

#### Condiciones probadas:

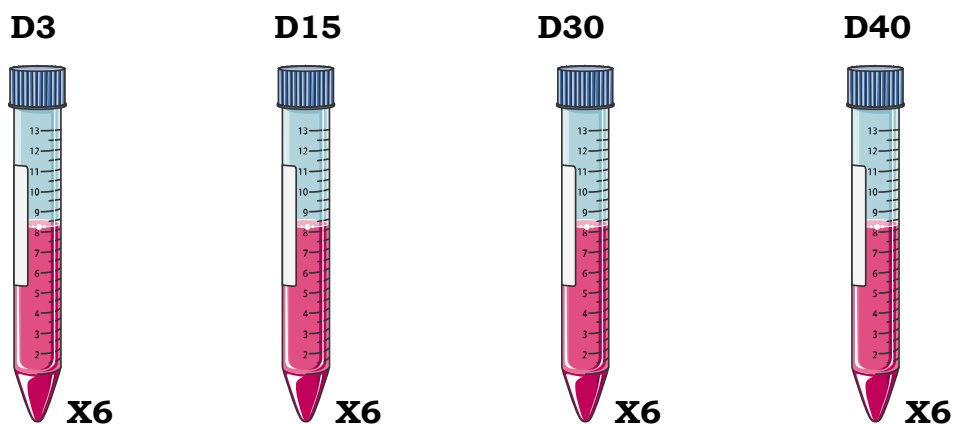
- 3 dimensiones (Agregados).
- Medio control versus medio condrogénico.
- Normoxia versus hipoxia.
- D3, 15, 30 y 40.



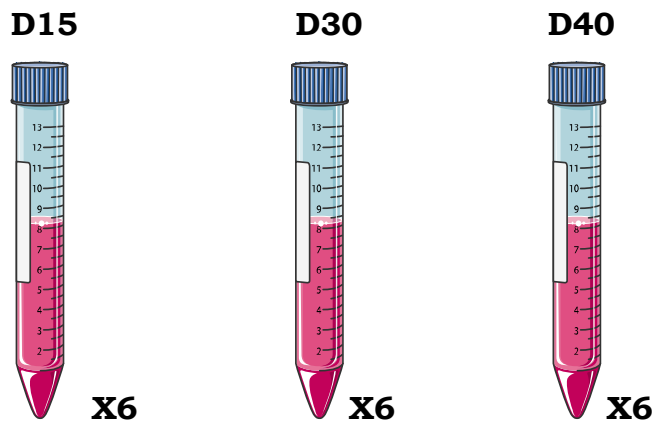
#### Preparación de los cultivos tridimensionales (96 tubos):

- o Mezclar bien 500.000 células/mL.
- o Repartimos la suspensión siguiendo el esquema que mostramos a continuación (Fig. 5).

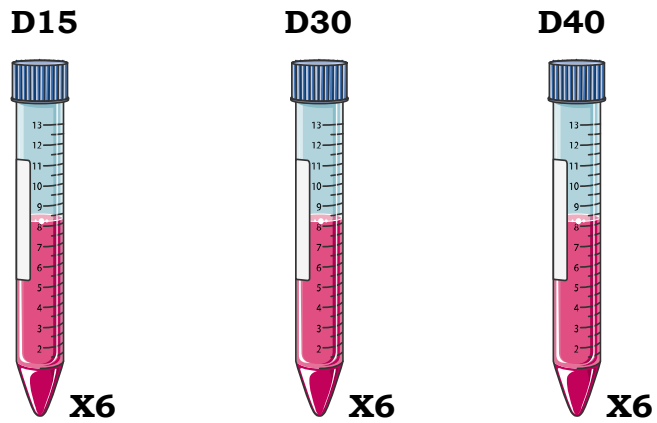
#### **Normoxia CT**



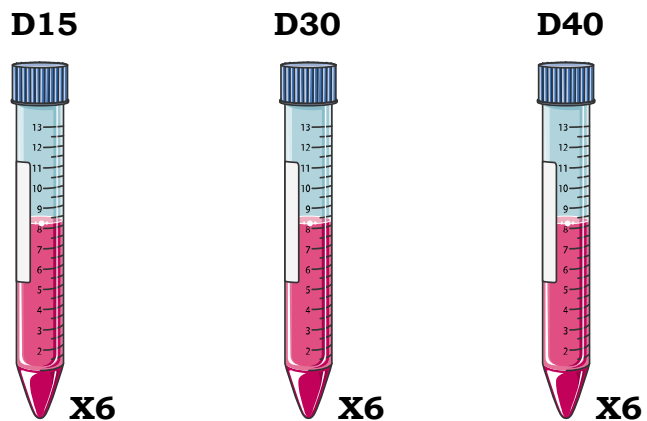
**Normoxia CH**



**Hipoxia CT**



**Hipoxia CH**



**Figura 5-** Representación esquemática del experimento en tres dimensiones.

- Centrifugamos los tubos 8 minutos a 1.200 rpm.

**Medio condrogénico probado:**

- DMEM, 1% P/E; 1% L-Glutamina.
- TGF- $\beta$ 1 10ng/ml.
- Insulina 6.25 $\mu$ g/ml.
- Ácido ascórbico 50nM.

**Preparación de medio condrogénico:**

Preparar 250 ml de DMEM, con 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina e ITS (6.25  $\mu$ g/ml de insulina; 6.25 $\mu$ g/ml de transferrina; 6.25 ng/ml de selenite de sodio).

- 242 ml de DMEM.
- 2.5ml de P/E.
- 2.5ml de L-glutamina.
- 3.125 ml de ITS a 500 $\mu$ g/ml.

Este medio sirve de base y se mantiene a 4°C. En adelante, antes del cambio de medio, se junta la concentración final de TGF- $\beta$  de 10 ng/ml y de ácido ascórbico 50nM final (los stocks de TGF- $\beta$  son preparados y alicuotados).

El ácido ascórbico debe ser preparado justo antes de su utilización:

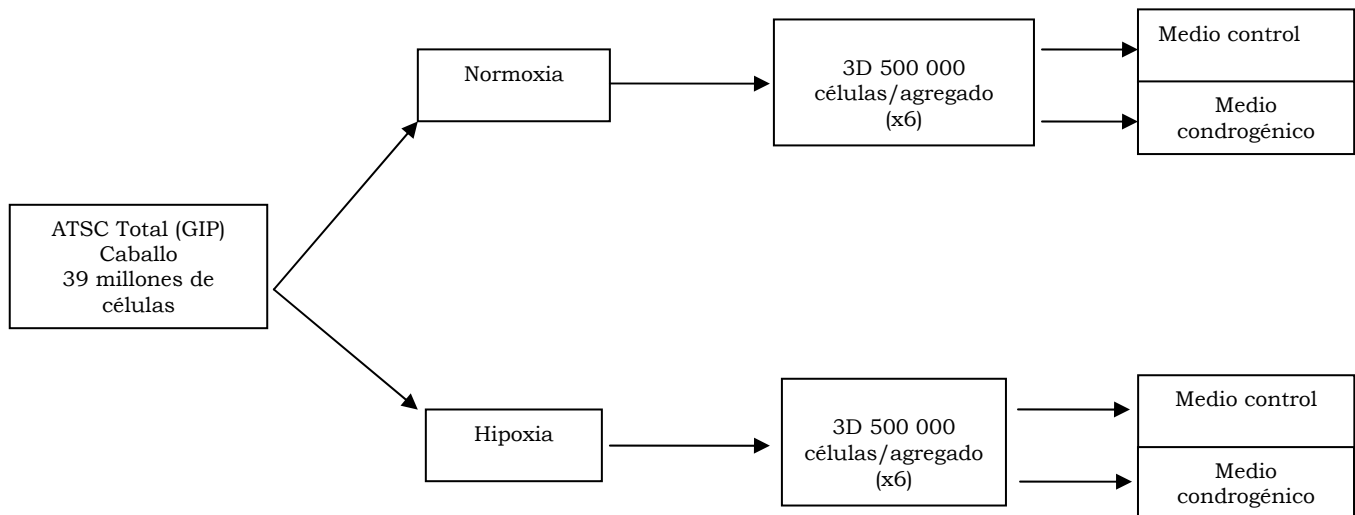
- Solución a 1M
  - o Pesar 1.98 g de ácido ascórbico.
  - o Diluir en 10 ml de medio base (DMEM, 1% P/E, 1% L-glutamina).
- Solución a 1mM
  - o Pipetar 5 $\mu$ l de solución a 1M.



- Diluirlos en 5 ml de medio de base (DMEM, 1%P/E, 1% L-glutamina).
- solución a 1 $\mu$ M
  - Pipetar 5 $\mu$ l de solución a 1mM.
  - Diluirlos en 5 ml de medio de base (DMEM, 1%P/E, 1% L-glutamina y ITS).

Para 50 ml de medio:

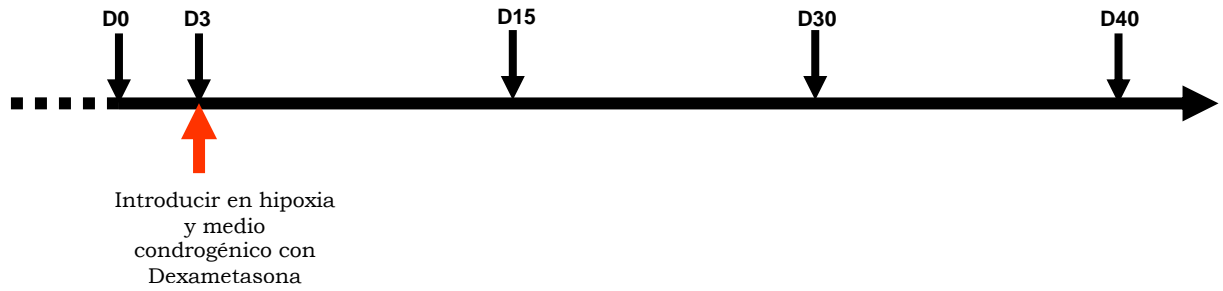
- Recoger 10 $\mu$ l da solución stock de TGF- $\beta$  a 50 $\mu$ g/ml.
- Recoger 2 ml de solución de ácido ascórbico a 1 $\mu$ M.



### **C.6.2.- Medio condrogénico con dexametasona**

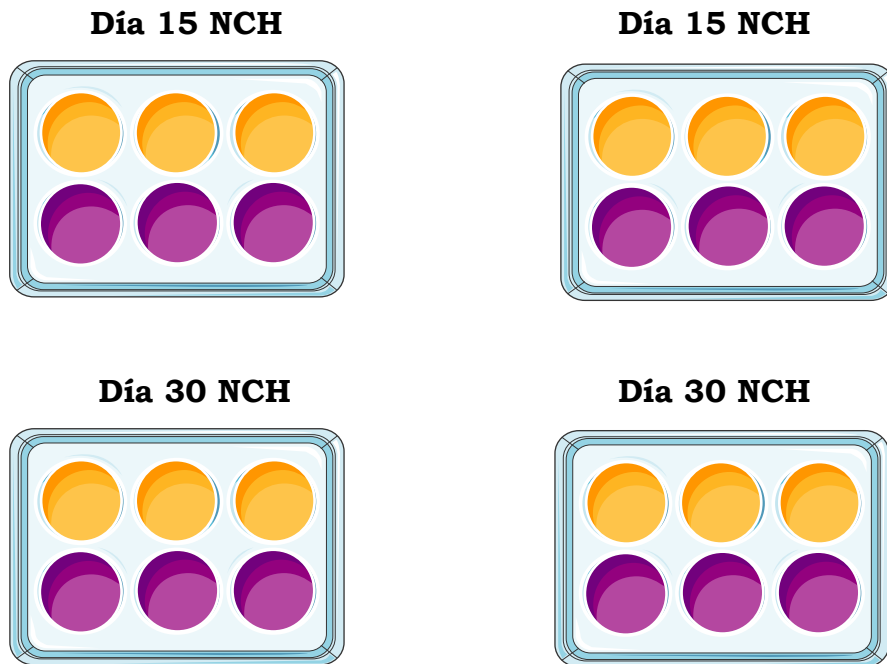
#### **Condiciones probadas:**

- 3D (agregados) versus 2D.
- Medio control versus medio condrogénico + Dexametasona.
- Normoxia versus hipoxia.
- D3, 15, 30 y 40.



Preparación de la placa de cultivo de 6 pocillos:

- 3 pocillos control y 3 en medio condrogénico.
- Para cada tiempo de cultivo una placa en hipoxia y otra en normoxia (Fig. 6).

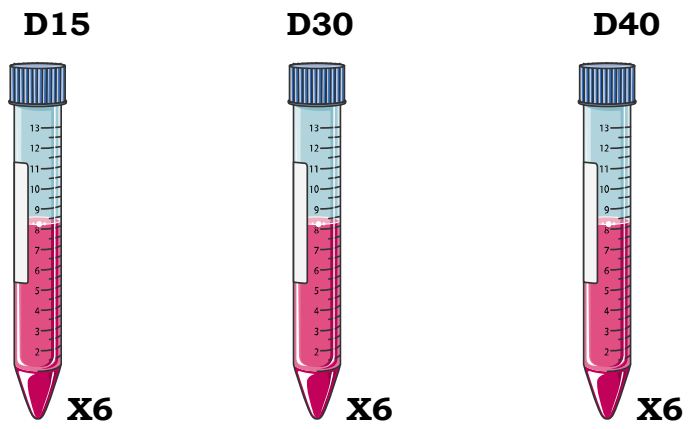


**Figura 6-** Representación esquemática del experimento de diferenciación condrogénica en dos dimensiones.

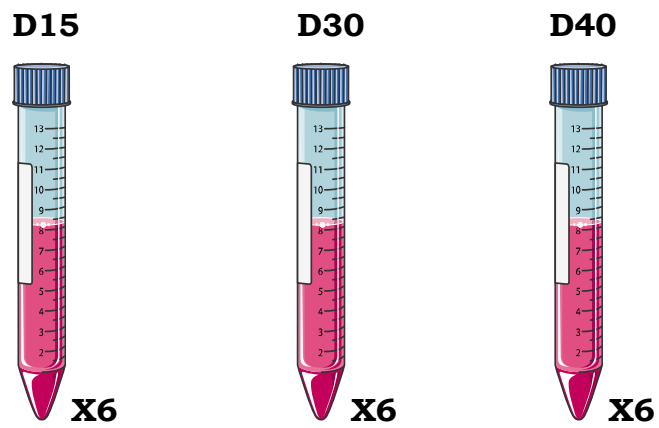
Preparación de los cultivos tridimensionales (96 tubos):

- o Mezclar bien 500.000 células/mL
- o Repartimos la suspensión siguiendo el esquema (Fig. 7) que mostramos a continuación:

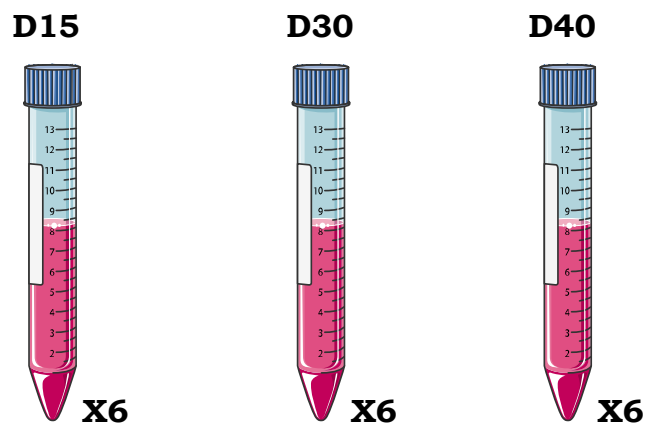
**Normoxia CT**



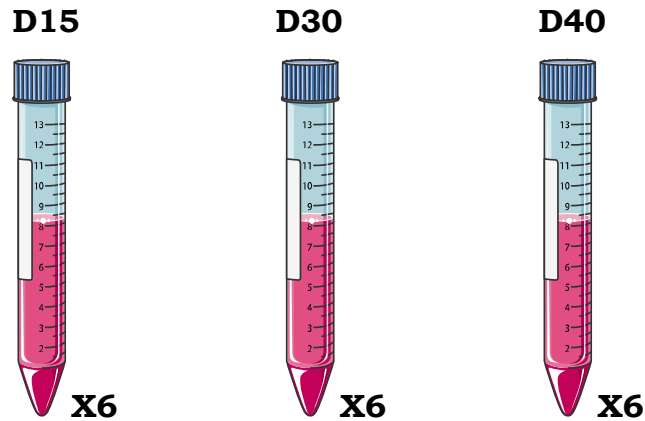
**Normoxia CH**



**Hipoxia CT**



## **Hipoxia CH**



**Figura 7-** Representación esquemática del experimento en tres dimensiones.

- Centrifugamos los tubos 8 minutos a 1.200 rpm.

### **Medio condrogénico probado en 2D y 3D**

- DMEM, 1% P/E; 1% L-Glutamina.
- TGF- $\beta$ 1 10ng/ml.
- ITS (6.25  $\mu$ g/ml de insulina; 6.25 $\mu$ g/ml de transferrina; 6.25ng/ml de sodio selenite).
- Ácido ascórbico 50nM.
- Dexametasona (Sigma D4902):  $10^{-8}$  M.

Toda la preparación de los cultivos 3D y del medio condrogénico se realiza de la misma manera que hemos descrito en el apartado C.5.1, añadiendo dexametasona preparada como indicamos a continuación.

### **Preparación de la solución madre de dexametasona a $1 \times 10^{-4}$ M (51 ml):**

- Pesar 2 mg en un tubo de 50 ml en la campana.
- Añadir 51 ml de etanol (con la ayuda de una jeringa) y agitar hasta lograr su disolución completa.
- Congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , estable durante 12 meses.

- **Preparación de la solución de dexametasona a  $1 \times 10^{-6}$  M (51 ml):**
  - Añadir 0.5 ml en un tubo de 50 ml estéril en la campana.
  - Completar hasta 50 ml (adición de 49.5 ml) con PBS estéril.
  - Aliquotar en cantidades de 5 ml.
  - Congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , estable seis meses o hasta la fecha de expiración de la solución madre.

Para 50 ml de medio:

- Recoger 10  $\mu\text{l}$  de la solución stock de TGF- $\beta$  a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
- Recoger 2 ml de la solución de ácido ascórbico a 1  $\mu\text{M}$ .
- Recoger 500  $\mu\text{L}$  de solución de dexametasona a  $1 \times 10^{-6}\text{M}$ .
- Entre 47,5 mL de medio.

### **C.7.- TÉCNICAS HISTOLÓGICAS (Gabe, 1968)**

Se llavaron a cabo las siguientes técnicas histológicas:

#### **C.7.1.-Hematoxilina-eosina**

#### **C.7.2.-Azul de Alcian**

#### **C.7.3.-Tricrómica de Masson (TM)**

## **4.- RESULTADOS**



## **4.1.- INFLUENCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS CONDROCITOS AURICULARES DEL CONEJO**

### **4.1.1.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR *in situ***

Para conocer mejor las características de la matriz extracelular auricular de conejo y sus relaciones con las células, realizamos estudios *in situ*, mediante técnicas de microscopía óptica, microscopía electrónica inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y biología molecular.

#### ***Caracterización morfológica***

##### *Microscopía óptica*

En el cartilago auricular de conejo, teñido con la coloración Hematoxilina y Eosina (H/E), se observaron 3 regiones o zonas morfológicamente distintas: una zona pericondral, una zona limítrofe y una zona central. En la zona pericondral las células presentan un fenotipo típicamente fibroblástico. En la zona limítrofe, que se localiza adyacente al pericondrio, las células tienen un citoplasma más abundante. La zona central contiene condrocitos de gran tamaño, redondeados, totalmente diferenciados.

También se puede observar una diferencia significativa de tinción entre la matriz interterritorial (que aparece más clara) y la matriz territorial que se nota más intensamente teñida. Se puede observar, asimismo, que existen varios condrocitos circundados por la misma matriz territorial, que pertenecen, por lo tanto, al mismo grupo isógeno (Fig. 9A).

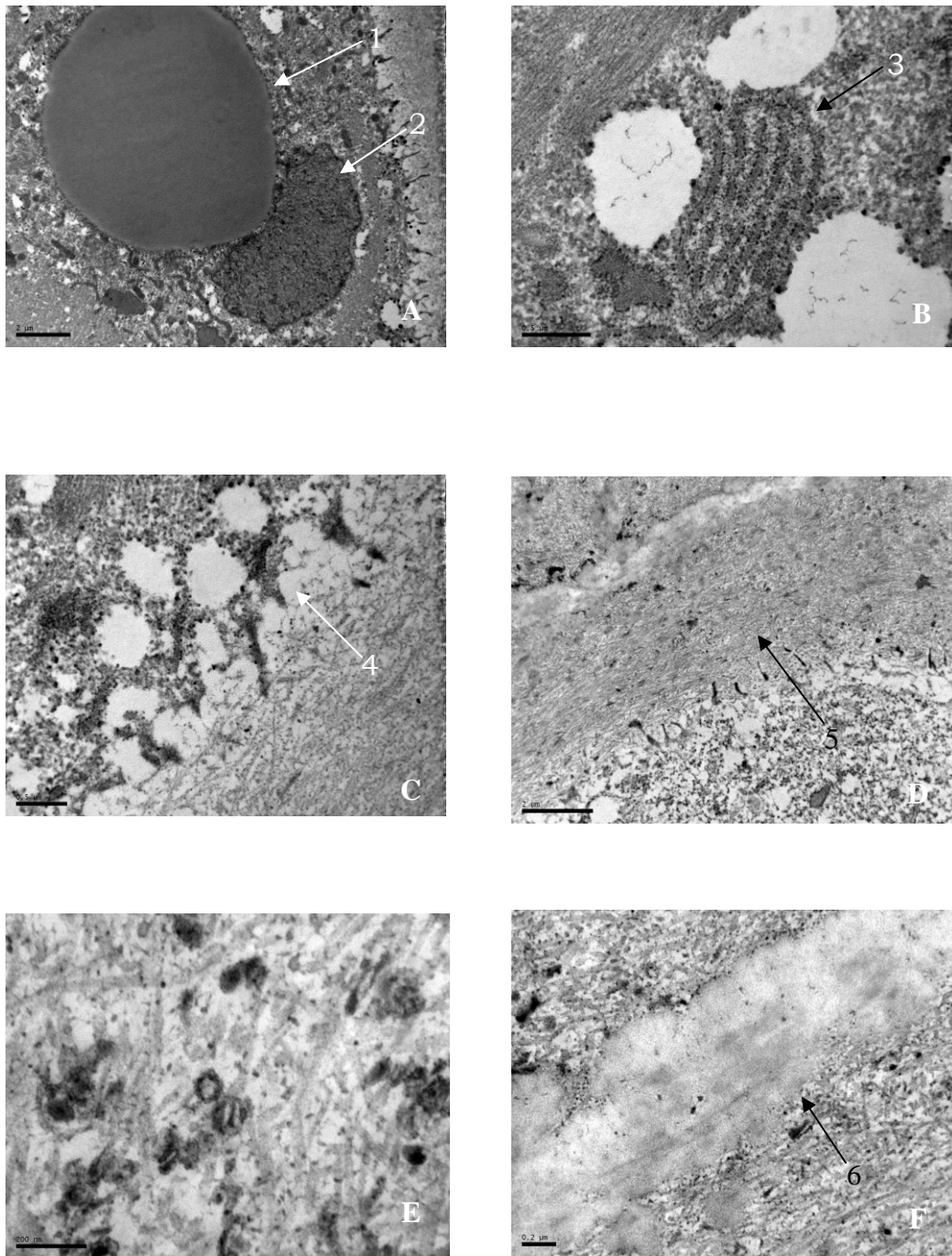


*Microscopía electrónica de transmisión*

Por microscopía electrónica de transmisión, estudiamos las distintas regiones del cartílago auricular. Las células de la *zona pericondral* presentaron contornos irregulares, mostrando numerosas depresiones y extensiones digitiformes; estas características se observaron también, en las otras zonas. La matriz de la zona pericondral está formada fundamentalmente por fibrillas de colágeno, pudiendo aparecer fibras elásticas maduras.

La *zona limítrofe* por su parte, contiene células con un citoplasma más abundante rico en organelas: mitocondrias, complejo de Golgi, retículo endoplasmático granular con cisternas moderadamente dilatadas. Se pueden observar pequeñas vesículas de contenido denso, acumulado predominantemente en la zona del aparato de Golgi y vesículas de mayor tamaño similares a los lisosomas. En el citoplasma aparecen cantidades variables de glicógeno formando gránulos. En la zona más profunda, los condrocitos contienen una o más gotas citoplasmáticas de lípidos. En la región más periférica, las células se encuentran envueltas por una cápsula de matriz pericelular, rica en fibras.

La *zona central* contiene condrocitos grandes, redondeados, totalmente diferenciados, normalmente con una única gota lípidica citoplasmática de gran tamaño (10-20  $\mu\text{m}$ ). La gota lípidica ocupa la mayor parte de la célula, de forma que desplaza al citoplasma y el núcleo hacia la periferia (Fig. 8A). Se observan pocas mitocondrias y un retículo endoplasmático rugoso bastante desarrollado (Fig. 8B). Junto a la membrana plasmática aparecen bastantes vesículas, conteniendo precursores de la matriz extracelular (Fig. 8C). Al igual que describíamos en la región limítrofe, la cápsula de matriz pericelular es ocupada por fibrillas de colágeno (Figs. 8D y 8E). En la matriz interterritorial puede observarse la elastina como un componente amorfo separado y dividido por microfibrillas (Fig. 8F).



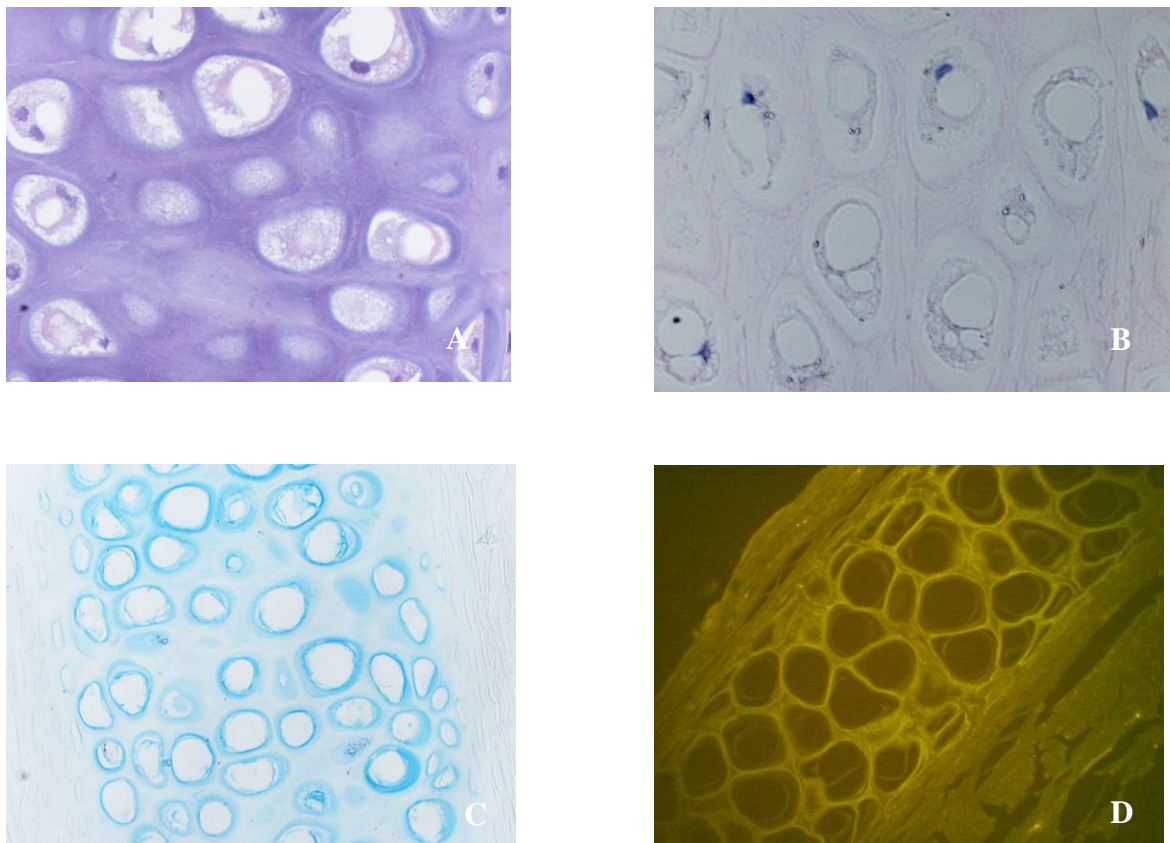
**Figura 8-** Microfotografías del cartilago auricular de conejo obtenidas por microscopia electrónica de transmisión. A. Condrocito auricular presentando una vacuola lipídica de gran tamaño(1) con núcleo aplastado en forma de riñón(2); B. Se puede observar RER bastante desarrollado (3); C. Membrana plasmática liberando componentes de la matriz presentando microvilosidades (4); D. Imagen de la cápsula pericelular (5) envolviendo el condrocito; E. Vesículas en la matriz pericelular; F. Fibras elásticas (6) en la matriz interterritorial.

**Caracterización de la distribución de los componentes de la matriz extracelular e integrinas de membrana**

Constatamos por el método de van Gieson, que en la matriz territorial e interterritorial, se pueden observar con relativa facilidad las fibras elásticas (Fig. 9B).

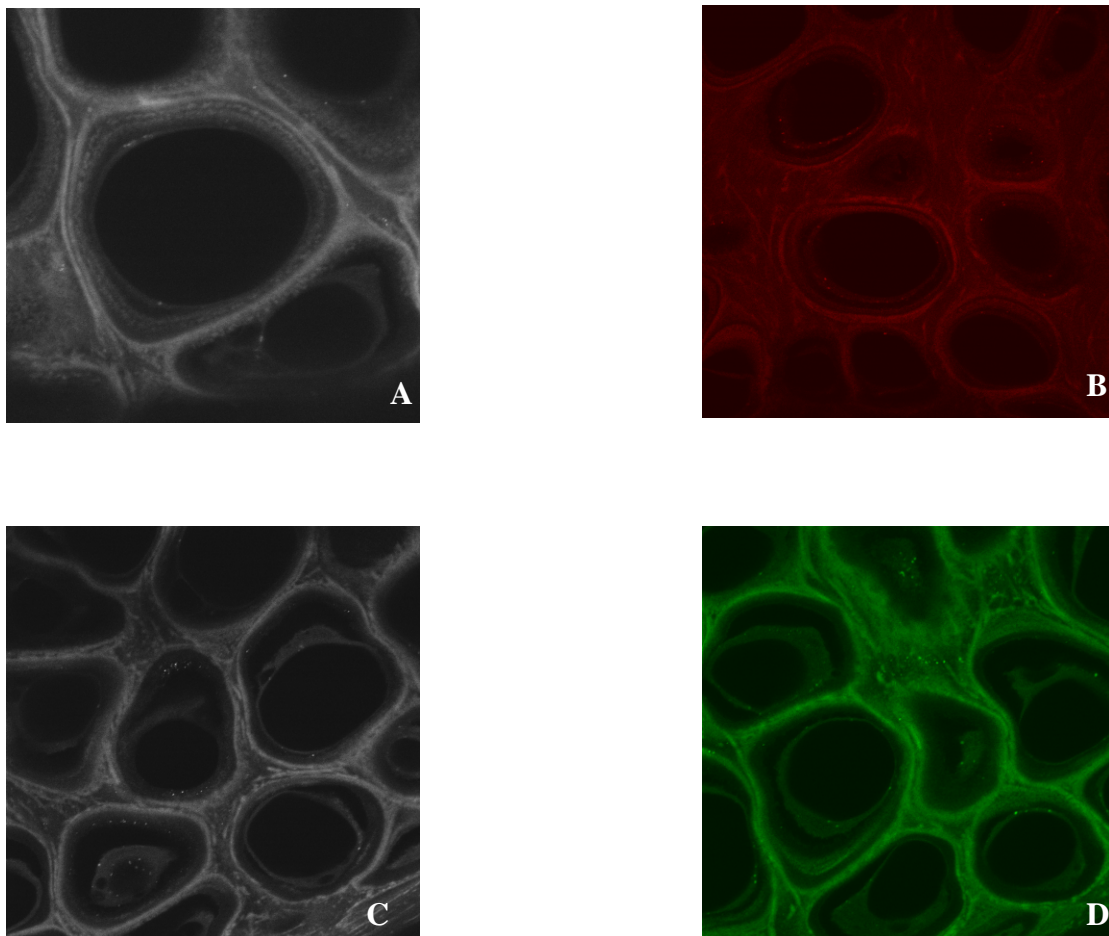
Cuando estudiamos la presencia de proteoglicanos constatamos una fuerte tinción en la región de la matriz territorial (Fig. 9C).

Utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta se ha demostrado que el cartílago auricular expresaba colágeno tipo II. Se observó una fuerte expresión de este tipo de colágeno en la matriz pericelular, una menor tinción en la matriz territorial e interterritorial y no fue observada coloración alguna en el pericondrio (Fig. 9D).



**Figura 9-** Estructura del cartilago adulto A. Apariencia general con Hematoxilina y Eosina (x100); B. Coloración de van Gieson para las fibras elásticas (x100); C. Coloración con Azul de Alcian (x50); D. Inmunofluorescencia indirecta para el colágeno tipo II (x25).

También utilizamos técnicas de inmunofluorescencia directa para determinar la expresión de integrinas en el cartílago auricular, siendo observada por microscopía confocal. Se constató la presencia de fluorescencia positiva del cartílago auricular de conejo para las integrinas probadas, concretamente: las subunidades beta 1, la  $\alpha 5$ , la  $\beta 3$  y para el heterodímero  $\alpha v \beta 3$  (Figs. 10 A-D).



**Figura 10-** Expresión de integrinas en el cartílago auricular adulto, observado en microscopio confocal. A. Marcación positiva para la subunidad  $\beta$  ( $\times 180$ ); B. Marcación positiva para la subunidad  $\alpha 5$  ( $\times 100$ ); C. Marcación positiva para la subunidad  $\beta 3$  ( $\times 120$ ); D. Marcación positiva para el heterodímero  $\alpha v \beta 3$  ( $\times 130$ ).

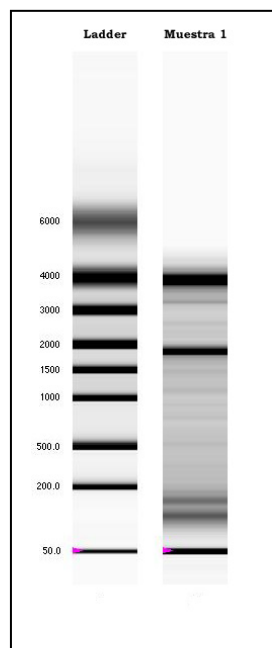
La fluorescencia positiva para estas integrinas se observó principalmente en la membrana de los condrocitos y en el anillo pericelular, mientras que en la matriz interterritorial no se observa tinción significativa.

**Inicio de la biosíntesis de los componentes de la matriz extracelular**

Después de la realización de la extracción de ARN, evaluamos la cantidad y pureza de las muestras a analizar mediante los siguientes métodos:

*Cantidad y pureza del ARN por electroforesis automática- Experion®*

Por electroforesis automática observamos que la cantidad y calidad del ARN obtenido era adecuada. El ratio entre la subunidad 18S/28S era buena (Fig. 11 y Tabla 15).



**Figura 11-** Electroforesis automática de muestra obtenida a partir de cartilago auricular de conejo.

**Tabla 15-** Datos cuantitativos obtenidos por electroforesis automática.

Fragmento	Nombre	T Inicio	T Final	Área	% del Área Total
<b>1</b>	<b>18S</b>	<b>40.25</b>	<b>42.60</b>	<b>8.54</b>	<b>7.54</b>
<b>2</b>	<b>28S</b>	<b>46.90</b>	<b>49.55</b>	<b>12.71</b>	<b>11.22</b>

Área de ARN- 113.31

Concentración de ARN -33.62 ng/ $\mu$ l

Ratio [28S/18S]-1.49

Por RT-PCR semicuantativa se estudió la expresión de colágeno tipo II y agrecano en el cartílago auricular de conejo (Fig. 12). Se utilizó la expresión de estos genes como marcador es de diferenciación del cartílago. Observamos una expresión positiva para el agrecano y colágeno tipo II. Como control positivo se usó la GAPDH y negativo el agua.



**Figura 12** – RT-PCR semi-cuantitativa de ARN obtenido de oreja de conejo. X. ADN Ladder; 1.Agua; 2 y 3.Cartilago de conejo GAPDH; 4 y 5. Cartilago conejo col2a1; 6 y 7. Cartilago de conejo Agc1.

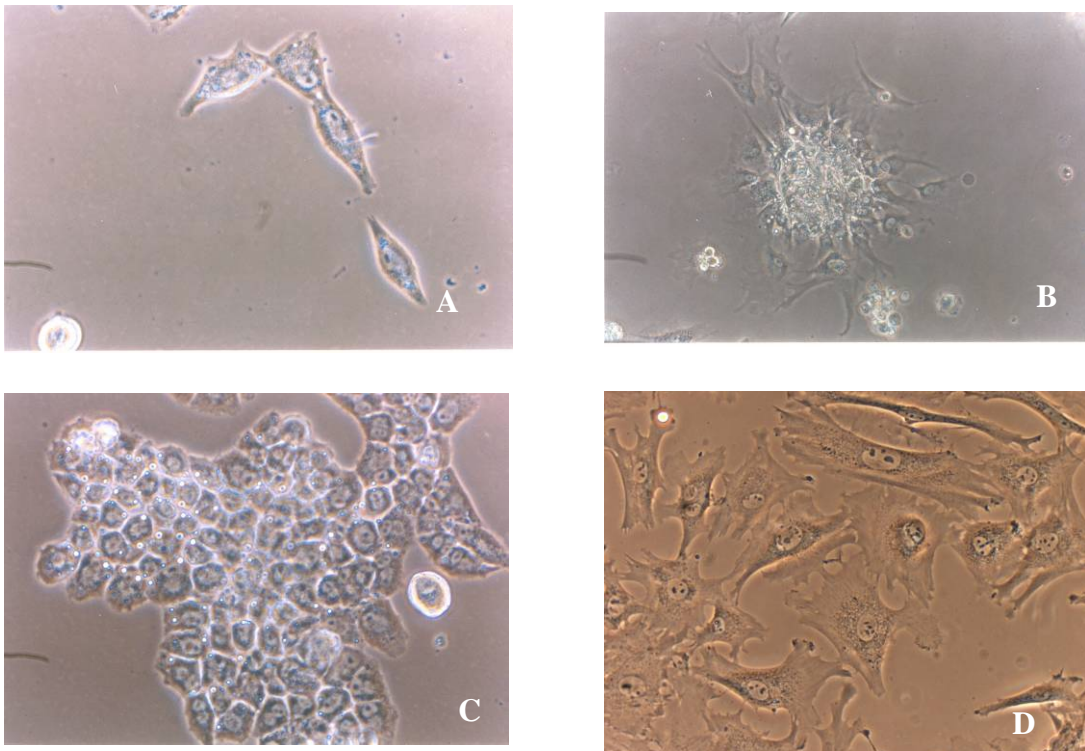
#### **4.1.2.- CULTIVO, OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CARTILAGINOSAS**

##### **4.1.2.1.- Cultivos de condrocitos**

###### *A) Células cultivadas sobre superficies plásticas*

Los condrocitos auriculares en primer lugar fueron digeridos para aislarlos de su matriz extracelular, y posteriormente cultivados, observándose que las células se mantenían en suspensión las primeras 48 horas. A continuación, comienzan a adherirse al sustrato plástico perdiendo su forma redondeada característica, tomando una forma fibroblástica, desarrollando filipodios y adquiriendo forma de huso (Fig. 13A). En este momento, las células empiezan a interactuar entre ellas formando condensaciones (Fig. 13B). Las células del centro de las condensaciones se redondean, produciendo matriz refringente, sin embargo, las células de la periferia mantienen una apariencia fibroblástica. Cuando forman una monocapa completa, las células se redondean y aparecen poligonales (Fig. 13C).

En los pases siguientes los condrocitos auriculares demostraron tener una buena capacidad de proliferación, pero con una capacidad limitada de producción de matriz, por lo que parece que se encuentran en un estado más desdiferenciado. Cuando las células se someten a varios pases empiezan a aumentar su tamaño, aparecen diversas prolongaciones y disminuye su capacidad de proliferación, tomando una forma pleomórfica característica (Fig. 13D). Estas células tienen cierta dificultad para formar una monocapa, y no originan condensaciones.



**Figura 13-** Cultivos de condrocitos auriculares de conejo en diferentes momentos. A.Células después de 48 horas en cultivo, con apariencia fibroblástica (x50); B. Inicio de la formación de condensaciones (x25); C.Células empezando a alcanzar la confluencia(x50); D.Células pleomórficas después de varios pases (x50).

### B) *Células cultivadas en agregación*

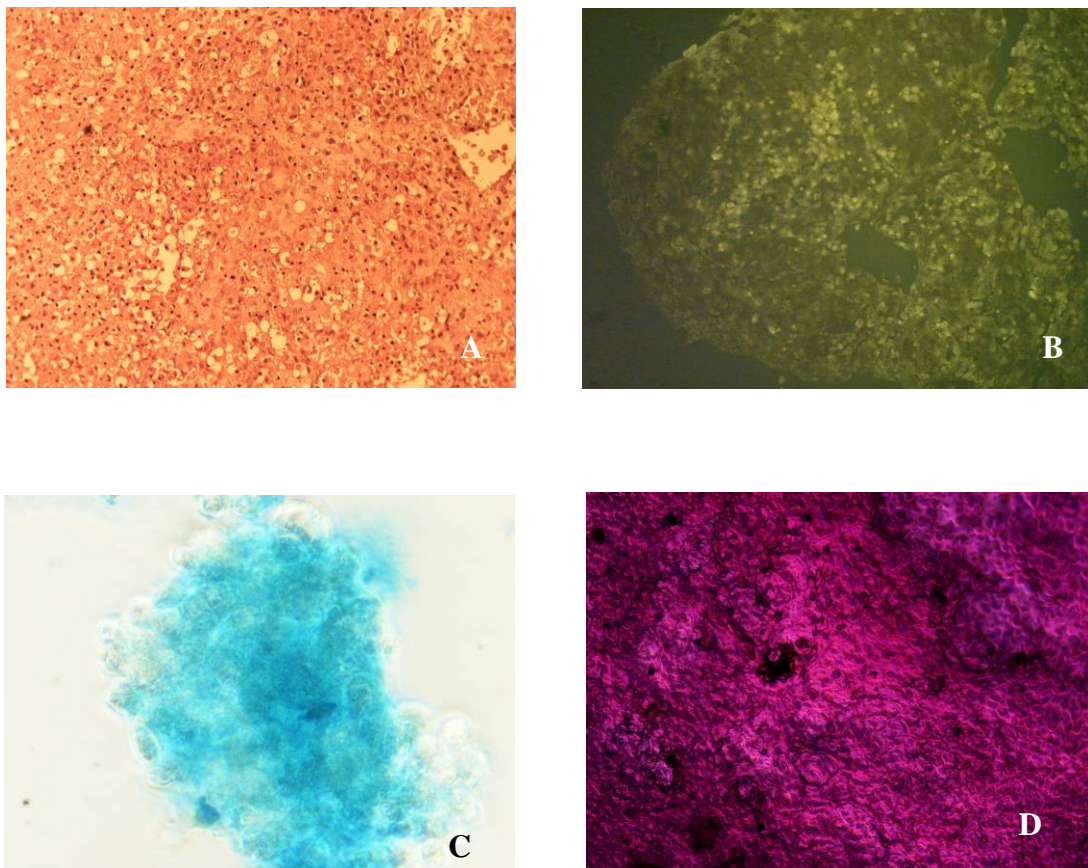
Cuando estas células desdiferenciadas fueron cultivadas sobre agarosa durante diferentes períodos de tiempo formaban agregados. Se observó que estos agregados aumentaron de tamaño por hiperproducción de matriz extracelular refringente (Fig. 14a). Comprobamos que las células de la parte central del agregado presentaban una forma más redondeada, mientras que las células de la periferia mostraban una forma más fibroblástica.



#### 4.1.2.2.- Distribución de las proteínas de la matriz e integrinas

Con el fin de caracterizar la composición de esta matriz extracelular, investigamos la presencia de colágeno tipo II, proteoglicanos y fibras elásticas en monocapa después de tres pases (P3) y en agregados formados con el mismo tipo celular (P3). Las células P3 en monocapa no mostraron síntesis de colágeno tipo II, ni proteoglicanos, ni fibras elásticas.

Por su parte, el agregado (Fig. 14A) demostró tener una mayor expresión de colágeno tipo II en la zona central de las condensaciones (Figure 14B). Observamos que estos agregados producían grandes cantidades de matriz extracelular, concretamente proteoglicanos en la región pericelular (Fig. 14C) y también algunas fibras elásticas en la matriz extracelular que se tiñen por lo método de van Gieson (Fig. 14D).



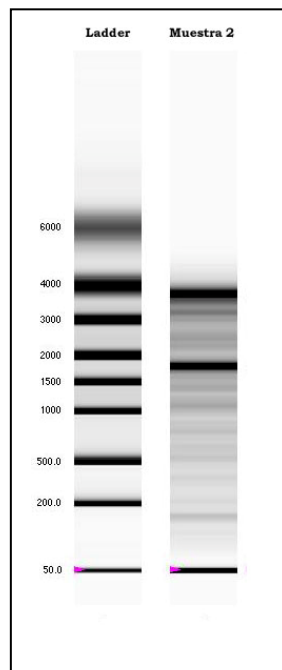
**Figura 14-** Imágenes de los estudios de la composición de la matriz extracelular en los agregados. A.Imagen de HE (x25); B. Expresión del colágeno tipo II por inmunofluorescencia indirecta (x25); C. Azul de Alcian de los agregados(x50); D. Localización de las fibras elásticas van Gieson(x25).

*Análisis de la biosíntesis de componentes de la matriz extracelular*

Después de la extracción de ARN, evaluamos la cantidad y pureza de las muestras a analizar por biología molecular.

*Cantidad y pureza del ARN por electroforesis automática- Experion®*

Por electroforesis automática observamos que la cantidad y calidad del ARN obtenido era bueno. El ratio entre la subunidad 18S/28S era buena (Fig. 15 y Tabla 16).



**Figura 15-** Electroforesis automática de una muestra obtenida a partir de células cultivadas en monocapa y agregados de cartilago auricular de conejo.

**Tabla 16-** Datos cuantitativos obtenidos por electroforesis automática.

Fragmento	Nombre	T Inicio	T Final	Área	% del Área Total
<b>1</b>	<b>18S</b>	<b>40.20</b>	<b>42.25</b>	<b>17.42</b>	<b>10.49</b>
<b>2</b>	<b>28S</b>	<b>46.50</b>	<b>48.90</b>	<b>21.26</b>	<b>12.80</b>

Área de ARN- **166.09**

Concentración de ARN- **49.28 ng/ $\mu$ l**

Ratio [28S/18S]-**1.22**

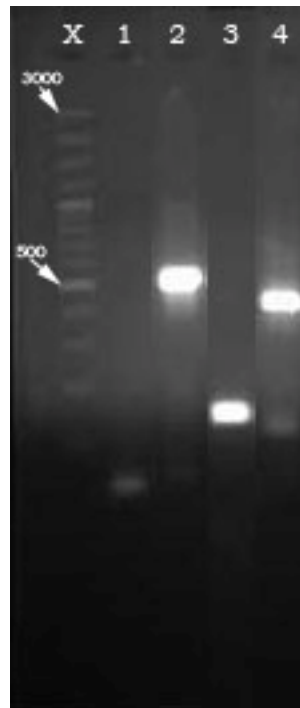
Se estudió por RT-PCR, la expresión de colágeno tipo II y de agrecano en células cultivadas durante 3 pases y de agregados formados a partir de células igualmente cultivadas durante 3 pases. Se evidenció que existía una expresión positiva para el colágeno y agrecano en ambos casos, siendo evidente una amplificación mayor en los agregados (Figs. 16 y 17).

**P3**



**Figura 16** – RT-PCR de P3. X. ADN ladder; 1. Agua; 2.Gapdh; 3.Colágeno tipo II; 4.Agrecano.

### P3 Agregados

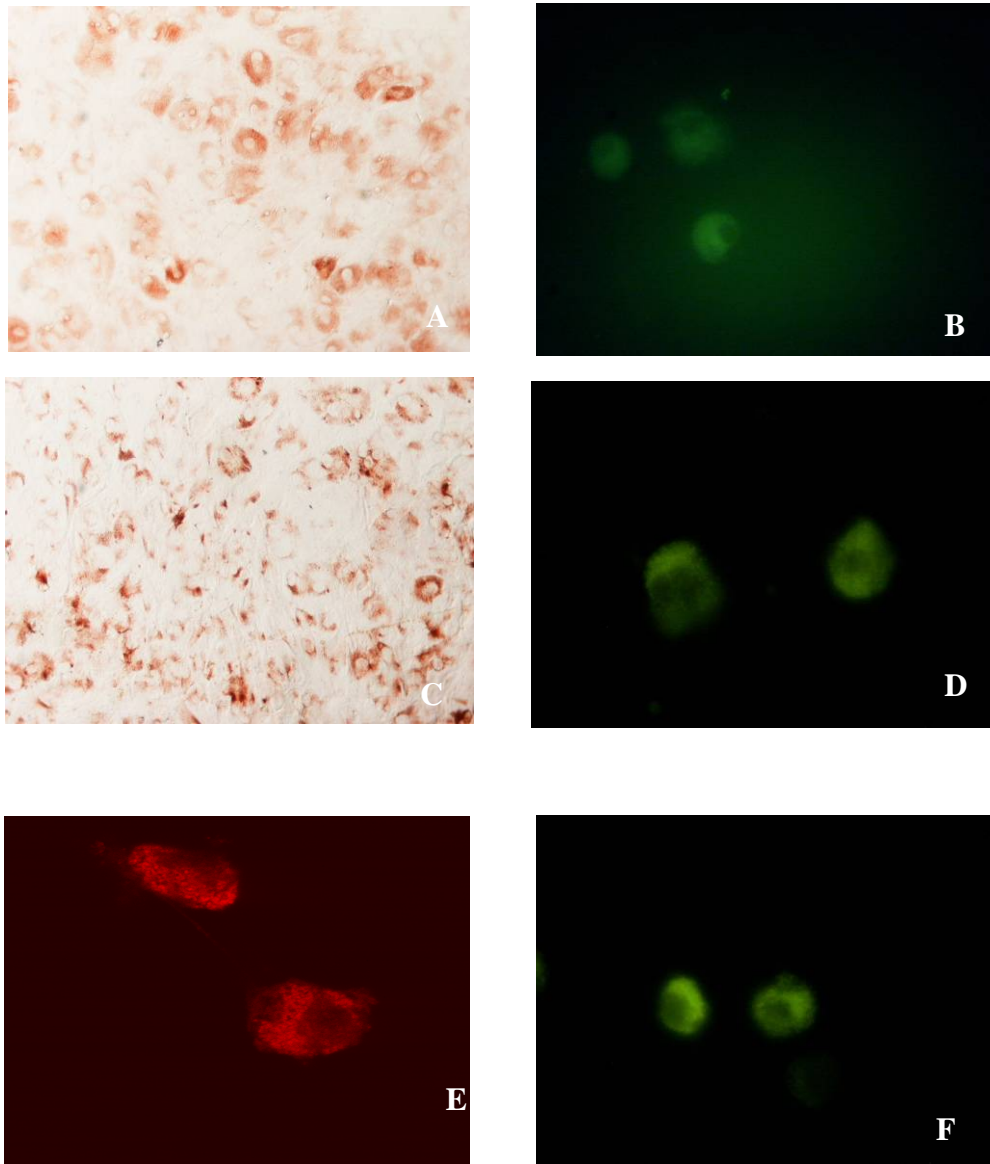


**Figura 17-** RT-PCR de P3 agregados. X.ADN ladder; 1.Agua; 2.Gapdh; 3.Colágeno; 4. Agrecano.

#### 4.1.2.3.- Expresión de las integrinas en células en monocapa

Para evidenciar la presencia de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 3$  en monocapas de condrocitos, utilizamos técnicas de inmunohistoquímica. Se observó la elevada expresión de estas integrinas en la membrana celular (Figs. 18 A y C).

Para complementar los resultados anteriormente obtenidos, realizamos inmunofluorescencia directa para determinar la expresión de integrinas, que observamos después en microscopía de fluorescencia y confocal. Por estos métodos se ha demostrado una expresión positiva, en los condrocitos cultivados para las integrinas  $\alpha \beta 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 3$  (Figs. 18 B, D, E y F). Observamos que la expresión de la integrina  $\alpha \beta 3$  fue relativamente menor, con menos células marcadas.



**Figura 18-** Imágenes de los estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para las integrinas. A.β1 por inmunohistoquímica en monocapa (x25); B.β1 por inmunofluorescencia directa (x50); C. β3 en monocapa por inmunohistoquímica (x25); D. β3 por inmunofluorescencia directa (x50); E. α5 por inmunofluorescencia directa y microscopía confocal (X90); F.αvβ3 por inmunofluorescencia directa (x50).

## **4.2.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES OBTENIDAS A PARTIR DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATA**

### **4.2.1.- OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MULTIPOTENTES**

#### **4.2.1.1.-Cultivo de células multipotentes sobre superficies plásticas**

##### *Microscopía óptica*

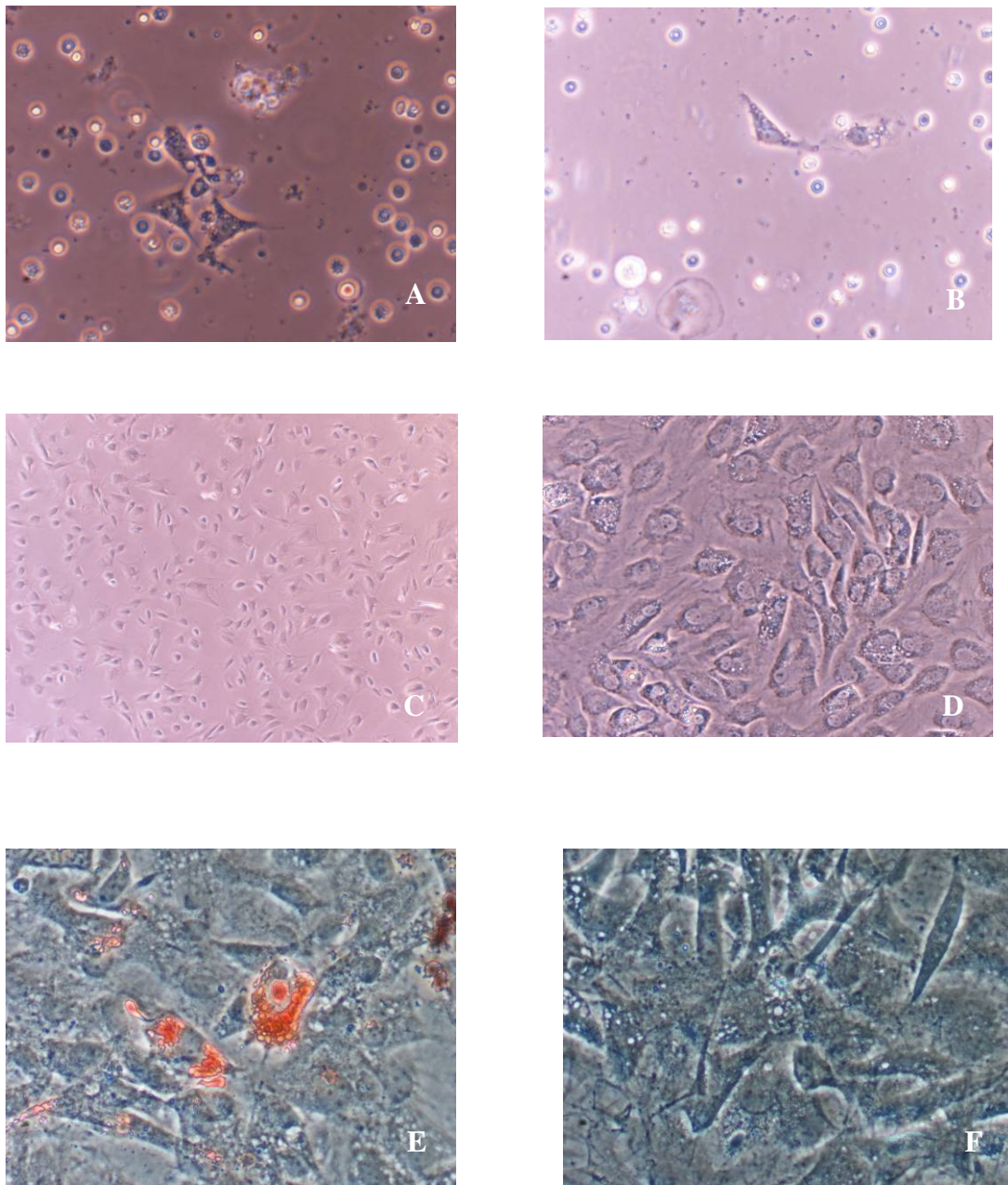
La disociación de la grasa abdominal, debe realizarse a 37° C, y en agitación continua, ya que la grasa flota; de tal manera que la mayor parte de los adipocitos maduros, al acumular lípidos en su interior flotan, permitiendo, de esta forma, su separación por centrifugación en lo que denominamos fracción estromal vascular celular (FEV).

Al microscopio óptico podemos observar que la fracción estromal vascular, es una población heterogénea. Podemos distinguir claramente los eritrocitos del resto de células nucleadas.

Cultivamos la fracción estromal vascular y constatamos que la mayor parte de las células de esta fracción no se pegan. Concretamente, los eritrocitos, que se reconocen por ser células de tamaño menor y de forma discoidal, no se adhieren al sustrato. Las células de mayor tamaño son las que se adhieren a las superficies plásticas.

Tras cuatro horas de cultivo, las células empiezan a adherirse a las superficies plásticas y adoptan distintas morfologías, presentando dos formas distintas: algunas ligeramente redondeadas y con vacuolas (pre-adipocitos) y otras células de apariencia fibroblástica y triangular con prolongaciones. Este último tipo celular es el más abundante (Figs. 19 A-D).

Con el objetivo de comprobar si entre las células cultivadas existía una presencia elevada de adipocitos, realizamos en varios pases la tinción Oil red O (específica para teñir células adiposas), observamos una baja tasa de células positivas por pocillo en el pase inicial, pasando a ser negativa al aumentar el número de pases (Figs. 19 E y F).



**Figura 19-** Cultivo de las células adherentes del tejido adiposo. A y B. Células pegadas de aspecto triangular, se puede observar en suspensión los eritrocitos, y otros tipos celulares (x50); C. Cultivo con 120 horas, células de apariencia fibroblástica, alguna célula redonda (x25); D.Células después de alcanzar la confluencia, algunas presentan vacuolas (x50); E.Adipocito en una monocapa concluyente (x100); E. Tinción negativa al azul de Alcian(x100).

Con el aumento del número de pases las células presentaron una morfología similar, transformándose en una población homogénea.

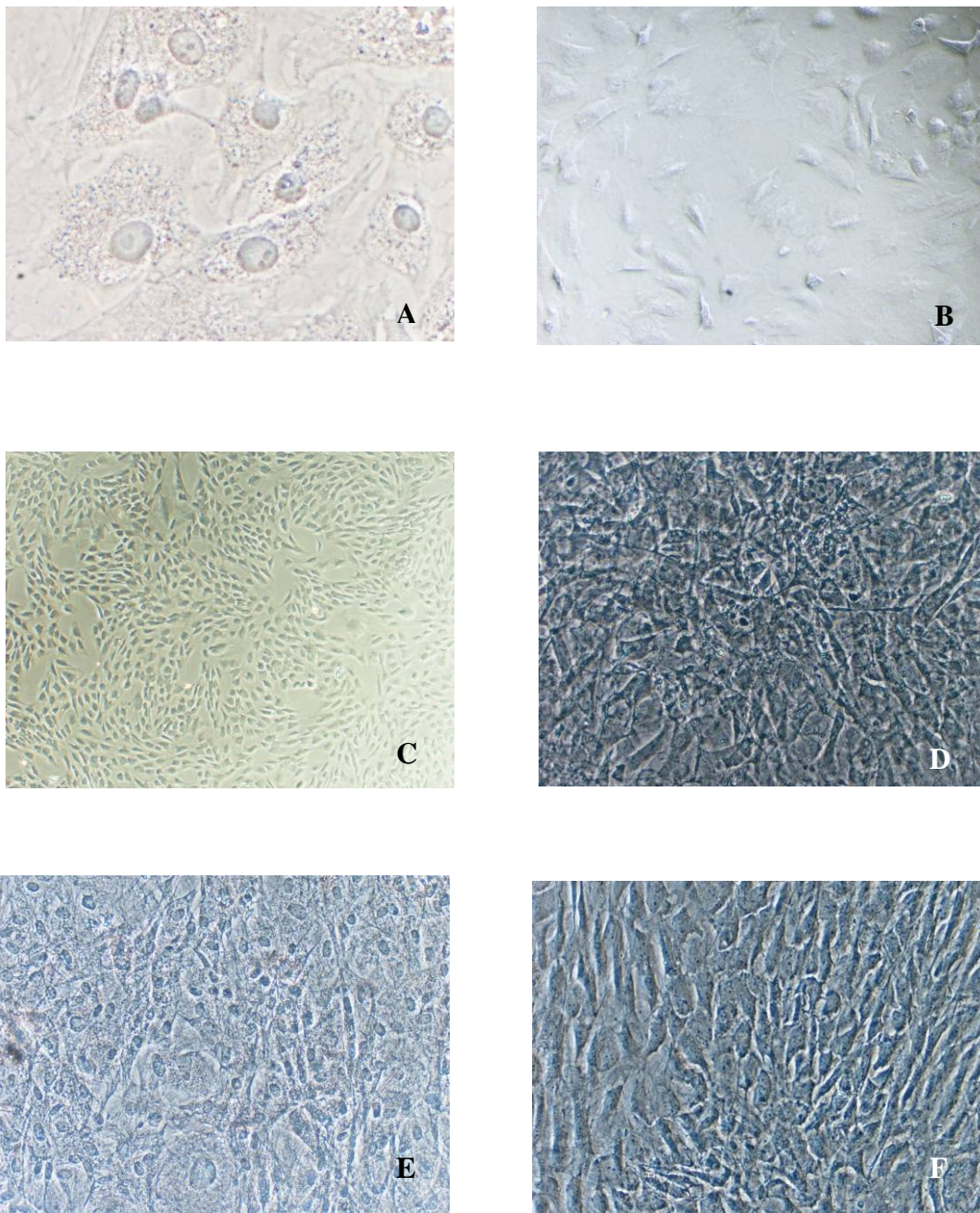
Con la finalidad de intentar observar el comportamiento de estas células en distintas superficies celulares, las cultivamos sobre superficies plásticas tratadas con IBIDI y poli-d-lisina. Cuando las células son cultivadas en placas revestidas con poli-d-lisina, se pegan inmediatamente manteniendo una forma redonda, y con el tiempo emiten prolongaciones. La buena adhesión de las células a estas superficies se reveló importante para las técnicas de inmunofluorescencia, ya que estas superficies no emitían fluorescencia.

Se realizó también la tinción de azul de Alcian (para poner de manifiesto la presencia de proteoglicanos), que apareció negativa en todos los pases.

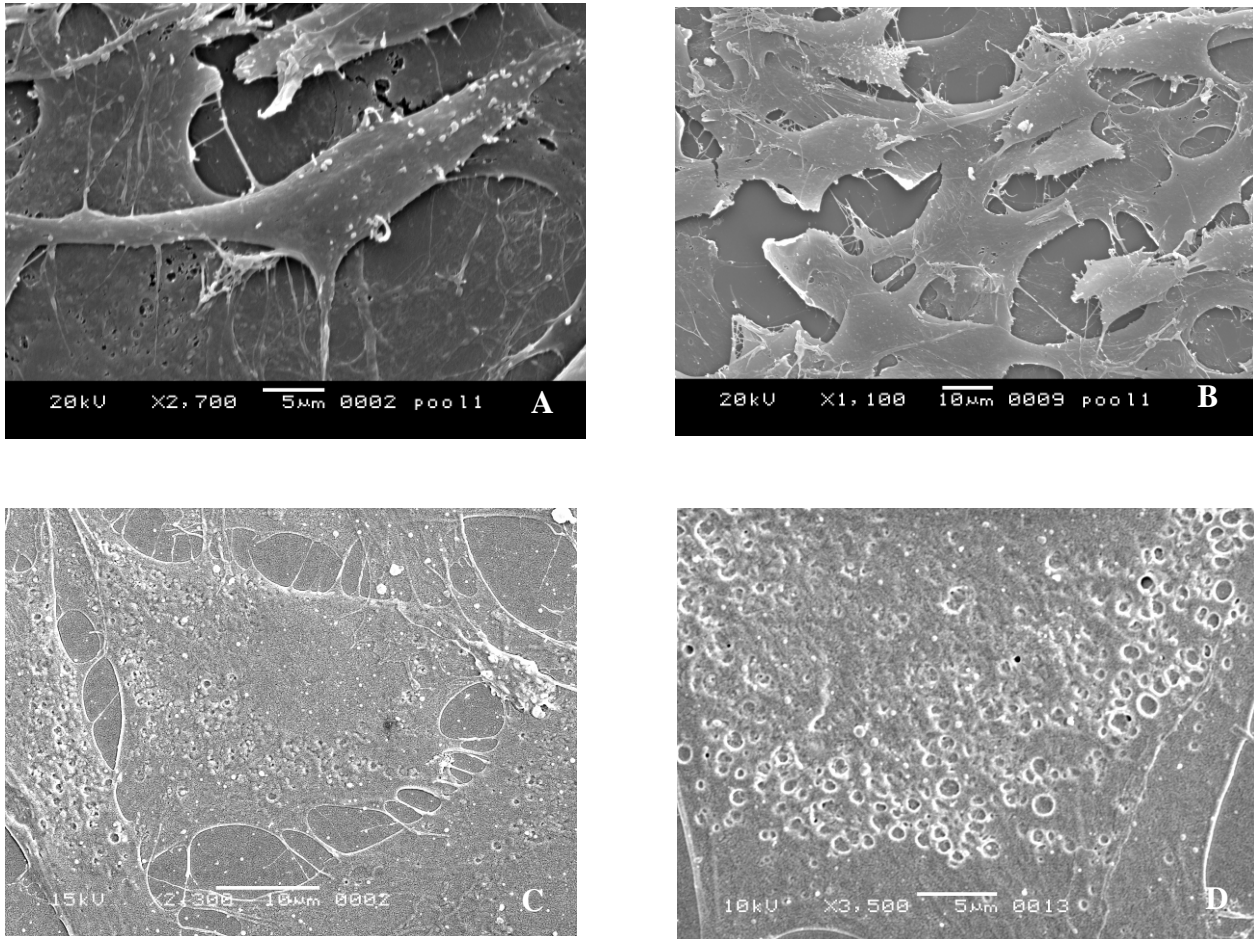
#### *Microscopía electrónica de barrido*

Con el fin de lograr una mejor caracterización del fenotipo de estas células, realizamos pruebas de microscopía de barrido en varios pases. Se observó que las células en los primeros pases presentaban un aspecto fibroblástico característico (Figs. 21 A y B). Después de varios pases se observa un incremento en el número de prolongaciones celulares (Figs. 21 C y D).





**Figura 20-** Células P4 y P7 con aumento de prolongaciones. A. Células P4 con algunas vacuolas y aumento de prolongaciones(x120); B.Células cultivadas en placas IBIDI (x50); C.P4 Tinción Oil red O negativa(x25); D.P4 azul de Alcian (x50); E.Cultivos de P7 Oil Red (x50); F -Cultivos P7 azul de Alcian negativo(x50).



**Figura 21**-Imágenes de microscopía electrónica de barrido. A y B.Células adherentes de la fracción estromal vascular; C y D. Células después de 7 pases.

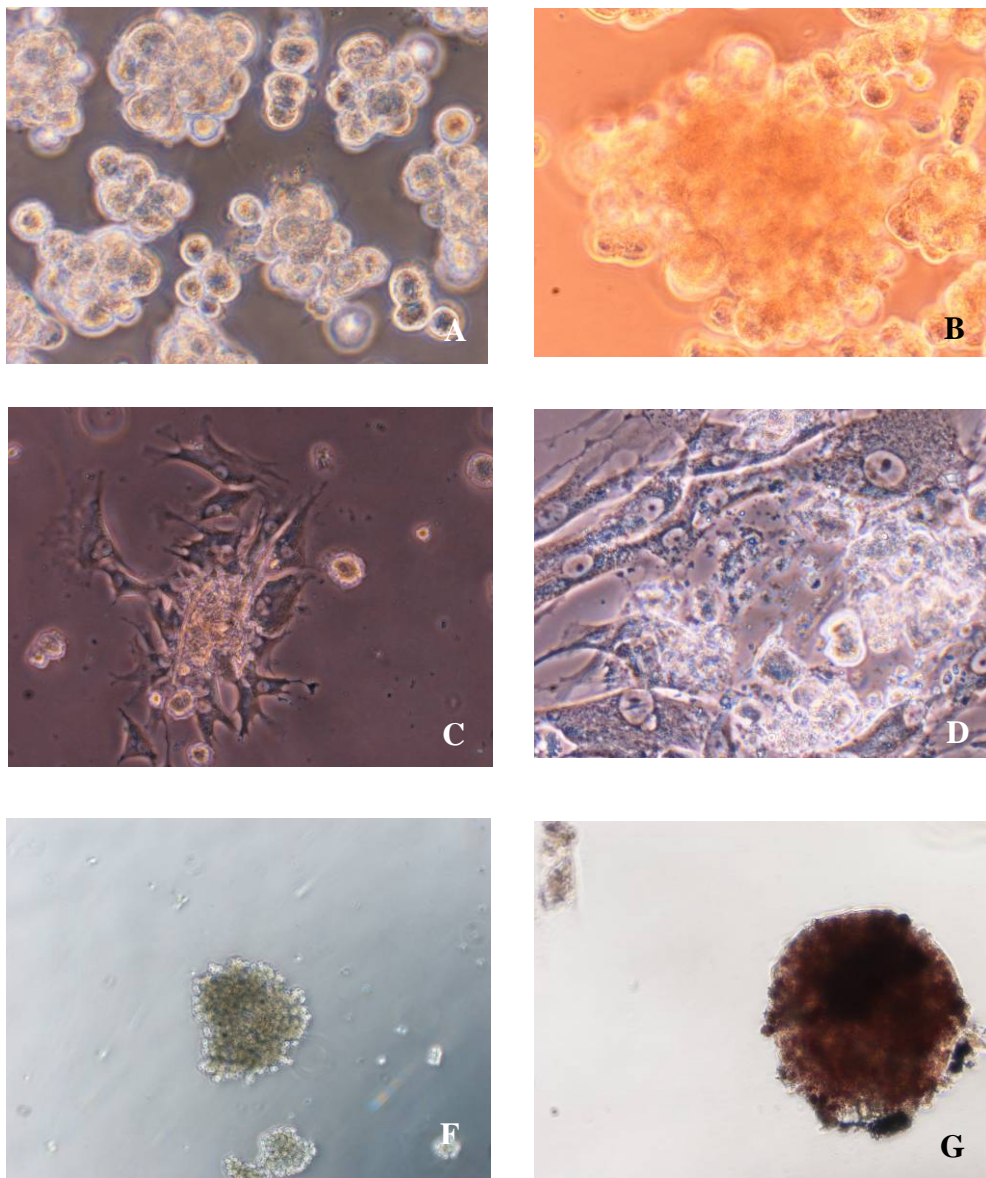
#### **4.2.1.2.- Cultivos en agregación**

Para poder estudiar detalladamente el comportamiento de las células multipotentes obtenidas a partir del tejido adiposo, las cultivamos sobre superficies a las cuales no pudieran adherirse, concretamente sobre el agar al 2% y en tubos falcon de 50 ml.

En estas condiciones el fenotipo experimentó modificaciones claras, transformándose en células redondeadas, y se mantuvieron en suspensión. A partir de las 24 horas inician el proceso de agregación, formando grupos con 4 a 6 células. Al final del segundo día tenemos agregados celulares de dimensiones medias. Observamos que estas células producen gran cantidad de matriz extracelular con relación a las cultivadas en monocapa (Figs. 22 A y B). Cuando comparamos con la matriz producida por cultivos primarios de condrocitos en las mismas condiciones, observamos que la cantidad de matriz producida es sensiblemente inferior.

Cuando estos agregados se cultivan sobre superficies plásticas, no tienen un comportamiento uniforme, algunos de ellos se adhieren formando pequeñas colonias, diferenciadas en el centro y rodeadas por células pleomórficas, mientras que otros, se mantienen en suspensión produciendo matriz extracelular, incluso cuando permanecían en cultivo durante varias semanas, debido posiblemente a las grandes cantidades de lípidos contenidas en su interior (Figs. 22 C y D).

Cuando se sometió a pruebas histoquímicas, la matriz se mostró positiva al Oil red O, principalmente en cultivos prolongados. Cuando quisimos identificar la presencia de proteoglicanos mediante azul de Alcian, observamos que, en agregados cultivados durante tres días no hubo tinción alguna, pero cuando los cultivos se mantenían durante tiempos prolongados, presentaron una tinción ligeramente azulada, pero poco significativa (Figs. 22 F y G).



**Figura 22-** Varias imágenes de agregados formados a partir de CTDTA. A.Agregados formados en agar al cabo de 5 días (x50); B. Agregados formados en agar con 1 semana y media (x50); C y D. Agregados adheridos en superficies plásticas (x100); E.Azul de Alcian en agregados con 3 días (x25); F.Oil red positivas(x25).

## **4.2.2.- EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS**

### **4.2.2.1.- Proliferación y viabilidad**

Se utilizaron animales con una media de edad de 10 +/- 0,7 meses, con un peso medio 511,4 +/- 83,7 gramos, de los cuales se recogió 2,95 +/- 1,7 gramos de tejido adiposo.

Después de disociar el tejido adiposo, se contaron las células nucleadas, para saber el número de células de las que partíamos. El número medio de células inicial era de 300.000 +/- 284.663 células nucleadas, con una viabilidad del 75 %. Las células fueron cultivadas con una densidad de 4.800 células por cm<sup>2</sup>. Se observó una correlación lineal entre el peso de animal y la cantidad de grasa recogida de 0,95 (p<0,05; n=5).

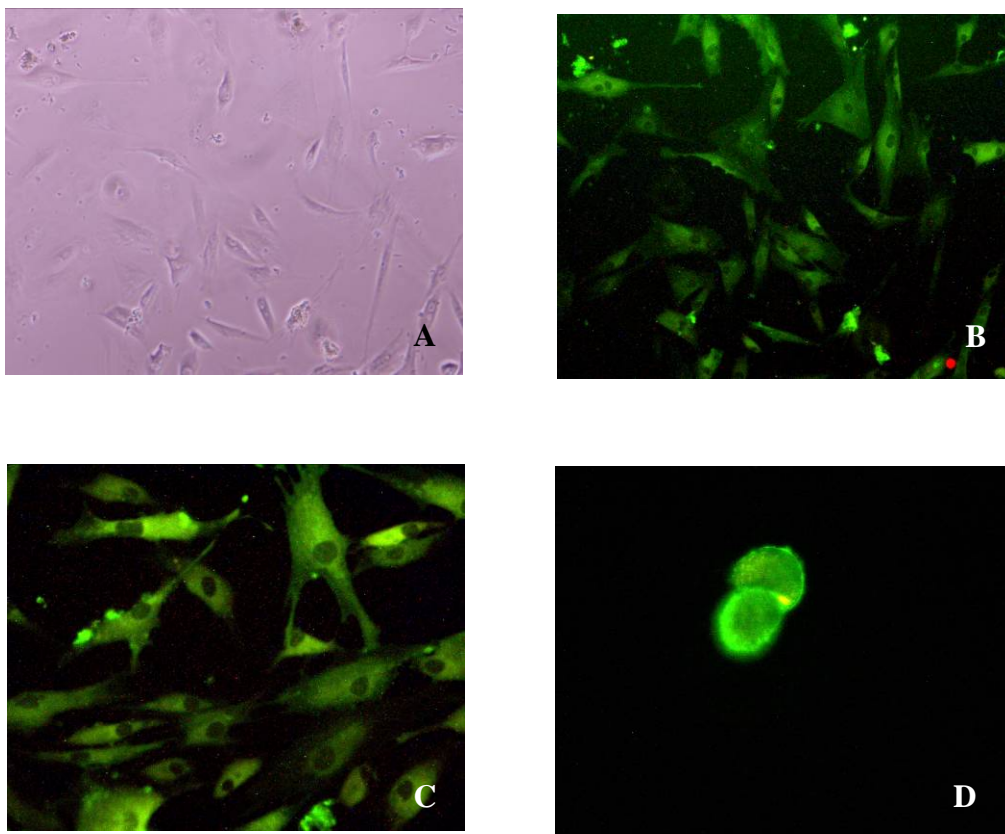
Tras 48 horas en cultivo, las células comienzan a proliferar, de tal manera que en 5-8 días alcanzan la confluencia. El número de células aumenta durante estos 8 días cerca de 26,9 veces. La multiplicación se lleva a cabo a buen ritmo, aumentado varias veces su número, duplicando la población en cerca de 50 horas. Estas células presentan una viabilidad siempre superior al 90 %. Estas células fueron mantenidas en cultivo hasta seis meses consecutivos, manteniendo elevadas tasas de proliferación celular.

#### **4.2.2.2.- Caracterización de las células a través de marcadores de superficie celular**

Para poder caracterizar estos tipos celulares presentes en cultivo, realizamos técnicas de fluorescencia con marcadores de superficie celular y de multipotencia.

##### **4.2.2.2.1.- Inmunofluorescencia directa**

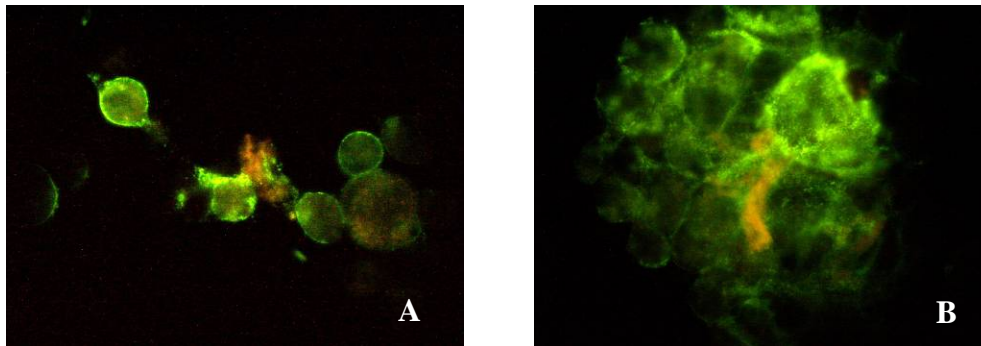
Observamos por inmunofluorescencia directa la expresión positiva para el marcador CD29 en células troncales de grasa, cuando eran cultivadas durante 4 pases (Figs. 23 A-D).



**Figura 23-** Expresión de CD29 por inmunofluorescencia directa. A. Microscopía óptica de contraste de fases (x50); B y C. CD29 se advierte un aumento de la fluorescencia de la membrana, inmunofluorescencia en células cultivadas sobre placas IBIDI (x50); D. Inmunofluorescencia directa en células en suspensión (x50).

**4.2.2.2.2.- Inmunofluorescencia indirecta**

Observamos por inmunofluorescencia indirecta la expresión positiva para el marcador CD73 en células troncales de grasa, cuando se cultivan durante 4 pases (Figs. 24 A y B).



**Figura 24-** Inmunofluorescencia indirecta para el marcador CD73, con células troncales de grasa de rata. A. Células individualizadas(x50); B. En agregación (x50).

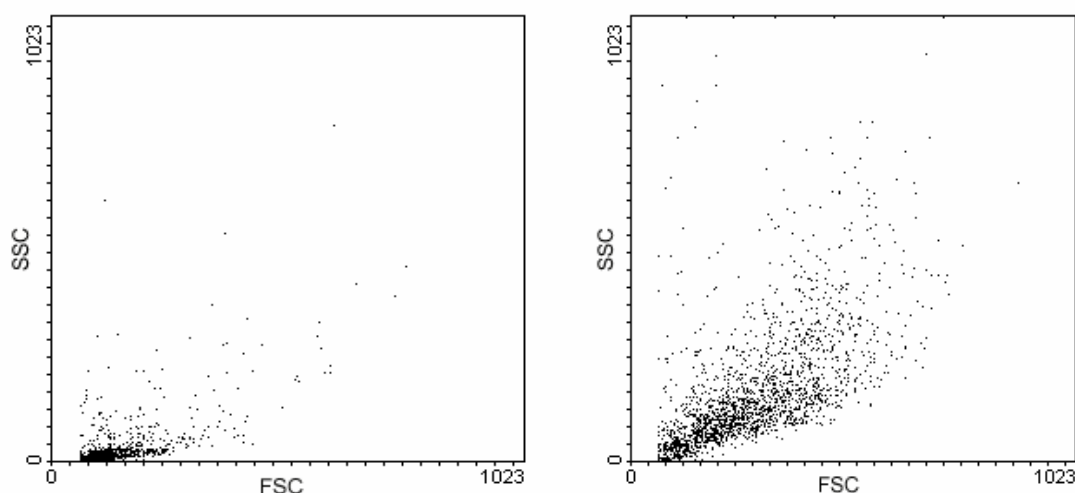
#### 4.2.2.2.3.- Citometría de flujo

Realizamos estudios por citometría de flujo, con el fin de intentar cuantificar si tienen lugar modificaciones en las células a lo largo del período de cultivo, concretamente en la expresión de los marcadores de superficie celular CD29, CD61 y CD73. Para ello se localizó la población celular de estudio tal y como se ha descrito en el capítulo correspondiente al material y métodos.

##### 4.2.2.2.3.1.- Tamaño y complejidad

Pretendíamos averiguar se existía una variación de tamaño y complejidad en las células en el transcurso del tiempo de cultivo, ya que este hecho estaría asociado con cambios morfológicos significativos.

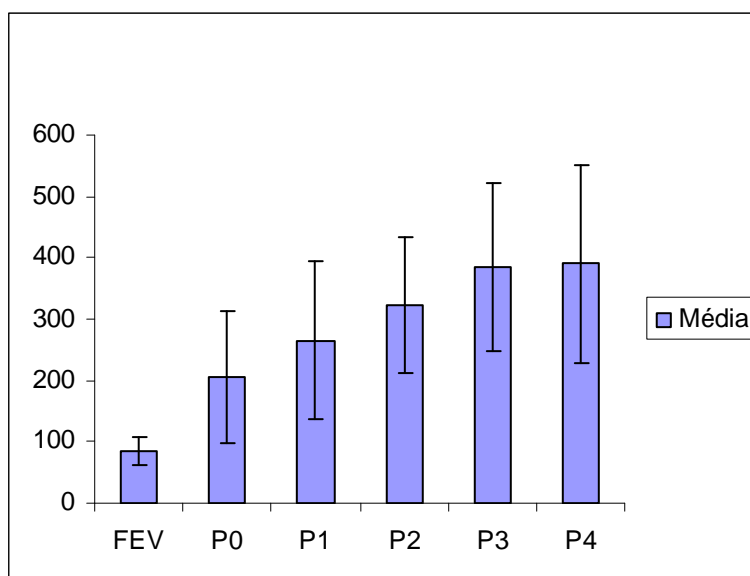
Por comparación directa de los *Dot Blot* de la fracción estromal vascular y P4 (Fig. 25), conseguimos concluir que las células de mayor tamaño presentes en la fracción vascular son las que proliferan. Estos datos son coincidentes con que en esta fracción nos encontráramos con una población más heterogénea.



**Figura 25-** *Dot Blot* de CTDTA en diferentes pases. En el gráfico de la izquierda observamos en el *Dot Blot* las células FEV, y en el de la derecha las células en el P4.

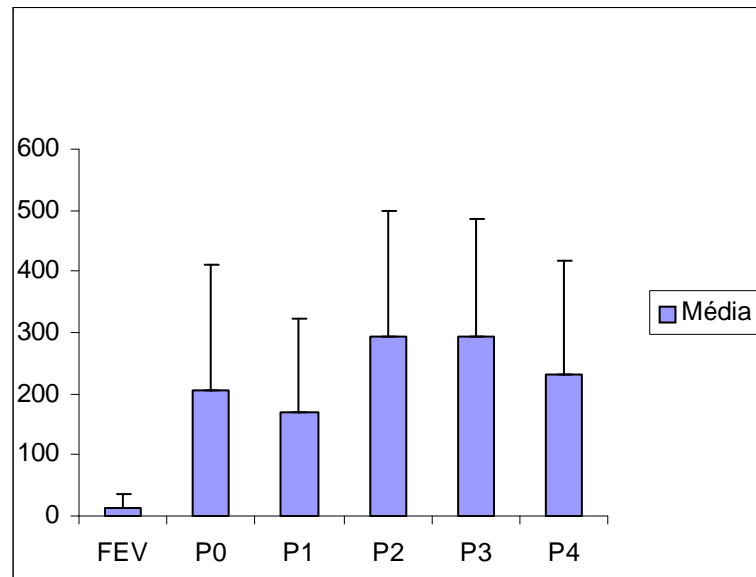


Observamos un aumento de la media del tamaño a lo largo de los pases (Fig. 26). Utilizando el test *t* de *Student* constatamos que el aumento de la media del tamaño de las células, es estadísticamente muy significativo ( $p < 0,001$ ). Se nota un aumento de tamaño bastante acentuado entre la FEV y los otros pases. Las diferencias entre los pases finales son menores, demostrando una uniformidad mayor de la población a partir de P2.



**Figura 26-** Gráfico que representa los aumentos de tamaño con los pases. Las diferencias son muy significativas ( $p < 0,001$ ) y con excepción de P3 y P4 que difieren a nivel más elevado ( $p < 0,01$ ).

Con relación a la complejidad se advierte también una gran diferencia entre la media de la fracción estromal vascular y los otros pases (Fig. 27). Las diferencias entre los pases no presentaron un patrón definido, sin embargo, las diferencias eran estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ), con la excepción de P2 y P3. Se nota alguna uniformidad también a partir de P2.

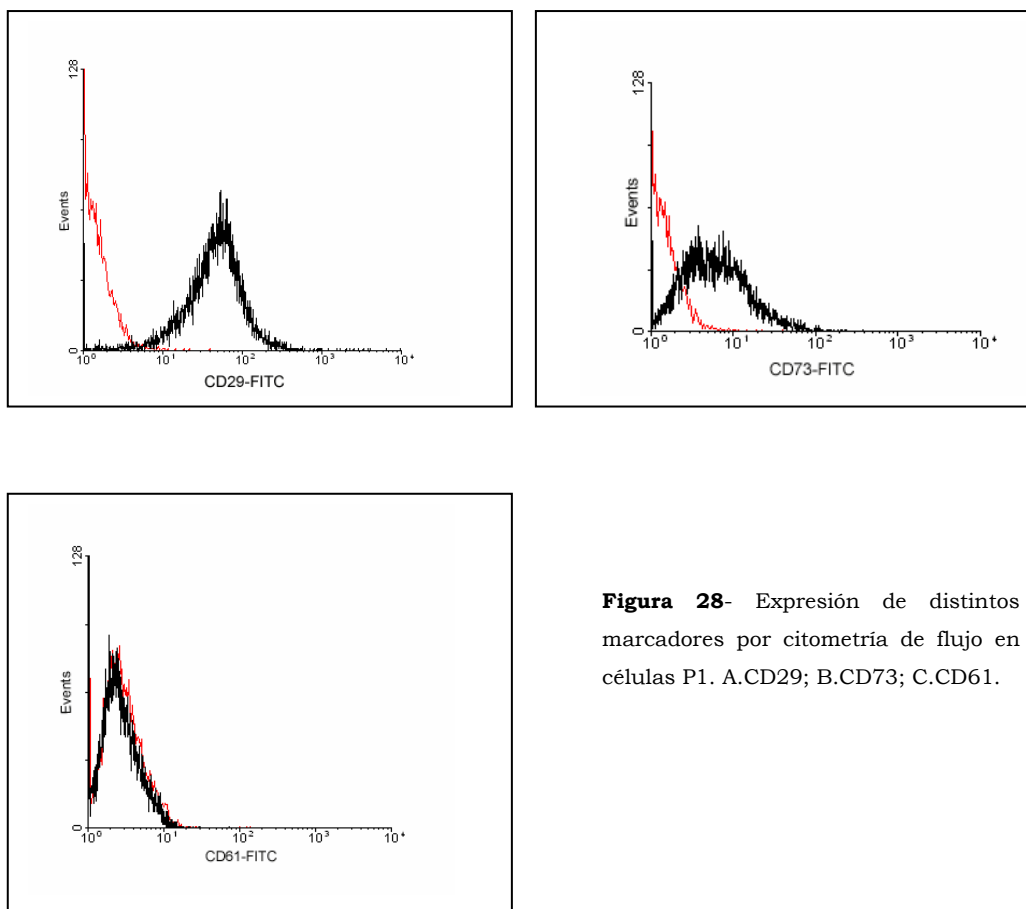


**Figura 27-** Gráfico que representa la complejidad con los pases. Las diferencias son muy significativas ( $p < 0,001$ ), con excepción de la diferencia entre el P2 y P3, que no es significativa.

#### 4.2.2.2.3.2.- Expresión de CD29, CD61 y CD73

##### A. Identificación de la expresión de los marcadores por citometría de flujo

Antes de empezar con la cuantificación de los marcadores propiamente dichos, se procuró hacer un barrido por citometría, para confirmar y cuantificar los resultados obtenidos previamente por inmunofluorescencia. Identificamos por citometría de flujo, marcadores de células estromales en células P0 y de multipotencia, concretamente el CD29 (integrina Beta 1) y CD 73, que se expresó significativamente por inmunofluorescencia directa y citometría de flujo (Fig. 28). También determinamos la presencia de CD61 (Integrina Beta 3), que no se expresó.



**Figura 28-** Expresión de distintos marcadores por citometría de flujo en células P1. A.CD29; B.CD73; C.CD61.

*B. Variaciones de los marcadores CD29 y CD73 en los distintos pases*

En este apartado intentamos cuantificar por citometría de flujo, la expresión de los marcadores que previamente habíamos encontrado positivos (CD29 y CD73) en diversos pases. Observamos un aumento significativo en la expresión de los marcadores CD29 de la FEV, para el P0 y para el P1, siendo que a partir del P2 la casi totalidad de las células expresaba el marcador (Tabla 17). En cuanto al marcador CD73 se observó un aumento constante y también muy significativo a lo largo de los pases. Utilizando el test Z para la comparación de proporciones, identificamos diferencias siempre estadísticamente muy significativas ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 17-** Expresión de marcadores de células troncales a lo largo de los pases.

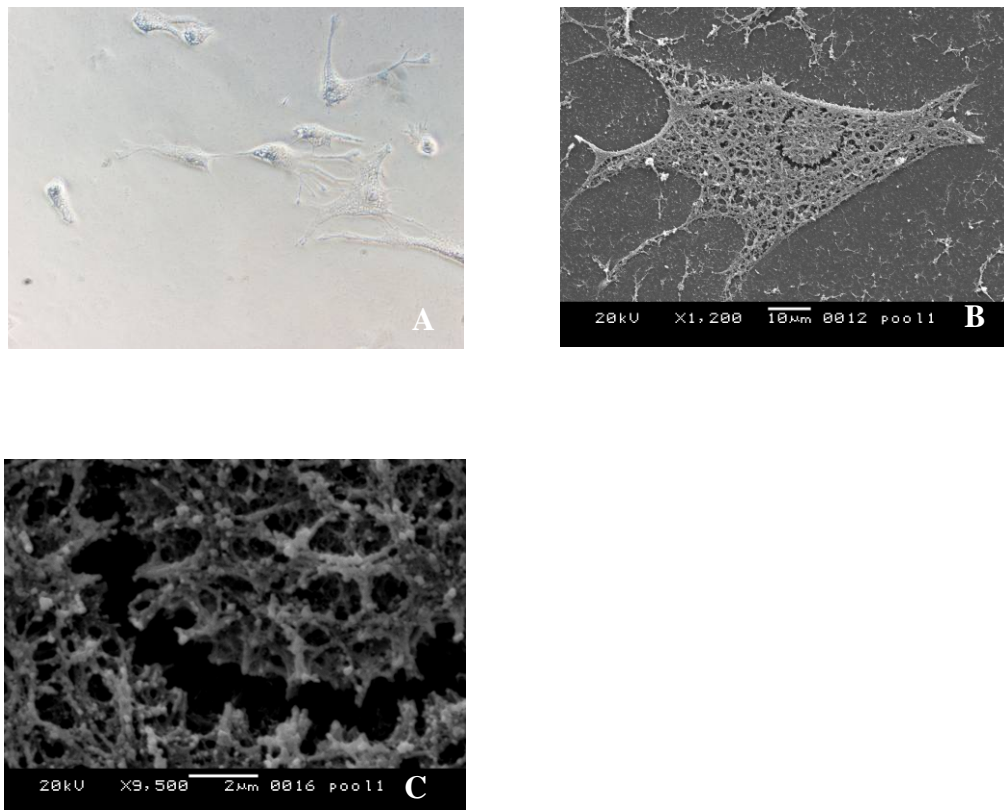
<b>Pases</b>	<b>CD29</b>	<b>CD73</b>
FEV	39,20%	28,70%
P0	67,10%	47,00%
P1	91%	67,20%
P2	98,20%	87,70%
P3	98,60%	96,80%

### 4.2.3.- PRUEBAS DE MULTIPOTENCIA DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS A PARTIR DE LA GRASA

#### 4.2.3.1.- Diferenciación en fenotipo neurogénico con $\beta$ -mercaptoetanol

La exposición de las células troncales de grasa a los medios de preinducción e inducción usados provocan cambios morfológicos en las células.

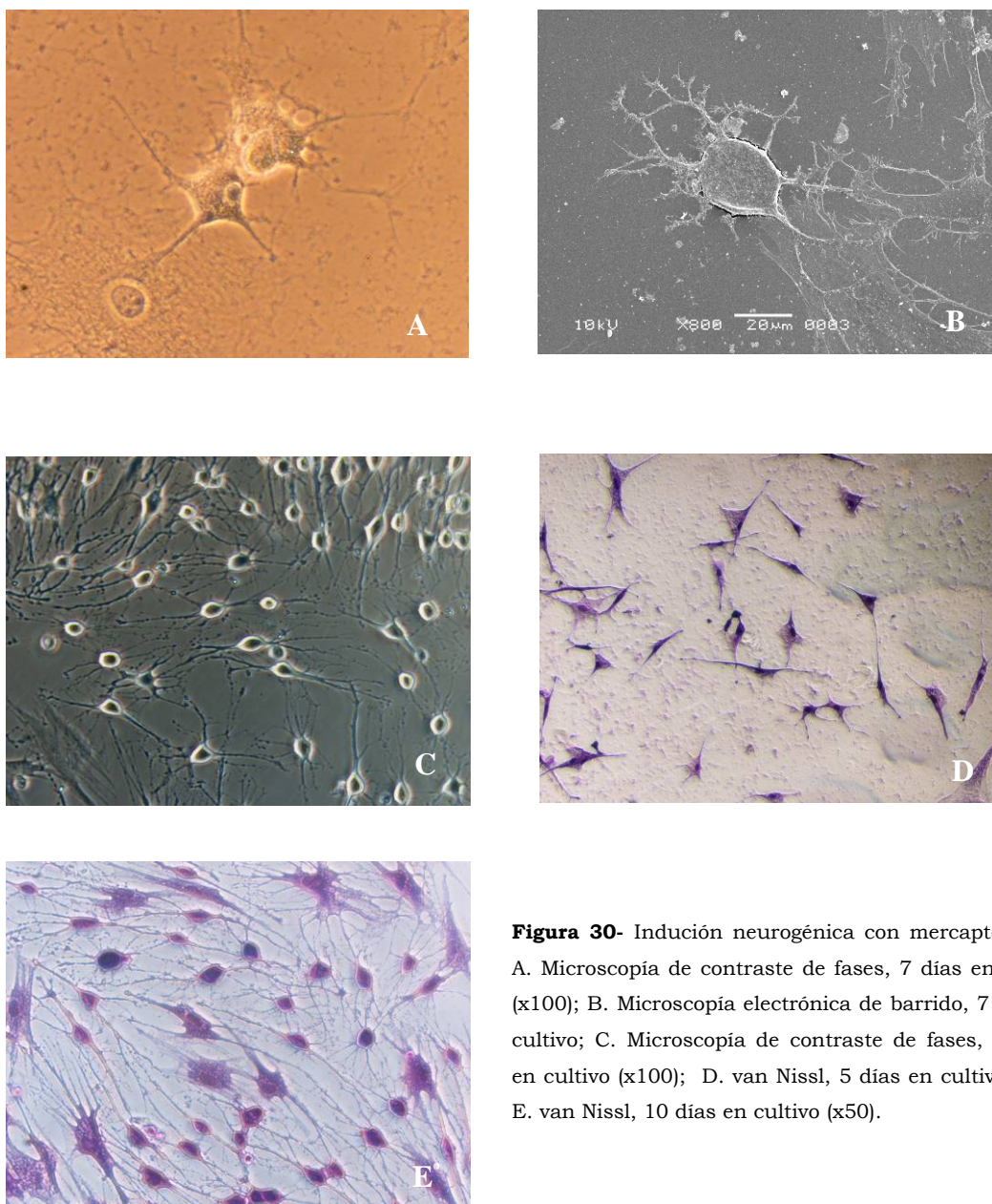
En la preinducción, se pone de manifiesto que las células comienzan a presentar largas prolongaciones, una retracción citoplasmática y un característico engrosamiento de la membrana nuclear, iniciando la formación del cuerpo celular (Figs. 29 A-C).



**Figura 29-** Pre-inducción neurogénica con mercaptoetanol. A. Imagen de contraste de fases (x50); B. Imagen de microscopía electrónica a las 24 horas; C. Imagen de la retracción citoplasmática y engrosamiento de la membrana nuclear, con el consecuente inicio de la formación del cuerpo celular.

Al cabo de dos-tres días, las células inducidas presentan un fenotipo neurogénico y se tiñen con la técnica de van Nissl. Estas células tienen cuerpos celulares grandes y numerosas prolongaciones largas (Figs. 30 A-E).

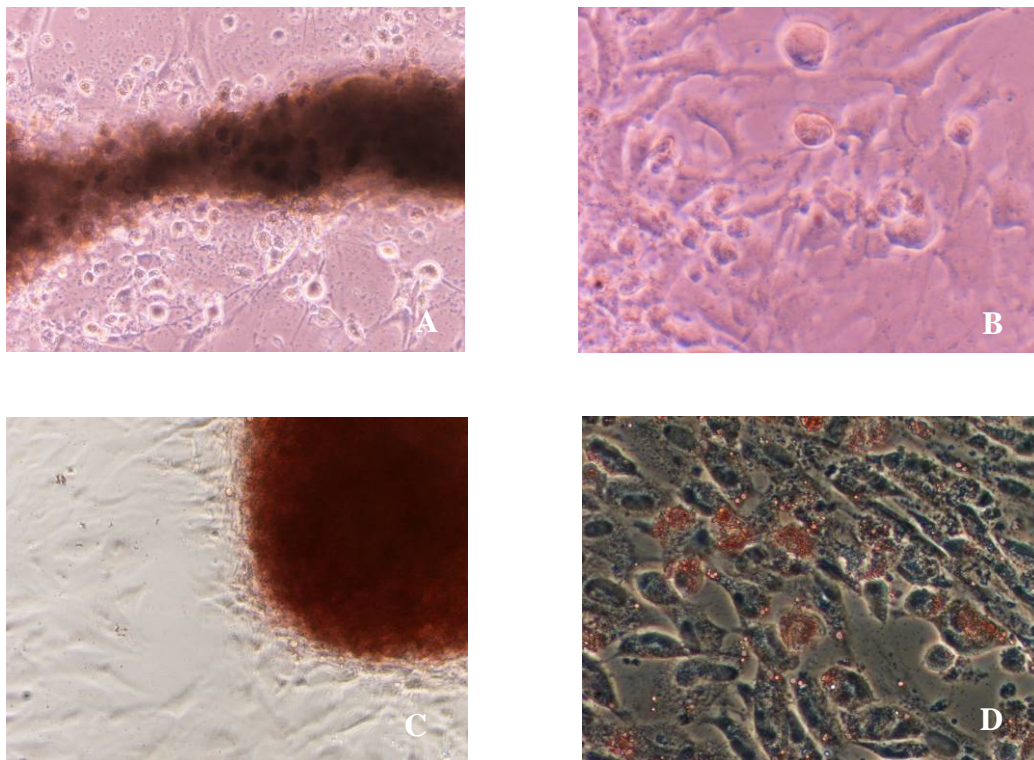
No se demostraron diferencias significativas entre el uso de 5 y 10 mmol/ml, siendo, sin embargo algo más rápida la diferenciación con 10 mmol/ml, pero las modificaciones morfológicas producidas son similares.



**Figura 30-** Inducción neurogénica con mercaptoetanol. A. Microscopía de contraste de fases, 7 días en cultivo (x100); B. Microscopía electrónica de barrido, 7 días en cultivo; C. Microscopía de contraste de fases, 10 días en cultivo (x100); D. van Nissl, 5 días en cultivo (x25); E. van Nissl, 10 días en cultivo (x50).

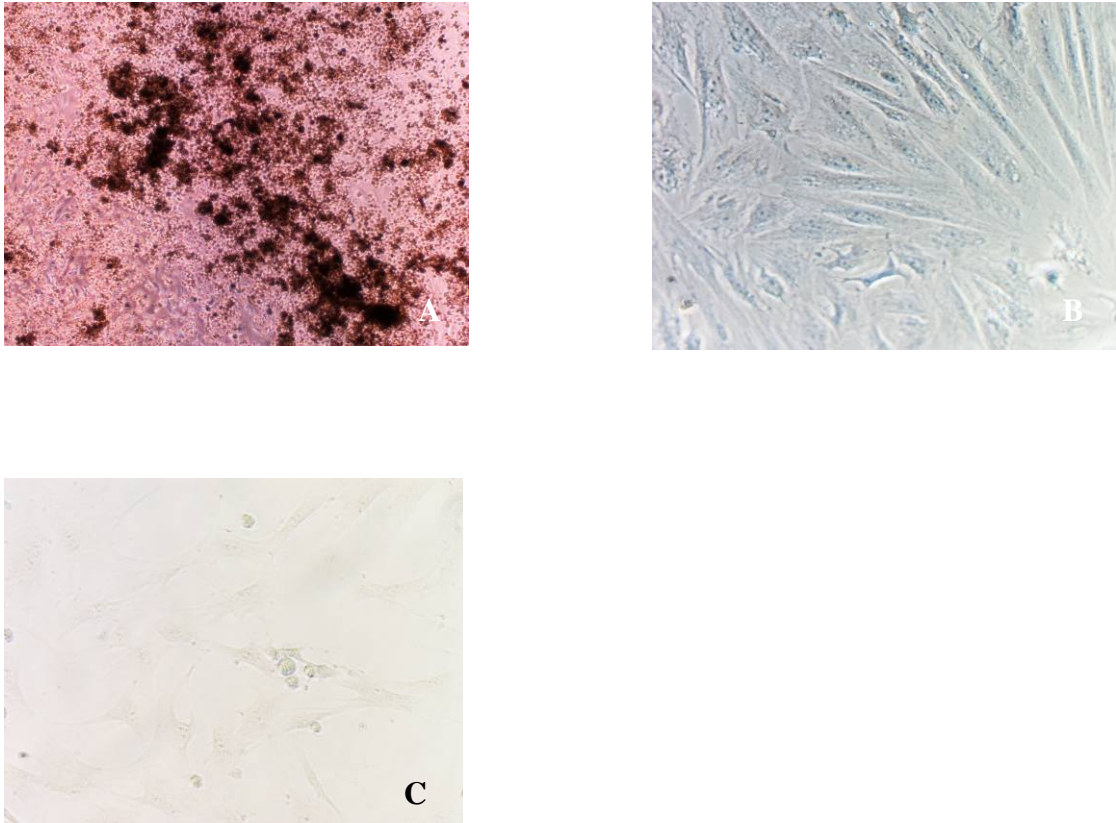
#### **4.2.3.2.- Diferenciación en adipocitos**

Se añadieron agregados de células producidos en agar al 2%, a una monocapa de células troncales con diez pases. Los agregados se adhirieron a la monocapa y éstos fueron capaces de diferenciar las células de la monocapa en adipocitos positivos al Oil Red O (Figs. 31 A-D).



**Figura 31** - Representación de la diferenciación en adipocitos. A. Adición del agregado formado a una monocapa indiferenciada, observar que las células en los agregados toman la forma redonda (x25); B. Células redondas mayor ampliación (x50); C. Agregado positivo al Oil Red (x25); D. Células positivas al Oil Red O (x50).

Para ver si la diferenciación era producida por la adhesión célula a célula o por los efectos de la matriz, se hicieron agregados en agar y se encapsularon en agar al 2%. Posteriormente se adicionaron a una monocapa de células troncales. Se observó que apenas había diferenciación cuando los agregados contactaban directamente con las células (Figs. 32 A-C).



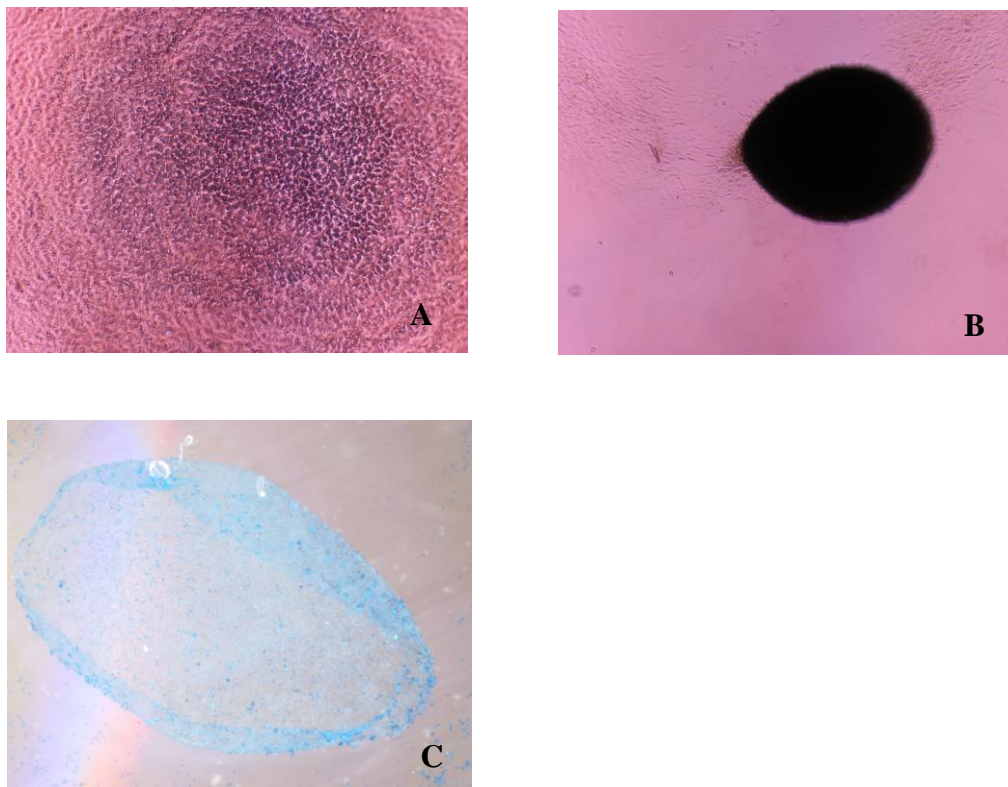
**Figura 32-** Tentativa de inducción adipogénica sin contacto celular. A. Imágenes de cultivo de agregados en agar, sobre monocapas de células troncales (x25); B. Imagen de la monocapa después del cocultivo durante 10 días (x100); C. Oil red de la anterior (x100).



#### **4.2.3.3.- Inducción de la condrogénesis**

Para diferenciar las células multipotentes en condrocitos, realizamos cultivos en micromasa en multiplaca, con una solución control y una solución diferenciadora.

Observamos que las células control se pegan y se mantienen indiferenciadas, mientras que las células en solución diferenciadora empiezan a formar nódulos al cabo de 24 horas, y producen gran cantidad de matriz, principalmente a partir del día 14 (Figs. 33 A-C)



**Figura 33** – Estudio de la diferenciación condrogénica. A.Solución control al cabo de 14 días (x50); B.Nódulo formado al cabo de 14 días con solución condrogénica (x25); C.Agregado con medio condrogénico cultivado 14 días, teñido con azul de Alcian lupa estereoscópica (x32).

#### **4.2.4.- MÉTODOS DE PRESERVACIÓN**

##### **4.2.4.1.- Preservación del tejido antes de la disociación**

Uno de los problemas prácticos con que esta tecnología se puede encontrar, es el transporte desde el lugar de obtención de la muestra hasta el laboratorio que pueda procesar la muestra. Pudimos observar que cuando la grasa era mantenida en hielo, durante 24 horas en medio de transporte (DMEM, 10 % SFB y solución antibiótica/antimicótica) en la nevera, las células disociadas se mantenían viables, pero en menor cantidad, y se adherían sin problemas a los frascos de cultivo.

##### **4.2.4.2.- Criopreservación de las células**

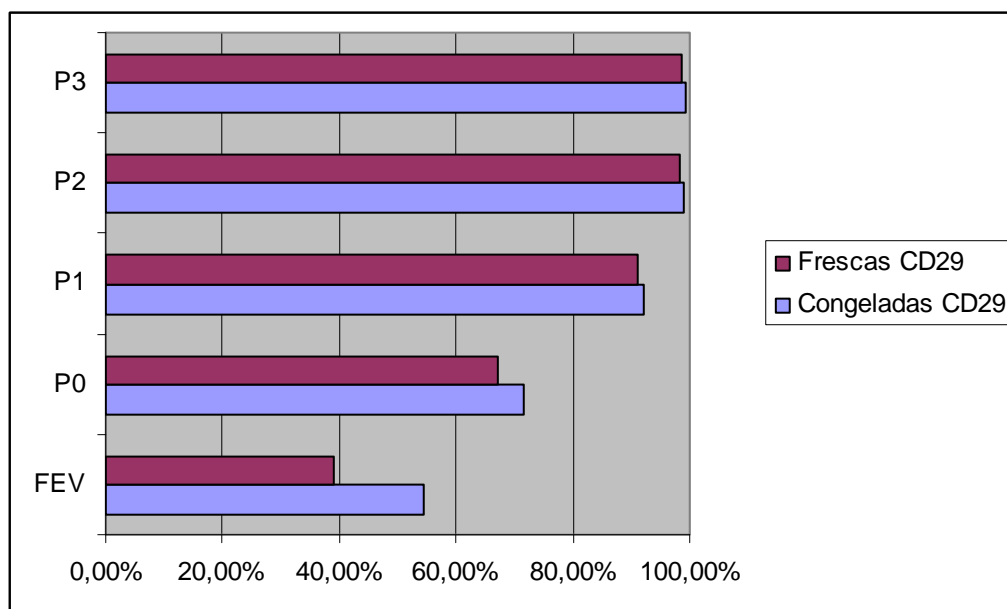
###### **4.2.4.2.1.- Técnicas de criopreservación después de la amplificación**

Para congelar las células se utilizaron distintos protocolos descritos en la bibliografía, con el fin de evaluar cuál era el método de congelación más adecuado. Las células preservadas con 80% de SFB demostraron tener mejor viabilidad que las conservadas con 80 % de DMEM.

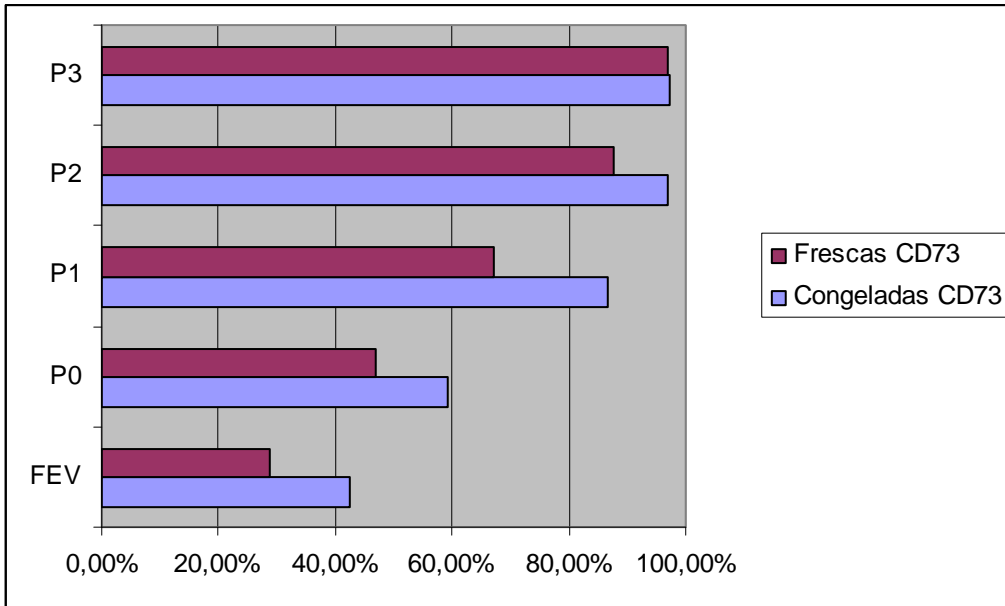
###### **4.2.4.2.2.- Impacto de la criopreservación en los marcadores de superficie de las células troncales**

Debido a las dificultades inherentes a la recogida y procesamiento de las muestras de CTDTA, el almacenamiento de estas células en nitrógeno líquido hasta que se pueda hacer el análisis por citometría de flujo puede ser una ventaja. Dado que la exposición al criopreservante, como el DMSO y el procedimiento de congelación puede inducir determinada lesión celular, decidimos investigar si el procedimiento de criopreservación altera la expresión de las proteínas de superficie. El

nivel de expresión fue analizado en células en fresco y congeladas, recogidas del mismo animal y mantenidas los mismos días en cultivo. Los resultados obtenidos demostraron que las células troncales criopreservadas y no criopreservadas muestran un patrón similar de reactividad de membrana (Fig. 34). Utilizando el test Z para la comparación de proporciones, identificamos diferencias siempre estadísticamente muy significativas ( $p < 0,001$ ). A pesar de ello, evidenciamos una pequeña diferencia de expresión del CD73, con valores algo más elevados que en las congeladas (Fig. 35).



**Figura 34** – Expresión del CD29 en células frescas y congeladas. Se nota una expresión similar a lo largo de los pases. La diferencia mayor se observa a nivel de la fracción estromal vascular.



**Figura 35** - Expresión del CD73 en células frescas y congeladas. Se observa una mayor expresión en células congeladas que las frescas, principalmente en los primeros pases, después se nota una mayor uniformidad.

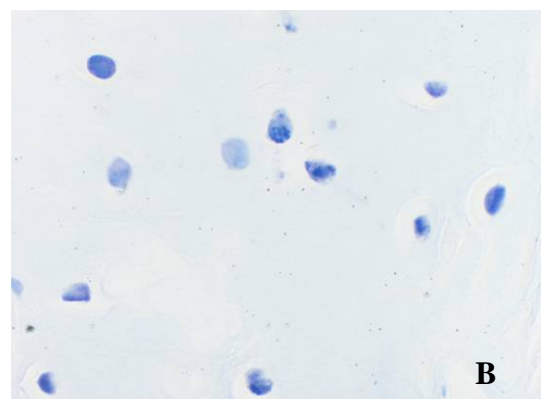
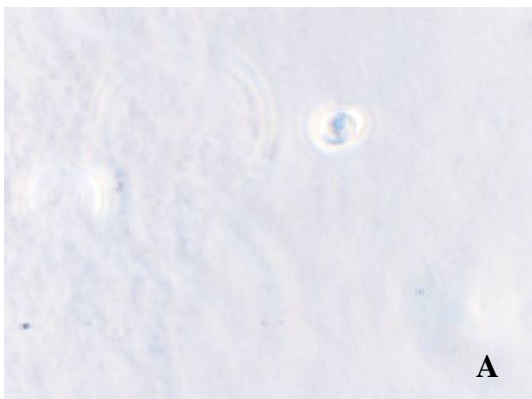
#### **4.2.5.- INCLUSIÓN DE LAS CÉLULAS EN BIOMATERIALES**

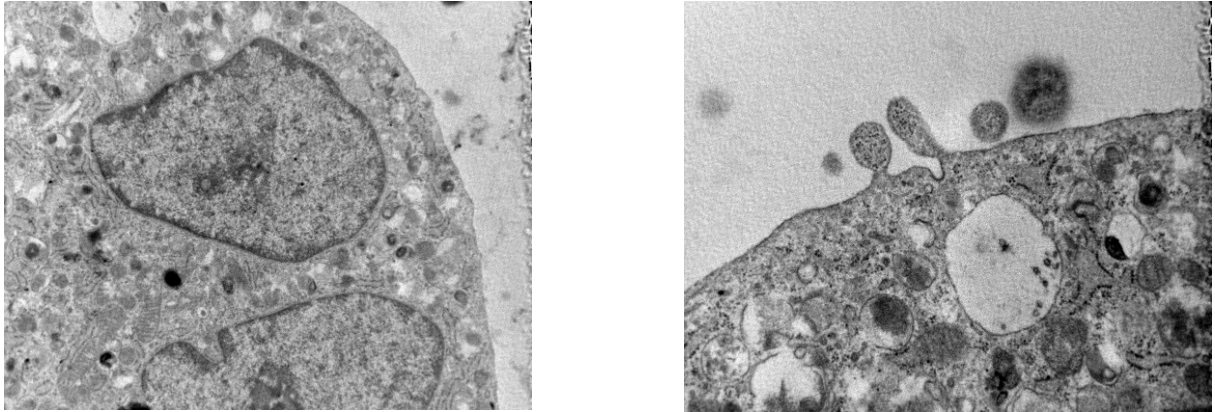
##### **4.2.5.1.- Inclusión de células troncales de tejido adiposo en biomateriales**

###### **4.2.5.1.1.- Biomateriales naturales**

###### **4.2.5.1.1.1.- Agar**

Las células incluidas en el agar presentan una forma redondeada, independientemente del tiempo que se mantuvieron en cultivo. En microscopía de contraste de fases, podemos observar desde el primer día que las células presentaban esta morfología redondeada. En las preparaciones teñidas con H/E vistas al microscopio óptico, se pone de manifiesto una distribución más o menos uniforme por todo el biomaterial. Por microscopía electrónica podemos confirmar el fenotipo redondeado, algunas de las células presentaban dos núcleos, señal de mitosis, y de la posibilidad de división en este biomaterial. Se observan también vesículas de pinocitosis, señal de que las células se están nutriendo a través del biomaterial (Fig. 36).

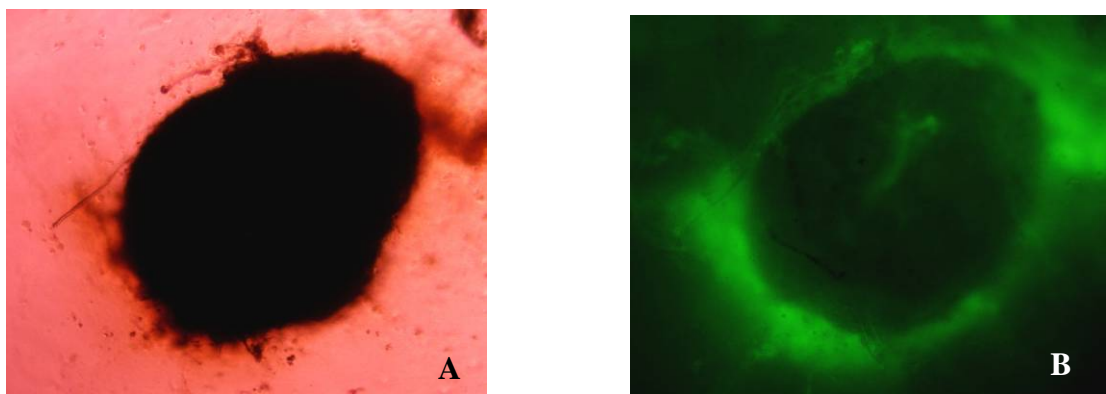




**Figura 36-** Células troncales del tejido adiposo incluídas en gel de agarosa. A. Microscopía óptica de contraste de fase (x50); B. MO en parafina teñido con H/E (x50); C. Imagen de microscopía de transmisión de células incluídas en agar, podemos observar células con dos núcleos (x12000); D. Aspecto de la membrana plasmática (x30000).

#### **4.2.5.1.1.2.- Adición de colágeno tipo I**

Cuando fueron cultivadas las células con colágeno tipo I proveniente de bovino, marcado con FITC, las células formaron nódulos de gran tamaño, adhiriéndose al colágeno, y produciendo grandes cantidades de matriz (Fig. 37). Estos nódulos eran visibles macroscópicamente.

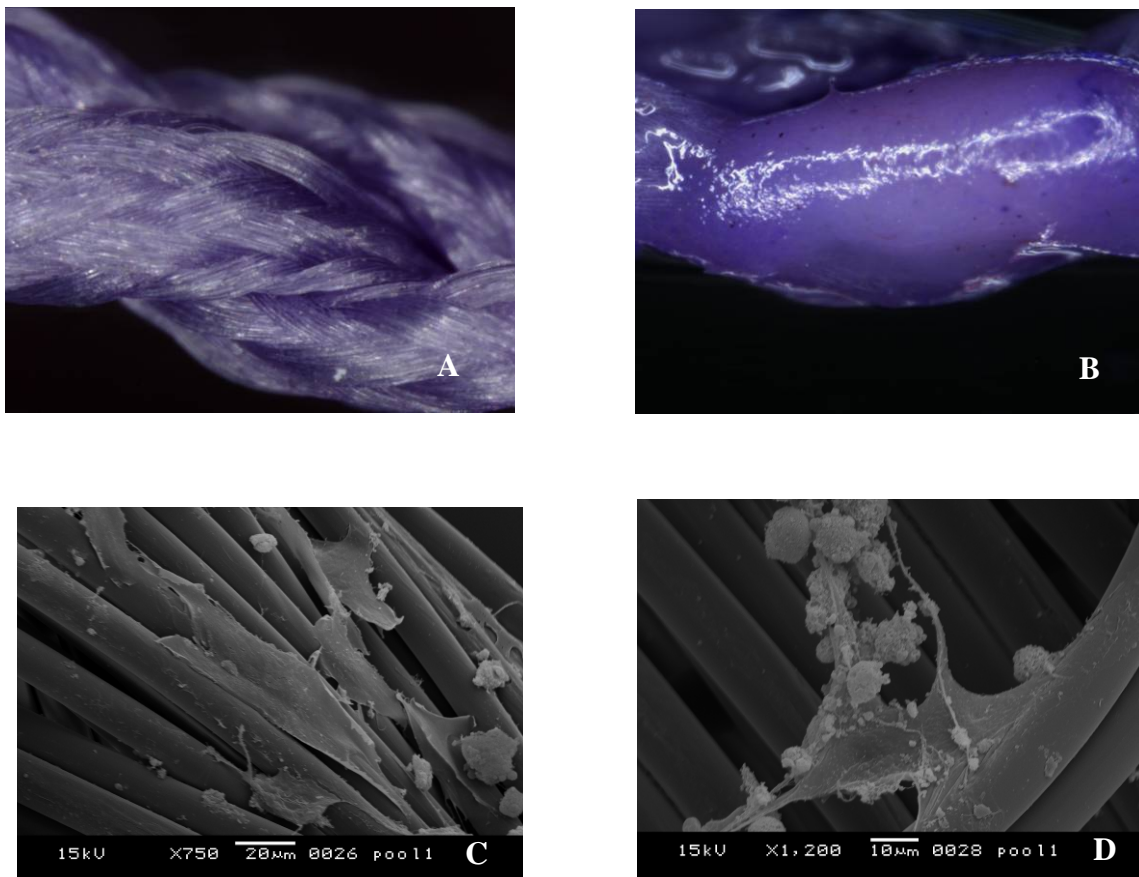


**Figura 37** – Nódulos formados por células tratadas con colágeno tipo I. A. Imagen de contraste de fase (x25); B. Imagen de microscopía de fluorescencia (x25).

#### 4.2.5.1.2.- Biomateriales sintéticos

##### Ácido Poliglicólico

Las células troncales obtenidas a partir de tejido adiposo se cultivaron durante 10 días en hilo de sutura de ácido poliglicólico. En el microscopio de contraste de fases se observó una buena adhesión de las células durante los 10 días. Observamos en microscopía electrónica que las células no sólo se adhieren, sino que también se expanden, demostrando, de esta forma, una buena capacidad de adherencia a este material (Fig. 38 A-D).



**Figura 38-** Cultivo de CTDTA en hilo de ácido poliglicólico. A y B. Imágenes obtenidas con lupa estereoscópica, 1 día y seis días (x5); C. Células pegadas al hilo de poliglicólico, desdiferenciadas; D. Una célula pegada desdiferenciada y otras pegadas a ella todavía con la forma redondeada.

### **4.3.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE CÉLULAS TRONCALES DE TEJIDO ADIPOSO (GRASA INFRAPATELAR) DE CABALLO**

#### **4.3.1.- OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MULTIPOTENTES**

Las células troncales obtenidas a partir de la grasa infrapatelar de caballo demostraron tener en cultivo, un comportamiento similar a las troncales de grasa inguinal de rata, presentando una población adherente de morfología fibroblástica. Estas células fueron obtenidas por artroscopia, y se procedió a la lisis de los eritrocitos. Las células fueron cultivadas en *cell stacks* para lograr una mayor amplificación.

#### **4.3.2.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE CTDTA DE CABALLO**

Se indujo la diferenciación condrogénica en células de un sólo animal, para ello utilizamos cultivo en pellet en medio con TGF-  $\beta$ 1. Las células fueron tripsinizadas y centrifugadas para formar los pellets, como se ha descrito previamente en el capítulo de material y métodos. Al cabo de tres días observamos la formación total de los pellets. Éstos fueron cultivados sometidos a diferentes tensiones de oxígeno, hasta un máximo de 40 días. La condición de hipoxia con 5 % de oxígeno y la de normoxia con 20 % de oxígeno. De esta forma teníamos en este experimento cuatro condiciones distintas: Normoxicondrogénico (NCH), Normoxicontrol (NCT), Hipoxicontrol (HCT), Hipoxicondrogénico (HCH).

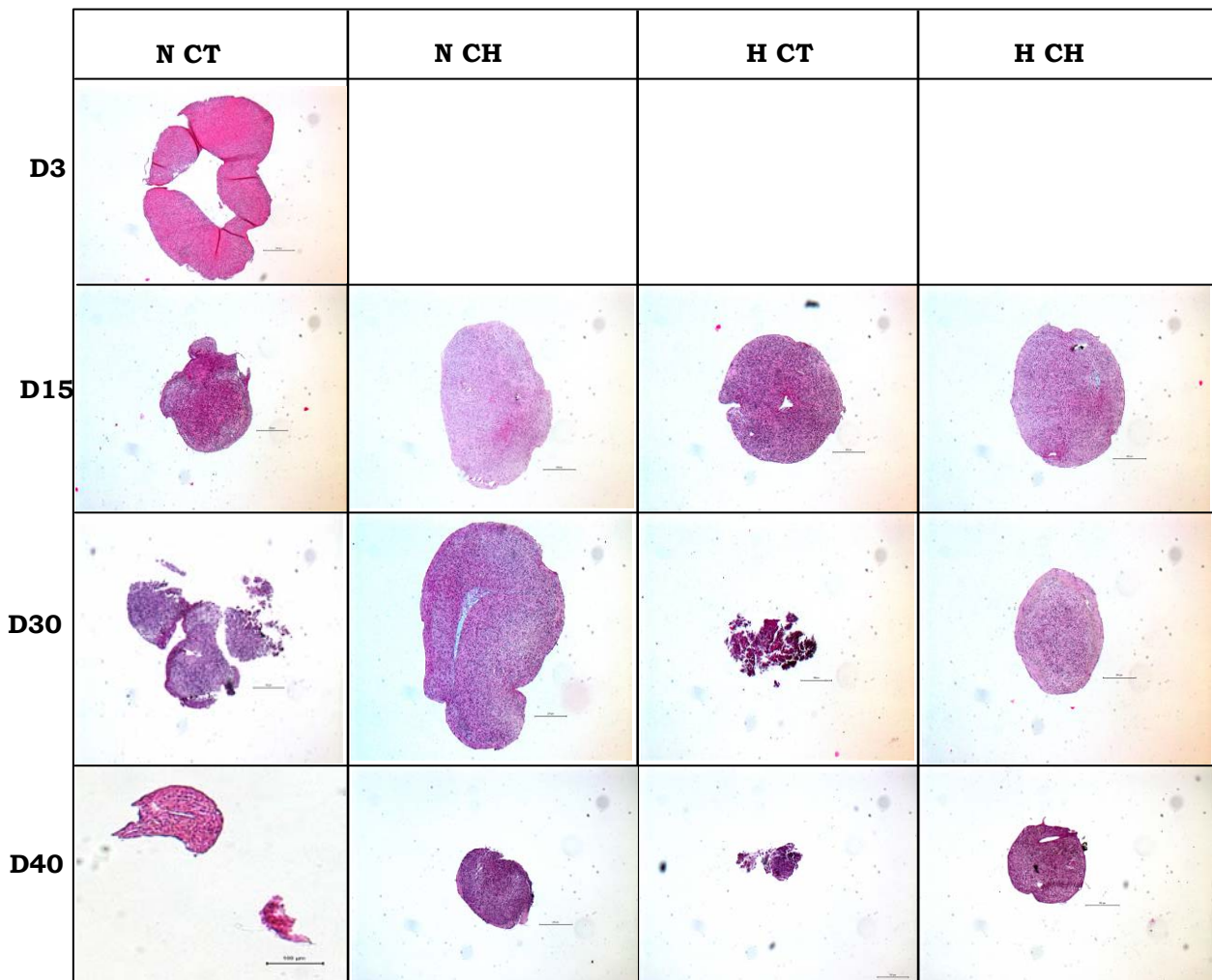
Con la tinción de hematoxilina y eosina (Figs. 39-41) observamos al día 15 que los pellets control se presentaban como una estructura fibrosa y eran muy pequeños, comparados con los cultivados en medio condrogénico. En el día 30 y principalmente el 40, los pellets control disminuían bastante de tamaño y se evidenciaba un sufrimiento celular, estando, posiblemente en estados apoptóticos.



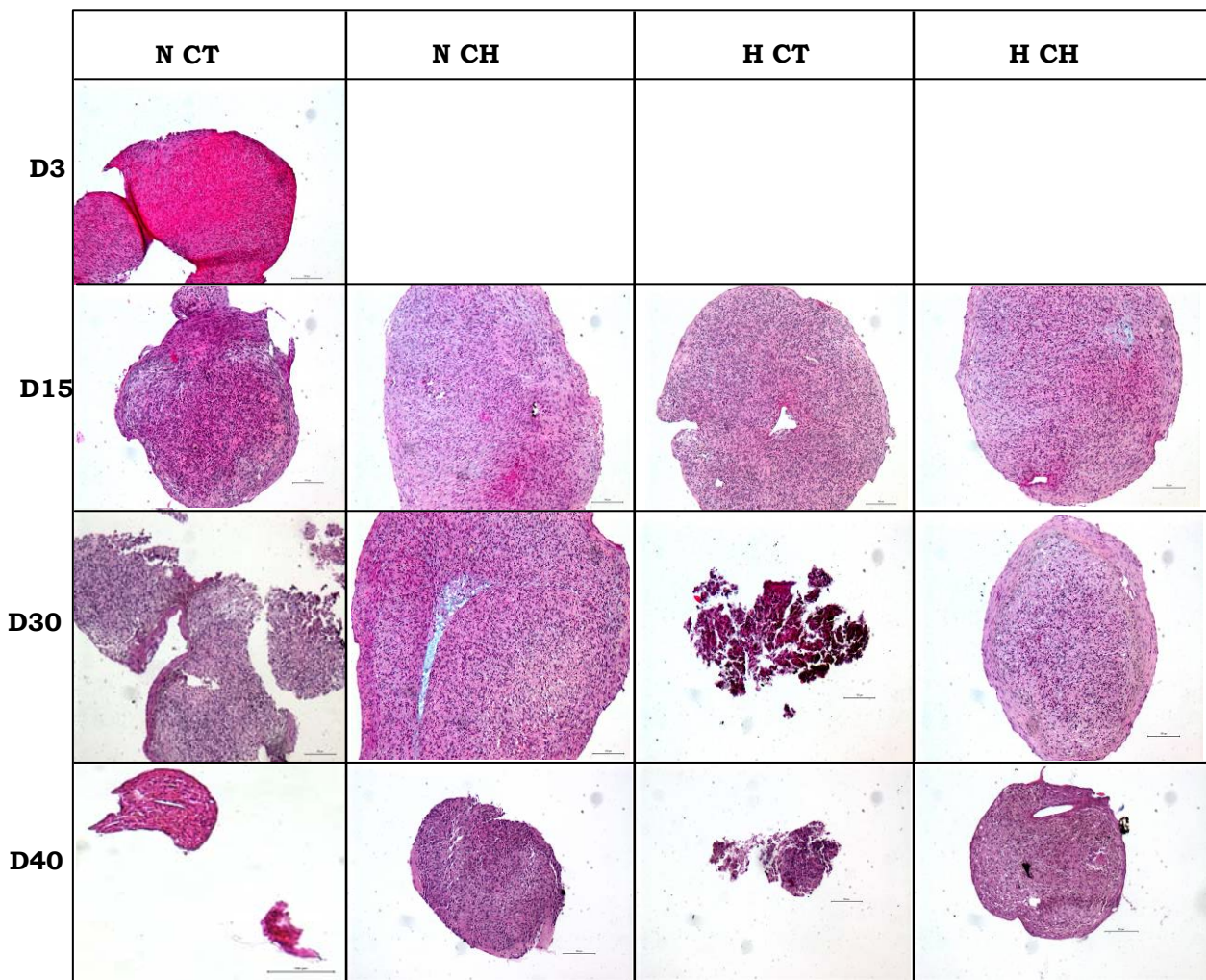
Los pellets cultivados en medio condrogénico, presentaron un cambio morfológico, aumentando las células de tamaño y con una apariencia un poco más redondeada. En este caso se observa una mayor cantidad de matriz extracelular. La disminución del tamaño de los pellets del día 30 al día 40 no fue muy evidente. Las diferencias morfológicas no son significativas entre los pellets mantenidos en medios condrogénicos con diferentes tensiones de oxígeno.

Con la tinción azul de Alcian (Figs. 42-44), se observó que la acumulación de proteoglicanos en la matriz extracelular presenta un incremento notable hasta el día 30. Podemos observar que al día 15, los pellets NCH y HCH ya presentaban tinción positiva, apareciendo en la condición de hipoxia una expresión ligeramente superior que en la NCH. En el día 30 aparecía una tinción exuberante en las condiciones condrogénicas, siendo más positivo el NCH. Los pellets control, se presentan de pequeño tamaño, y negativos para el azul de Alcian.

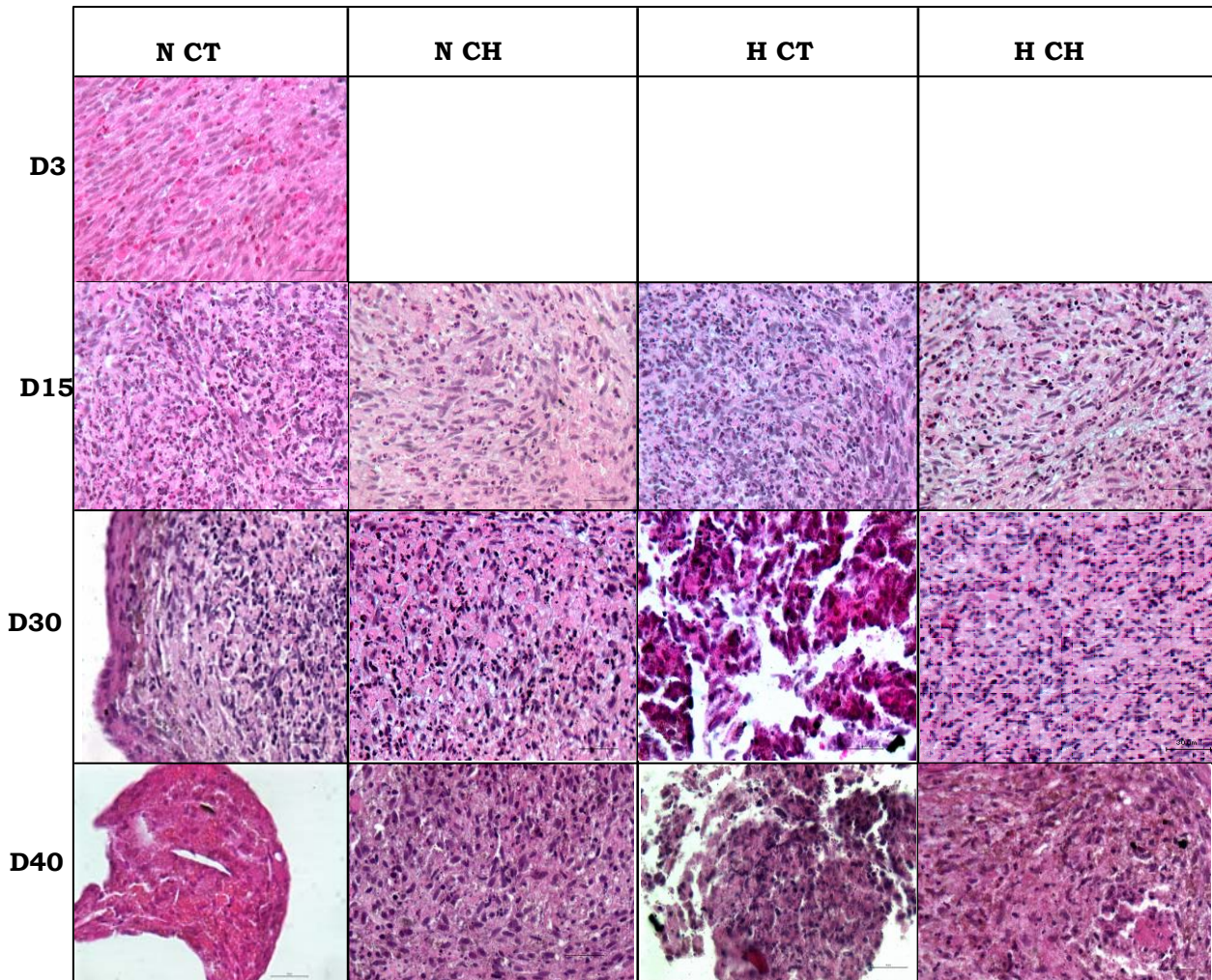
Para la tinción de TM (Figs. 45-47) podemos observar, en pellets en condiciones condrogénicas, que las células de la periferia producían más tempranamente (día 14) grandes cantidades de colágeno (Fig. TMx100), siendo evidente un anillo periférico. Enseguida, las células del centro empiezan a producir colágeno en gran cantidad (día 30) (Fig TM x100). Ésto puede tener que ver con que el aporte de algunos nutrientes sea limitante. De esta forma, se observa en los pellets condrogénicos y principalmente en hipoxia una zona periférica rica en colágeno, y una zona central con escasa producción. En el día 15 los pellets NCH y HCH ya presentaban tinción positiva, y en el día 30 en las mismas condiciones presentaban una tinción muy intensa. Al día 30, los pellets control, se presentan de pequeño tamaño, y negativos para el TM.



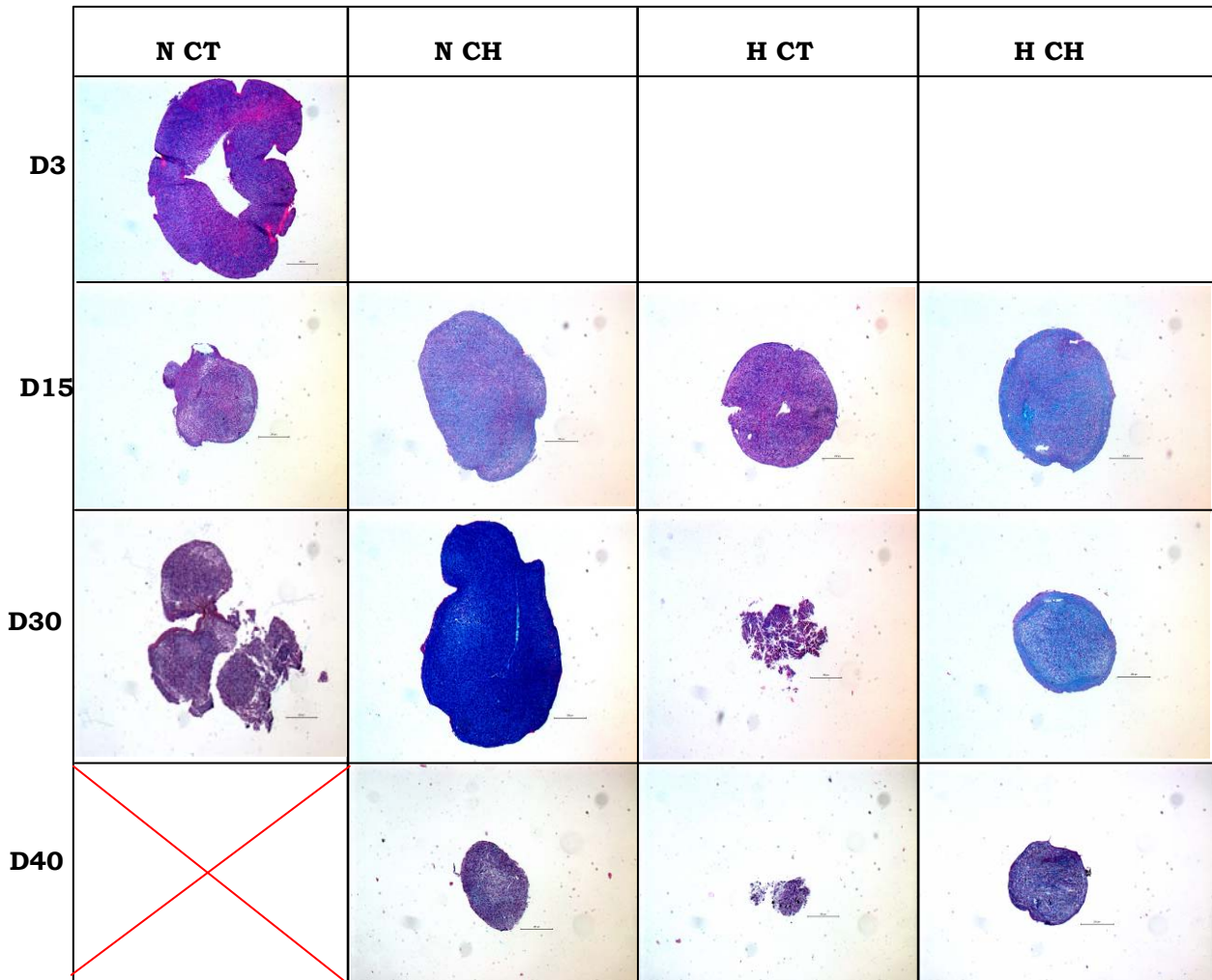
**Figura 39-** Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración HES (x50).



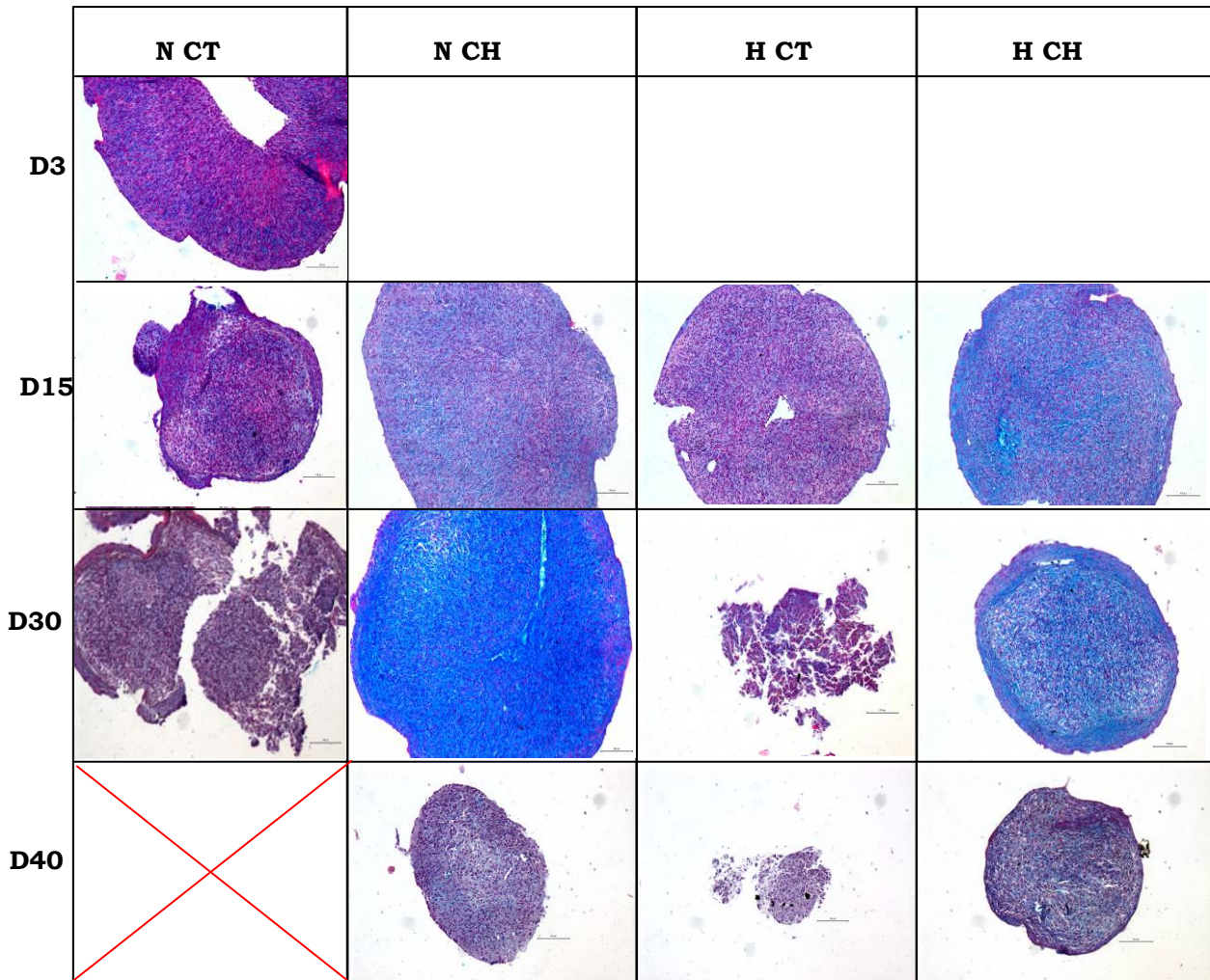
**Figura 40** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (x 100).



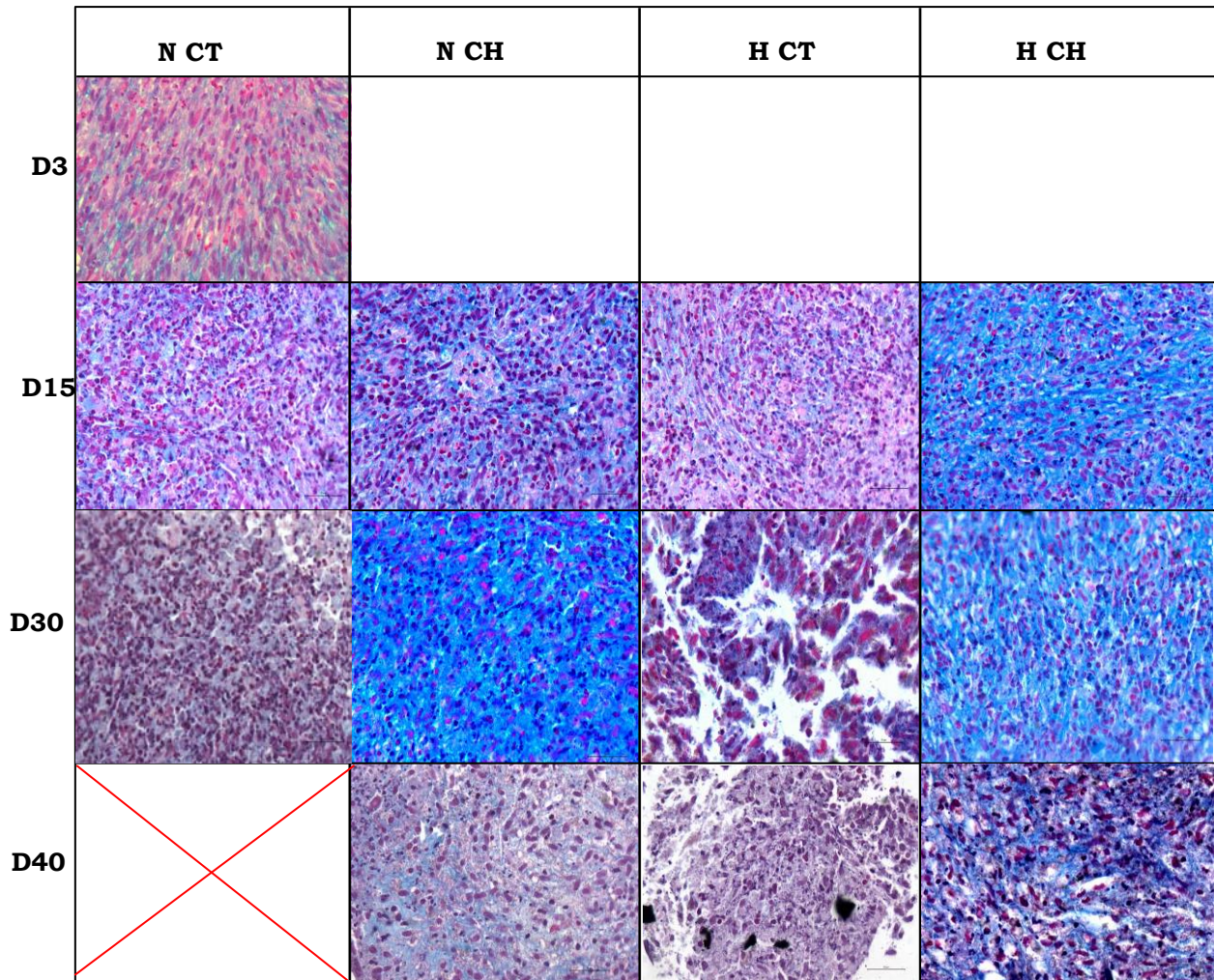
**Figura 41-** Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (x 400).



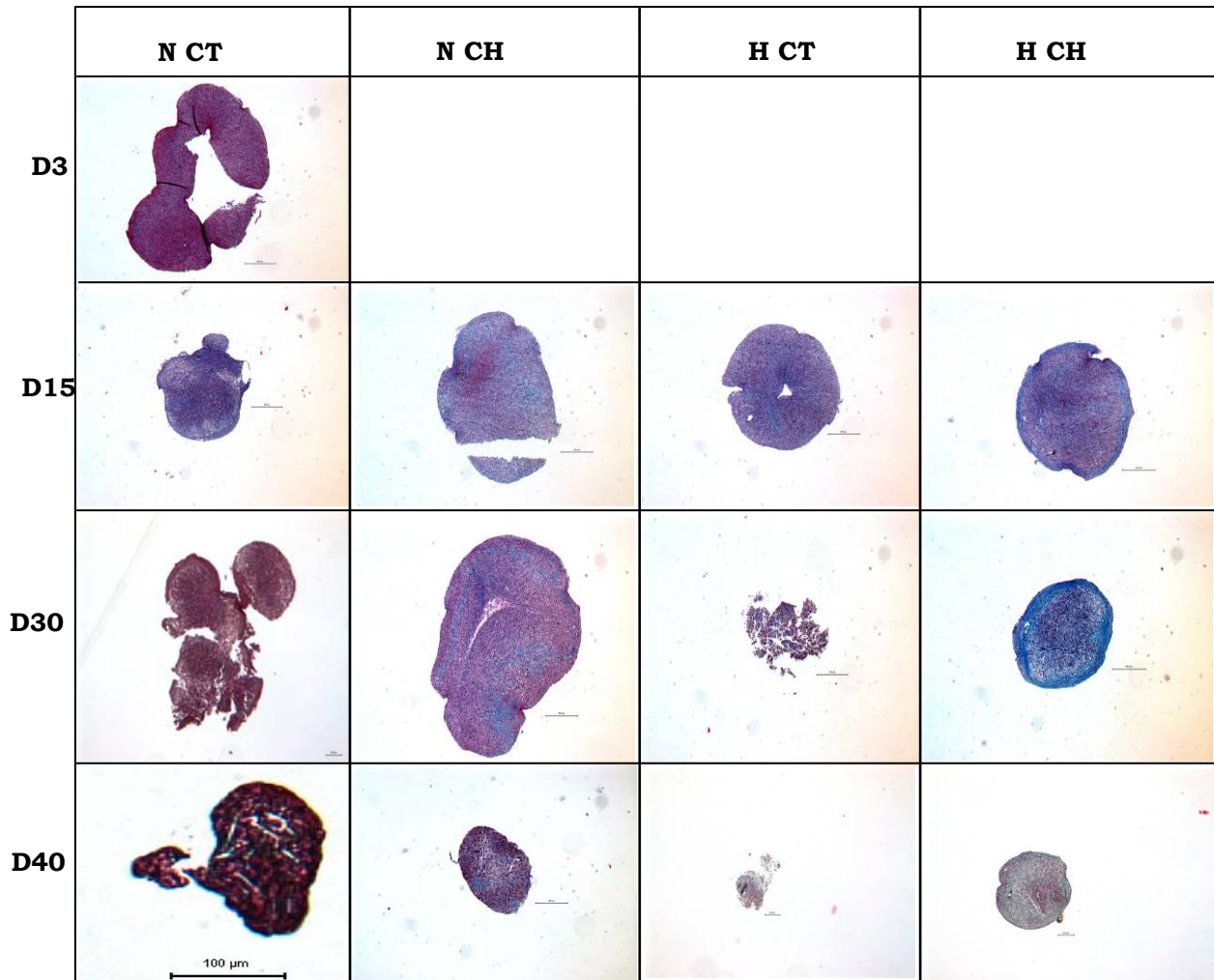
**Figura 42** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración azul de Alcian (x 50).



**Figura 43-** Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración azul de Alcian (x 100).

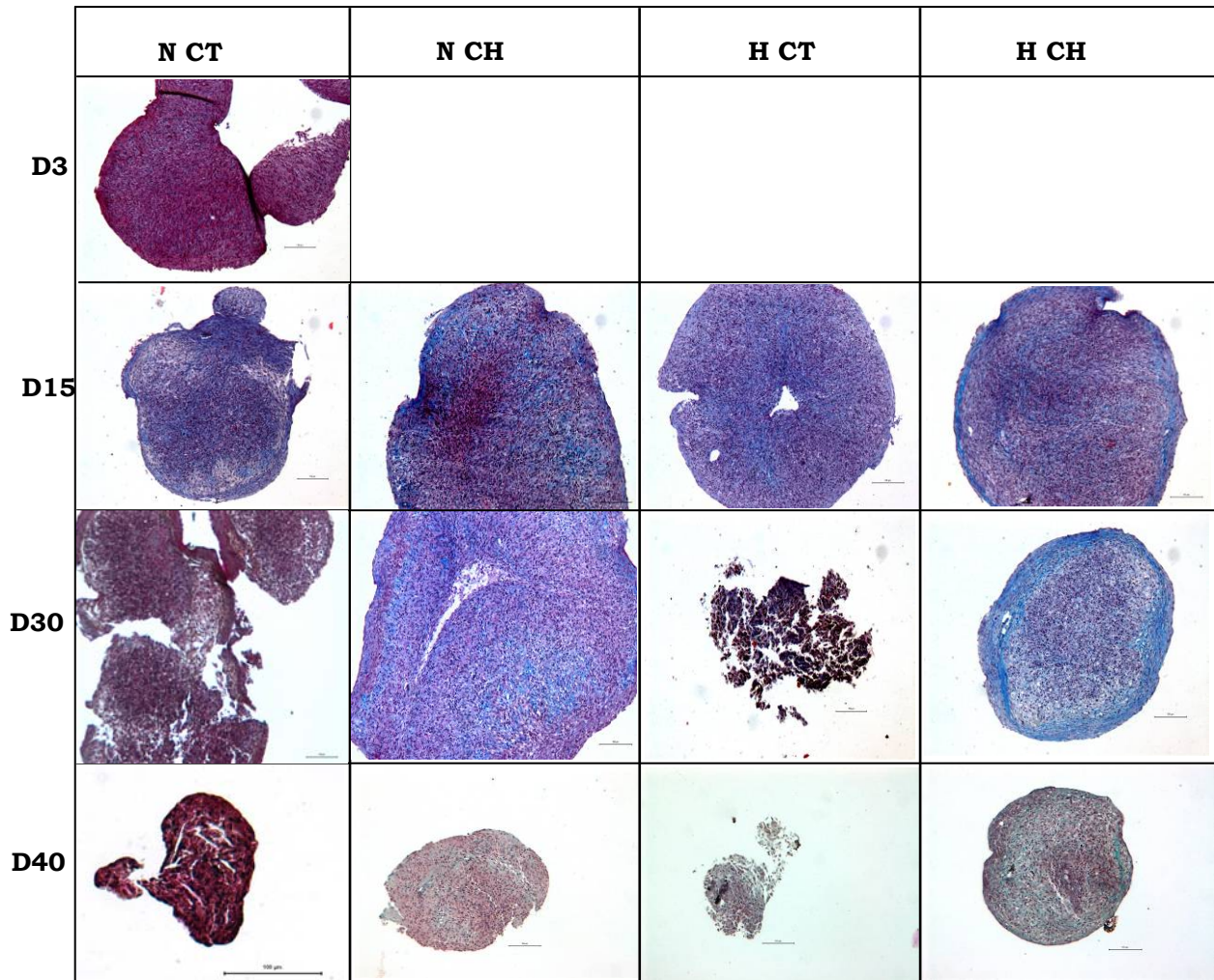


**Figura 44** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración azul de Alcian (x 400).

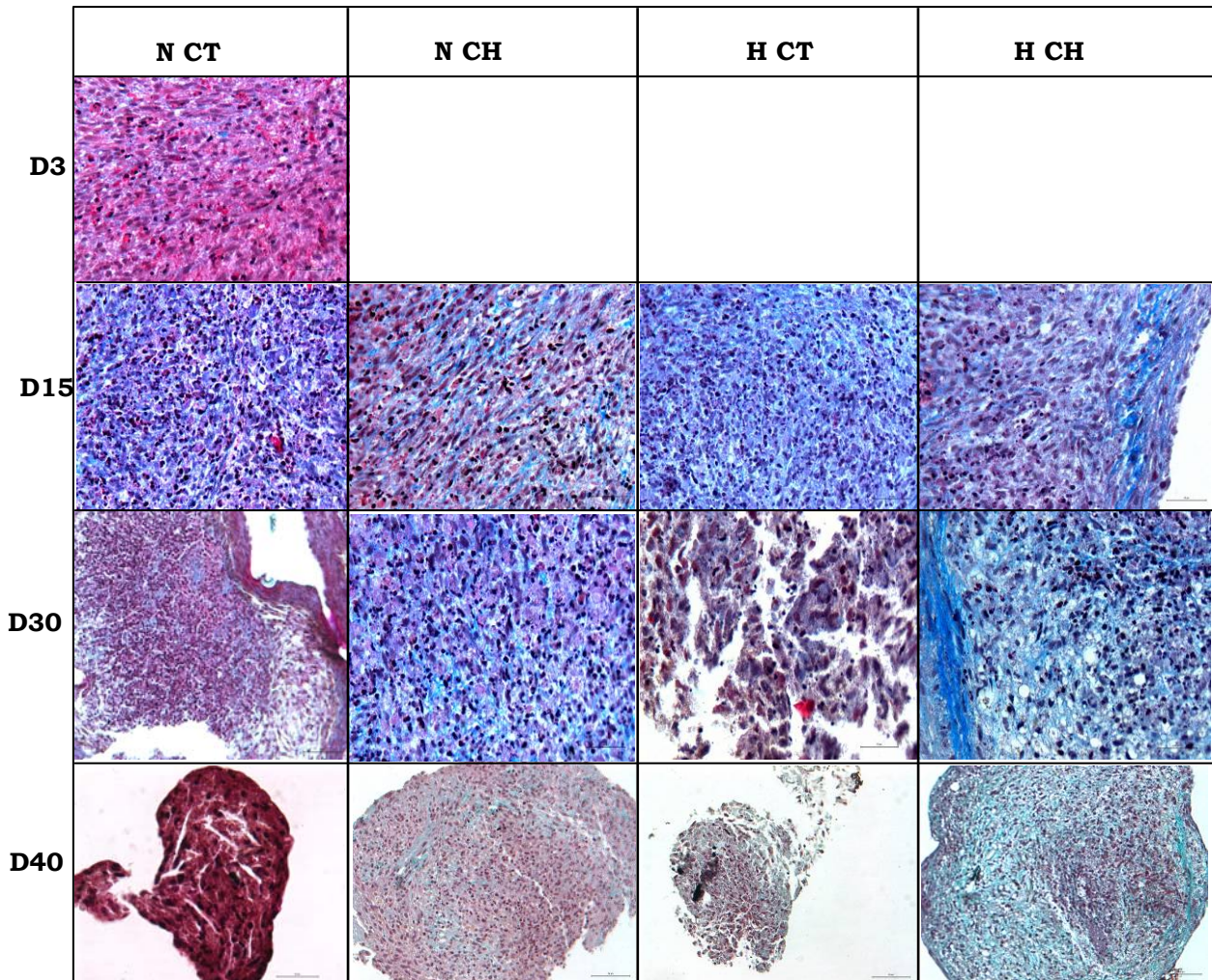


**Figura 45-** Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo Tricrómica de Masson (x 50).





**Figura 46-** Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo Tricrómica de Masson (x 100).



**Figura 47** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo Tricrómica de Masson (x 400).

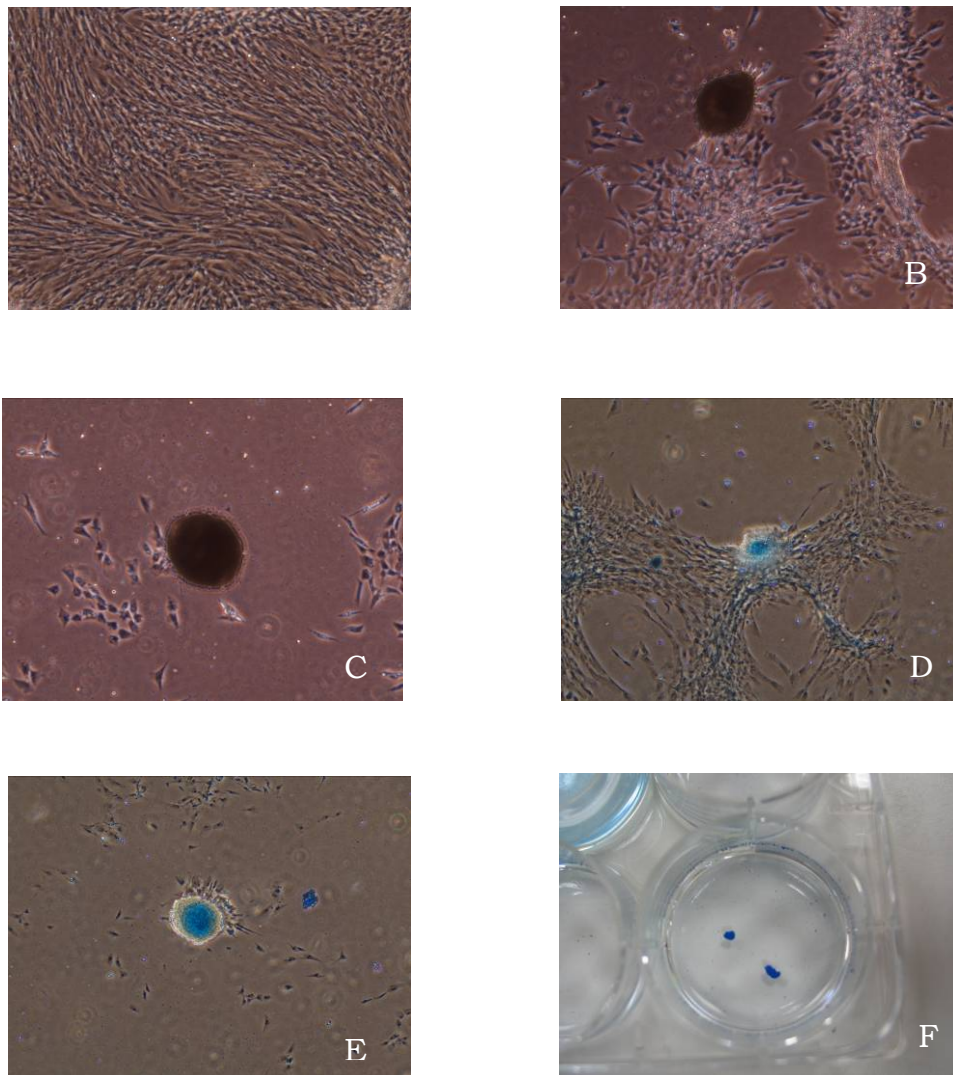
### **4.3.3.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA HIPERTRÓFICA DE CTDTA DE CABALLO**

En este punto se estudiaron los efectos de la dexametasona, en la condrogénesis. Para ello se añadió al medio condrogénico de cultivo del experimento anterior dexametasona, en cultivos en 2 y 3 dimensiones.

#### **4.3.3.1.- Cultivos en dos dimensiones**

Se ha evaluado la capacidad para diferenciar monocapas en dos dimensiones, con un medio condrogénico conteniendo ITS, TGF- $\beta$ 1 y dexametasona en las mismas condiciones de atmósfera del experimento anterior (Figs. 48A-F). Al final de una semana de cultivo, se empezó a observar que las células empiezan a tomar formas más redondas y a formar agregados. A los 15 días, tenemos nódulos completamente formados, con bastante producción de matriz. Los nódulos aumentan de tamaño y la cantidad de matriz producida hasta el día 30. En este momento, los agregados se levantan del plástico debido a la enorme cantidad de matriz y células que incorporan. La formación de los agregados es más intensa y más rápida en la condición de hipoxia condrogénica, formando nódulos de mayor tamaño. Las células mantenidas en medio control, no formaron nódulos, manteniendo su fenotipo fibroblástico en monocapa. Estos nódulos se mostraron muy similares a los que obtuvimos del cultivo de condrocitos auriculares de conejo, cuando eran sembrados en agar.

Haciendo las pruebas de azul de Alcian en las monocapas y nódulos, observamos una fuerte tinción azul de los nódulos, siendo que las células periféricas no producían matriz, por lo tanto, no aparecían teñidas. Las células control se manifestaron completamente negativas para la tinción de azul de Alcian. La condición de HCH fue la que más intensamente se tiñó con azul de Alcian. En este caso, en el día 30 teníamos pellets perfectamente visibles macroscópicamente.



**Figura 48** – Diferenciación condrogénica en dos dimensiones. A.Células mantenidas en medio control(x50); B. En normoxia con medio condrogénico con Dexametasona (14 días) (x 50); C. En normoxia con medio condrogénico con Dexametasona (30 días) (x 50); D. Azul de Alcian en normoxia con medio condrogénico NCH (día 14) (x50) E.Azul de Alcian en normoxia con medio condrogénico NCH (30 días) (x25); F- Azul de Alcian en hipoxia en medio condrogénico (Aspecto macroscópico).

#### **4.3.3.2.- Cultivos en tres dimensiones**

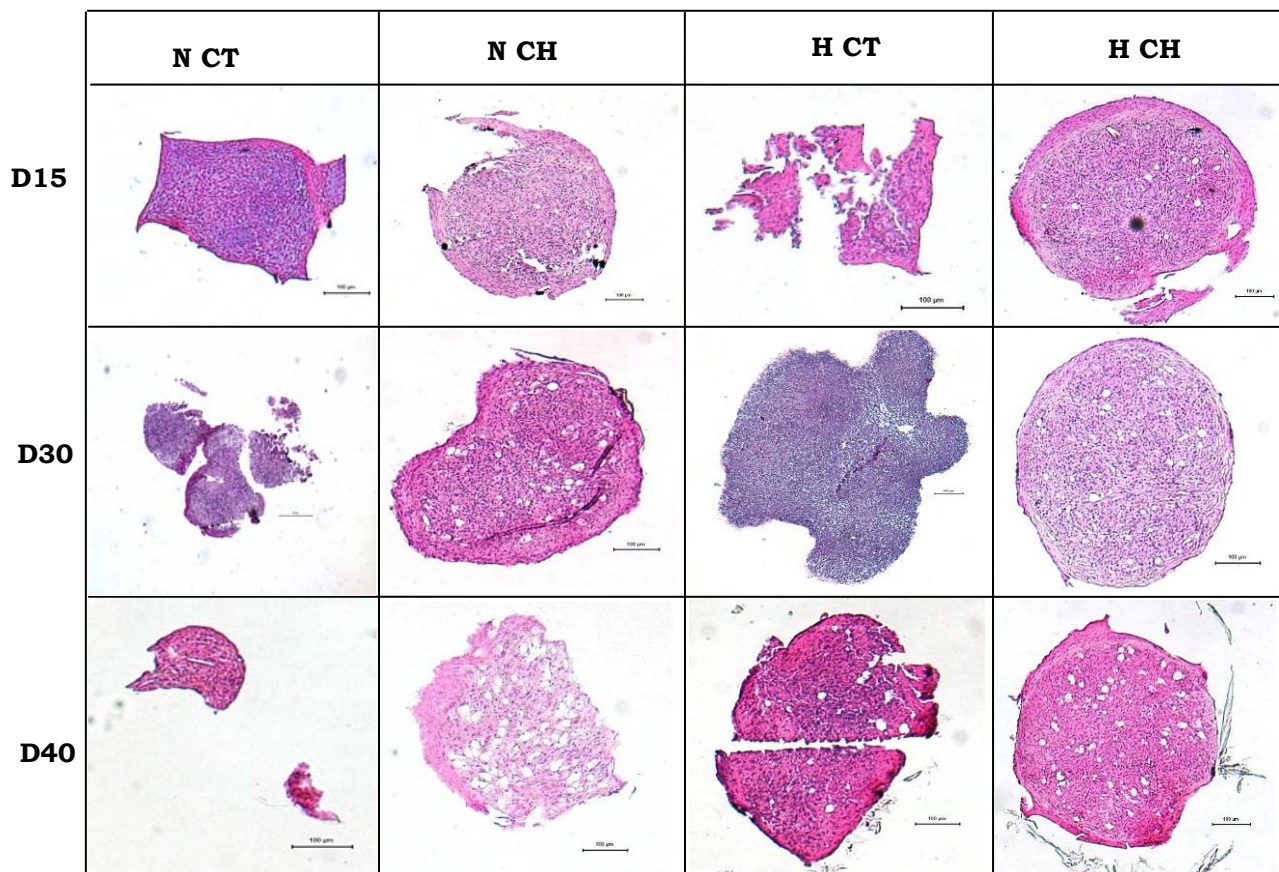
Con el objetivo de intentar obtener un modelo de hipertrofia de condrocitos, se repitió el experimento anterior en las mismas condiciones de atmósfera, pero añadiendo dexametasona durante períodos prolongados (hasta 40 días).

Con la tinción de Hematoxilina/Eosina (Figs. 49-52), podemos observar que existe un gran aumento del tamaño de las células cultivadas en medio condrogénico comparado con el medio control.

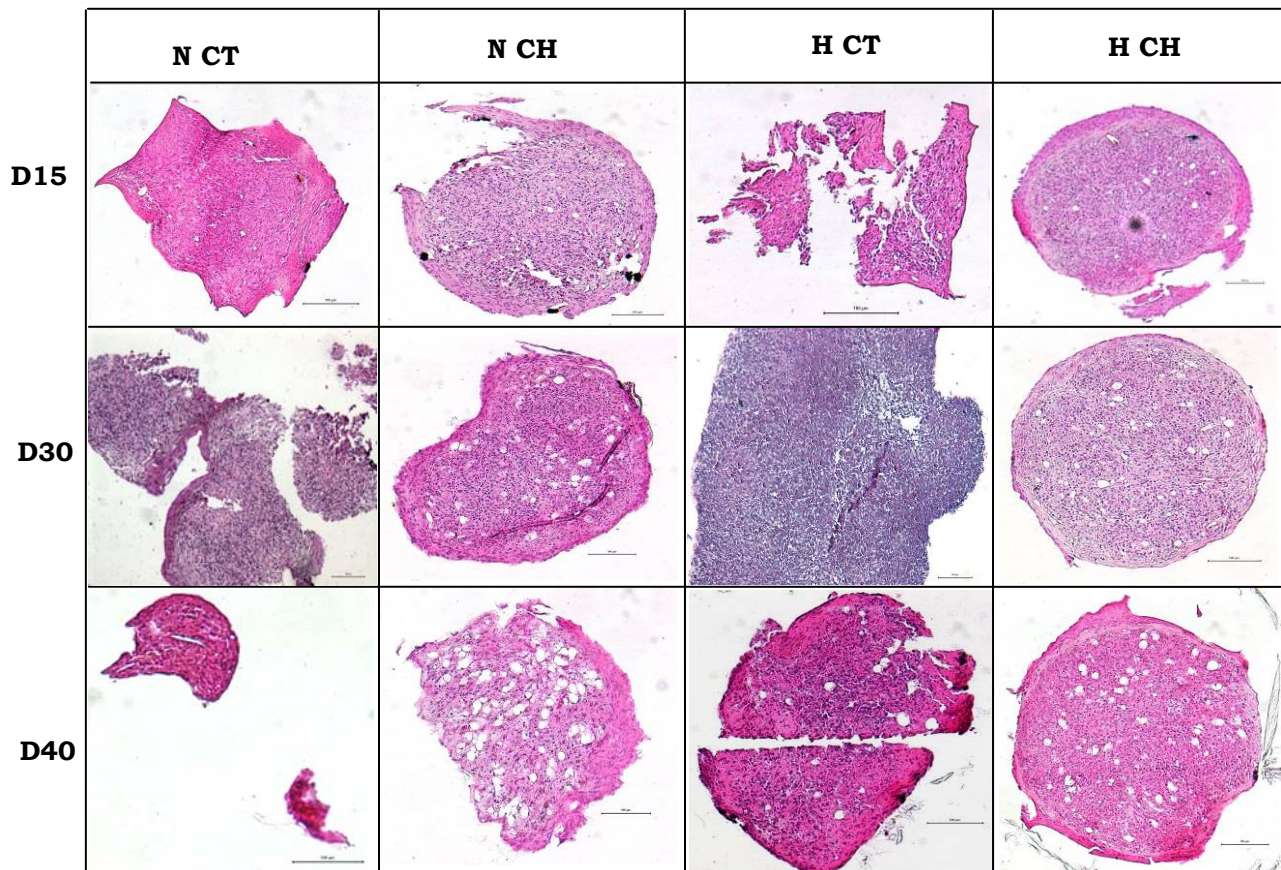
Podemos también, observar desde el día 14, que las células cultivadas con dexametasona presentan hipertrofia, con una abundante estructura vacuolar en el citoplasma y con el núcleo aplastado. Este hecho no era observable cuando las células se cultivaban en medio condrogénico sin dexametasona. Los pellets condrogénicos con Dexametasona, presentan mayor tamaño y mejores condiciones de las células que los que fueron cultivados en medio condrogénico sin dexametasona. Parece, por tanto, que la dexametasona permite una mejor viabilidad de los pellets.

Con la tinción de azul de Alcian (Figs. 53-56), se observó en las condiciones condrogénicas tinción positiva de la matriz celular a partir del día 15. En las condiciones de día 30 y día 40 en medio condrogénico, parecen aumentar ligeramente la expresión de proteoglicanos.

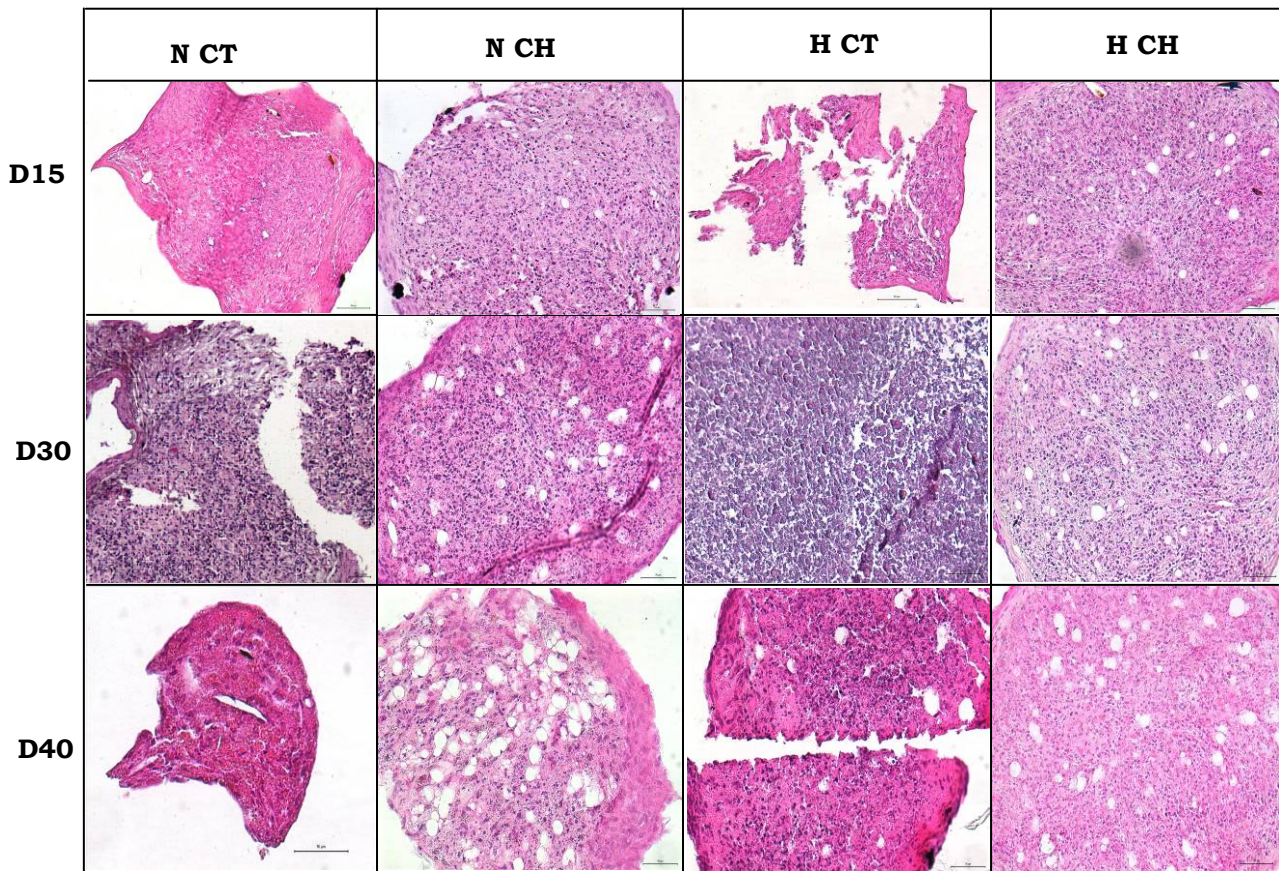
Con la tinción de TM (Figs. 57-60), se observó, tal como en el experimento anterior, un aumento de la intensidad de coloración en la periferia, y más acentuado en las condiciones de hipoxia. De esta forma, en la tinción de TM, en la condición HCH, podemos observar claramente en los días 15, 30 y 40 un anillo en región periférica del pellet.



**Figura 49** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (X50).

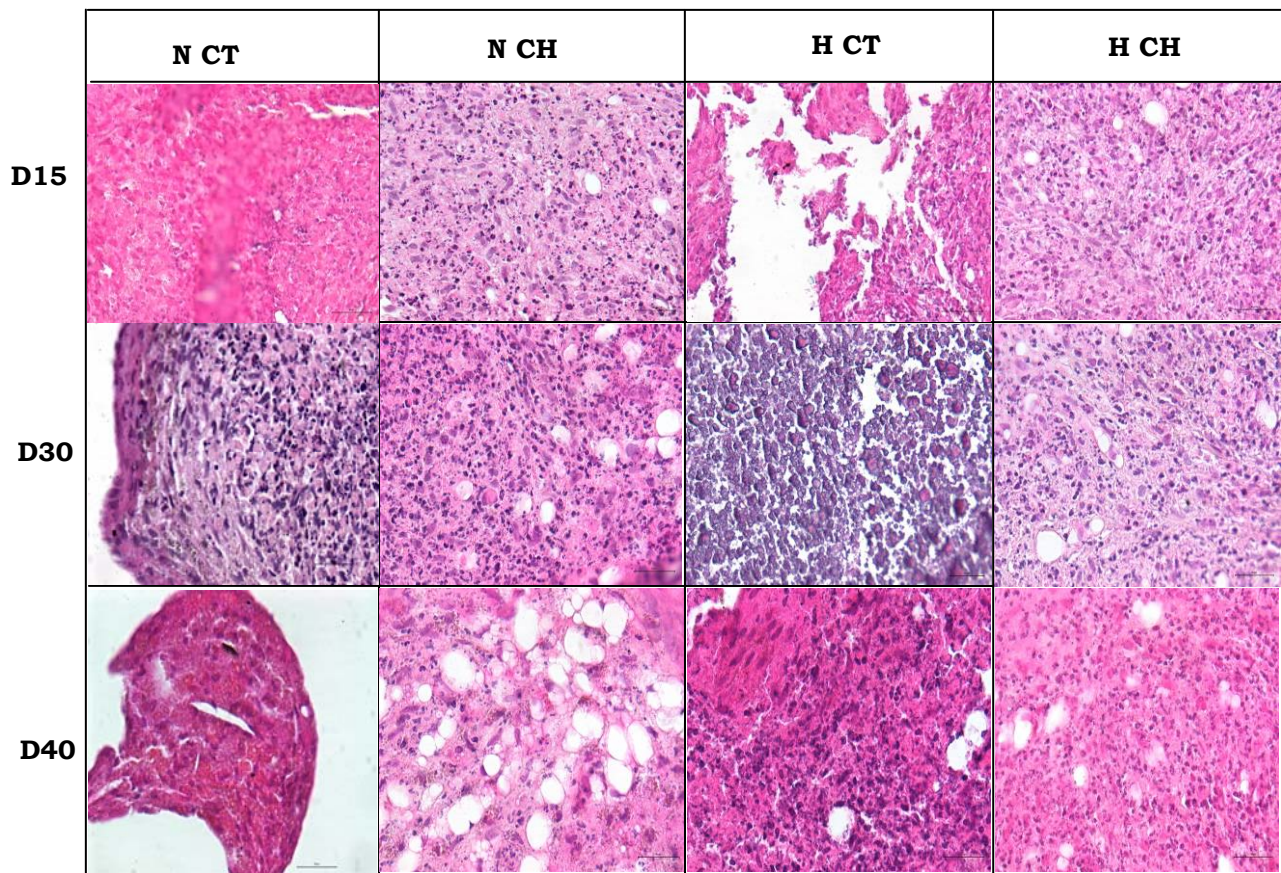


**Figura 50** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (X100).

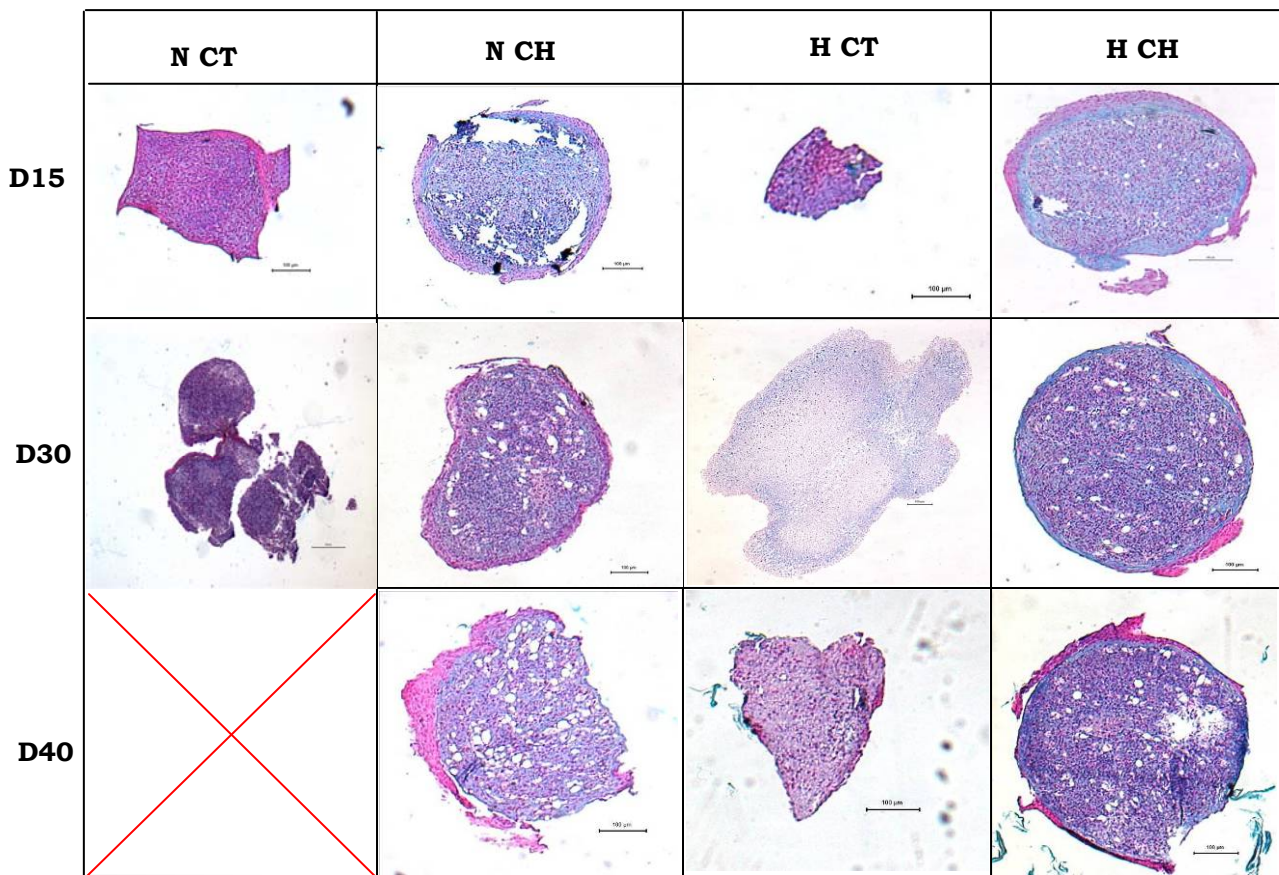


**Figura 51** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (X200).

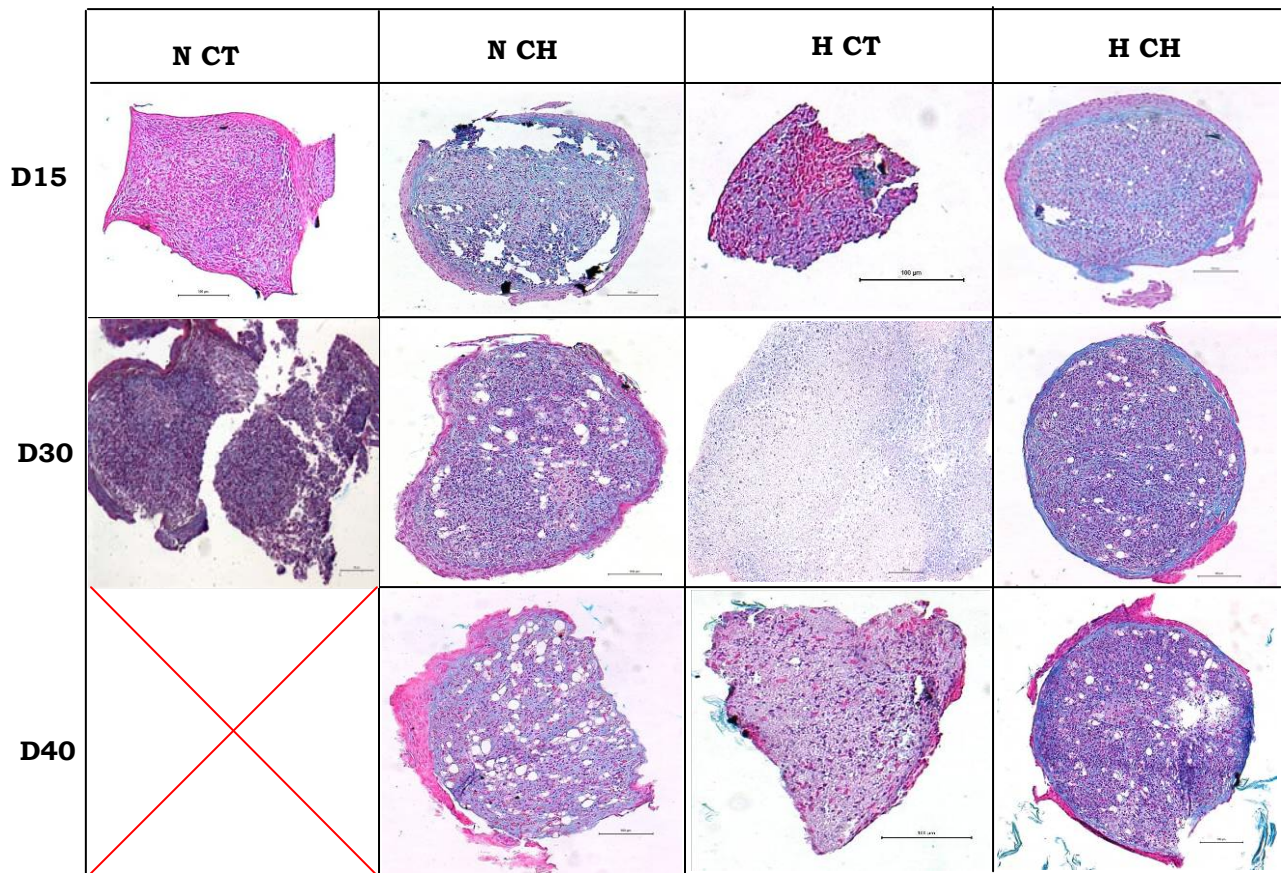




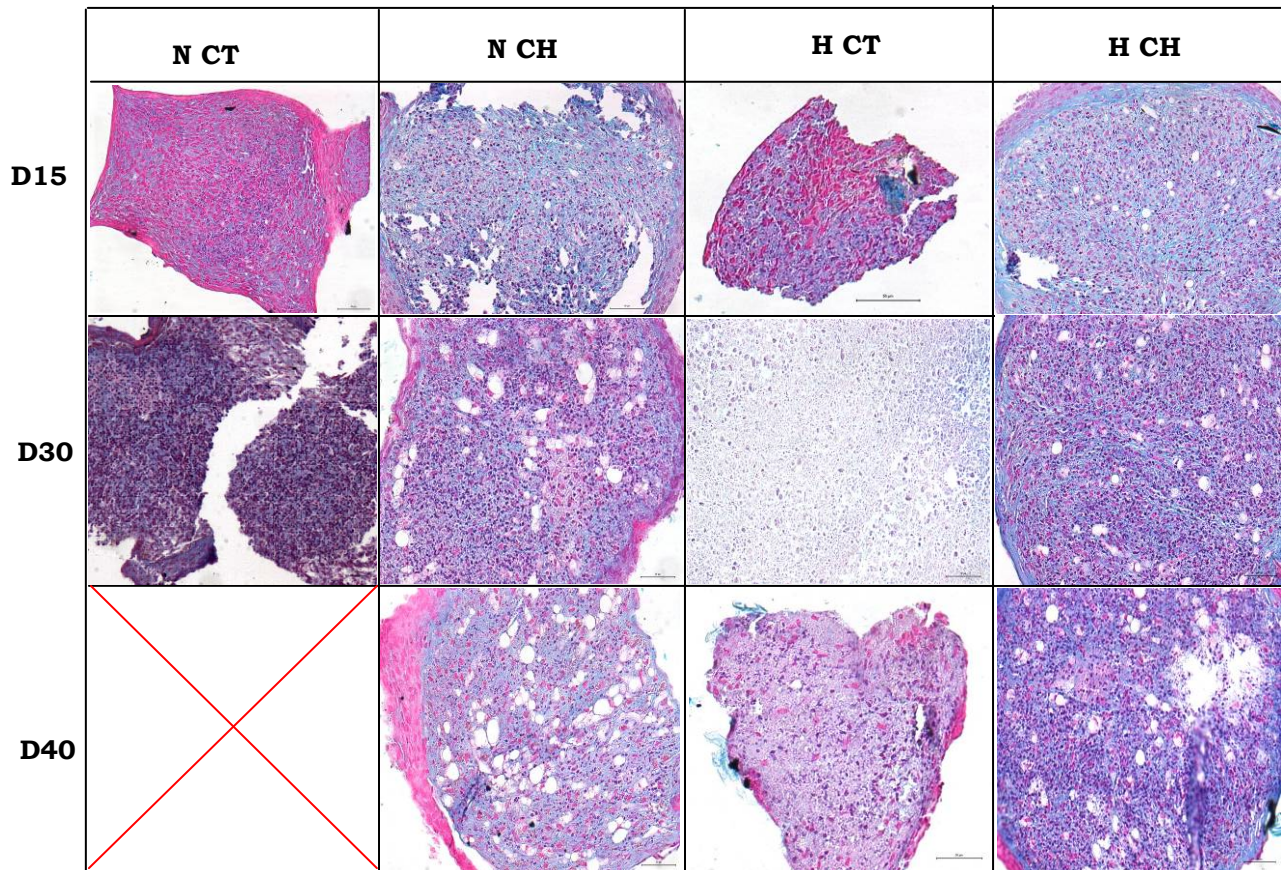
**Figura 52** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración H/E (X400).



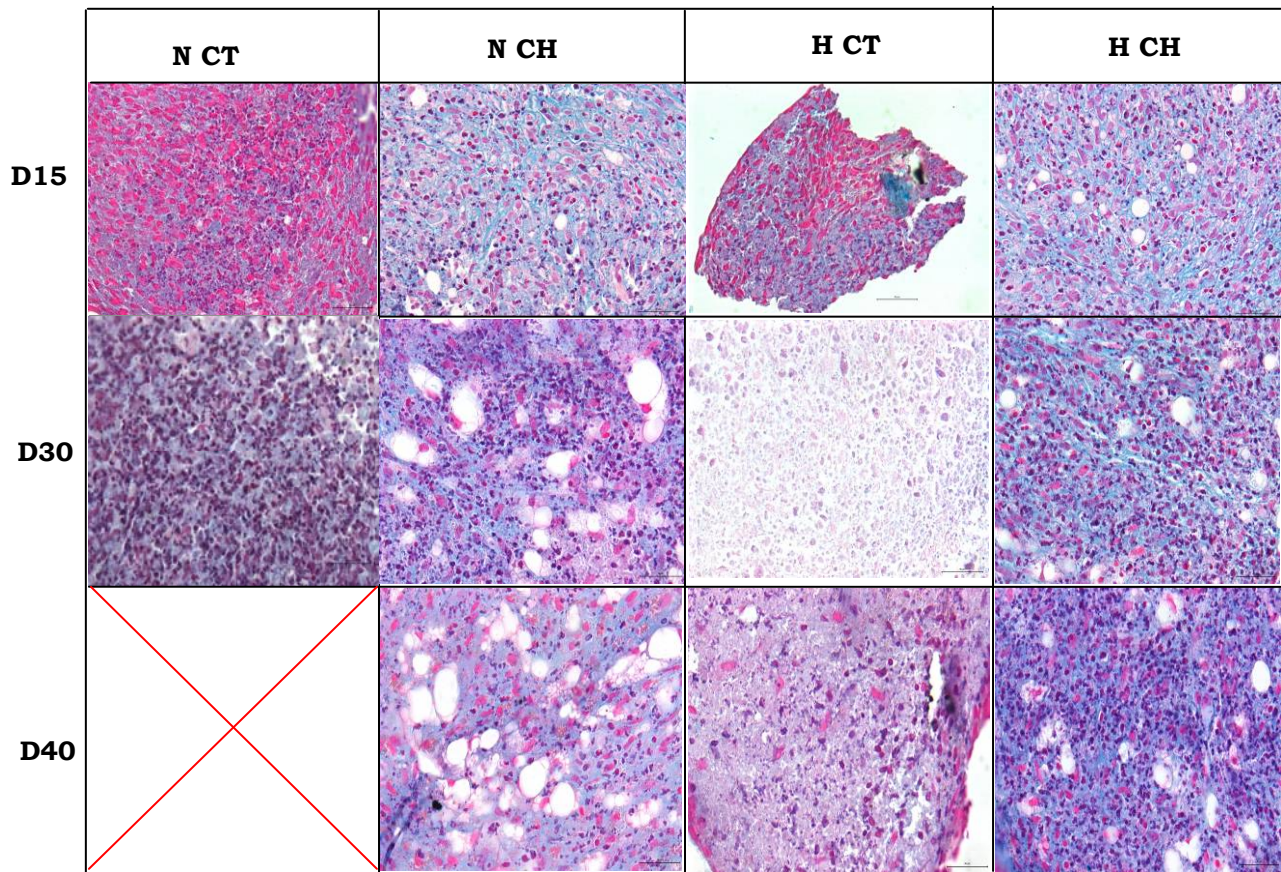
**Figura 53** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración azul de Alcian (x 50).



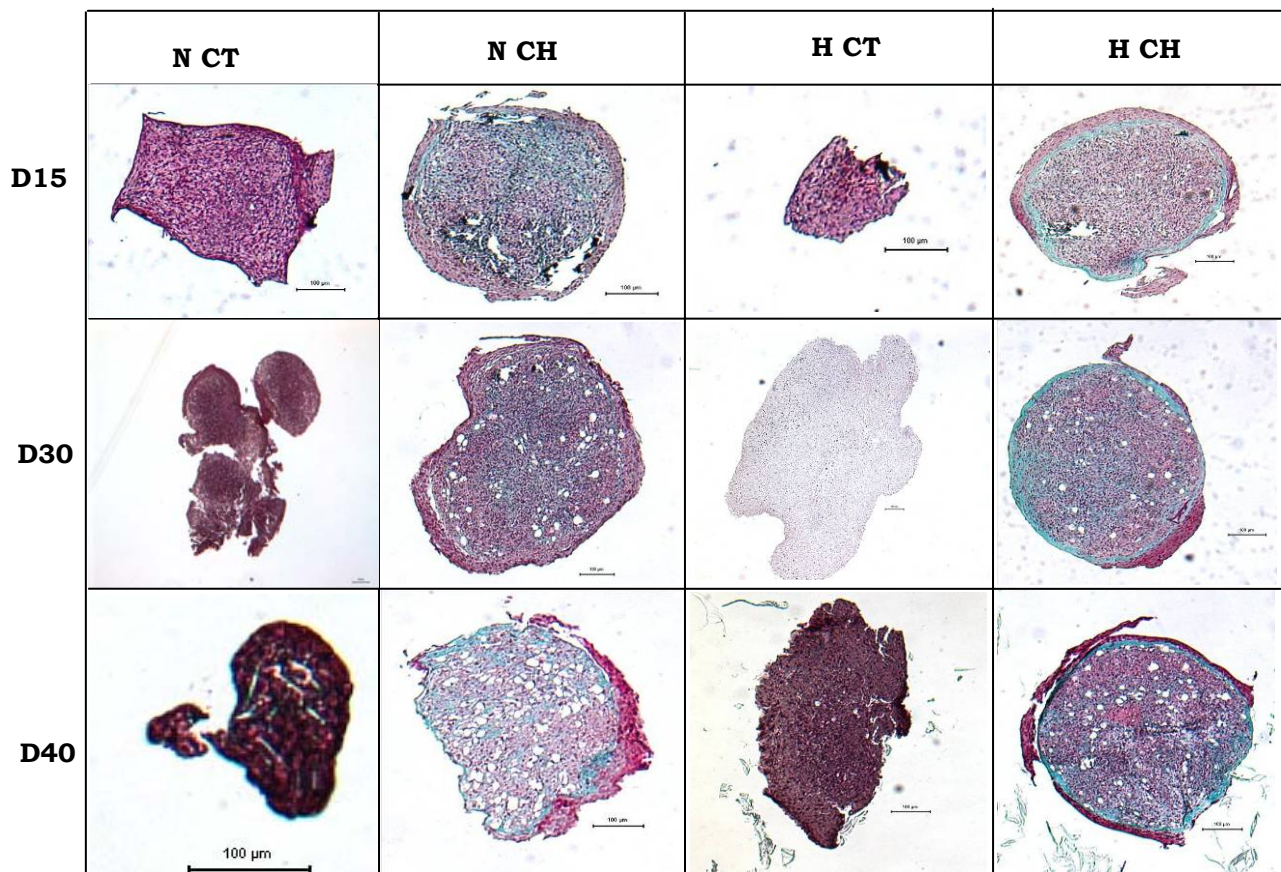
**Figura 54** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración azul de Alcian (x 100).



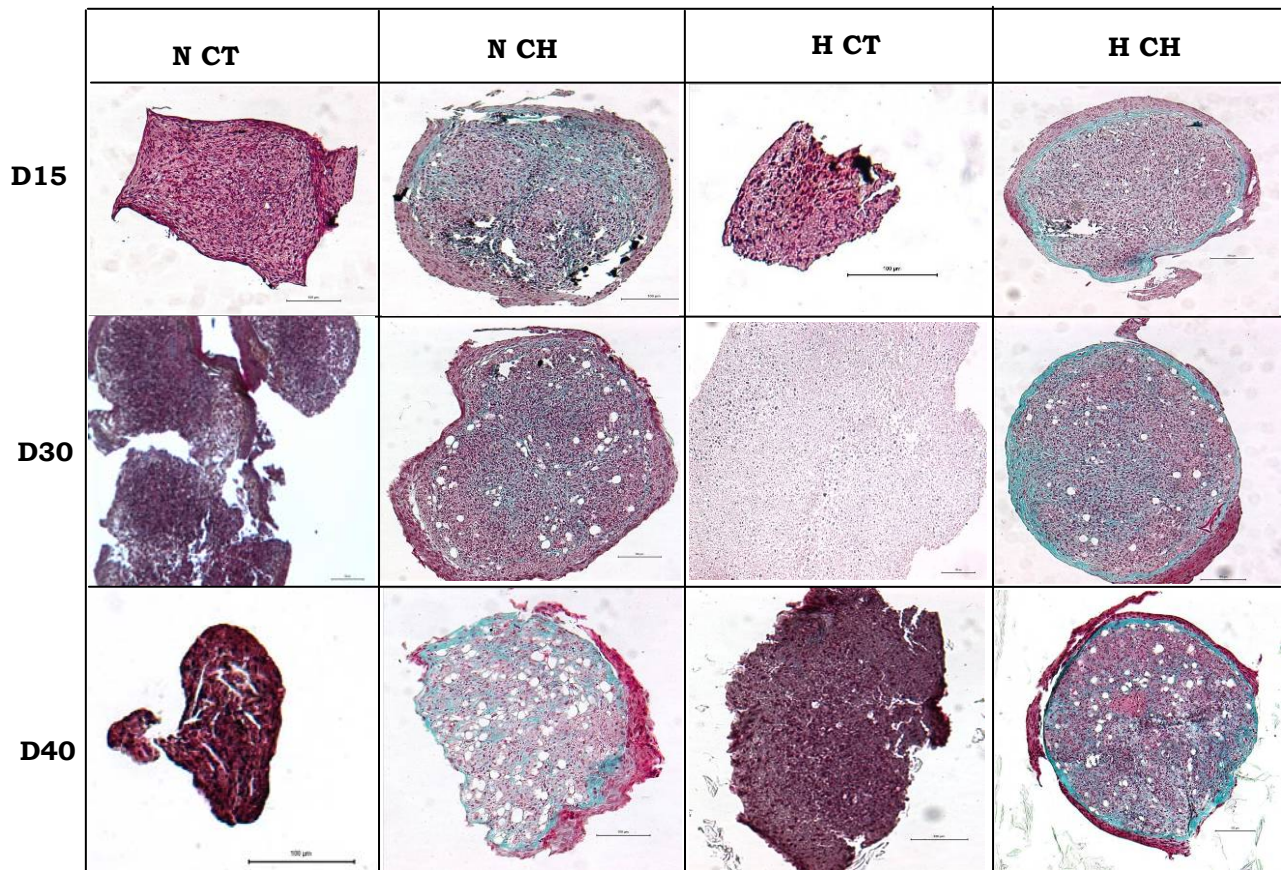
**Figura 55** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración azul de Alcian (x 200).



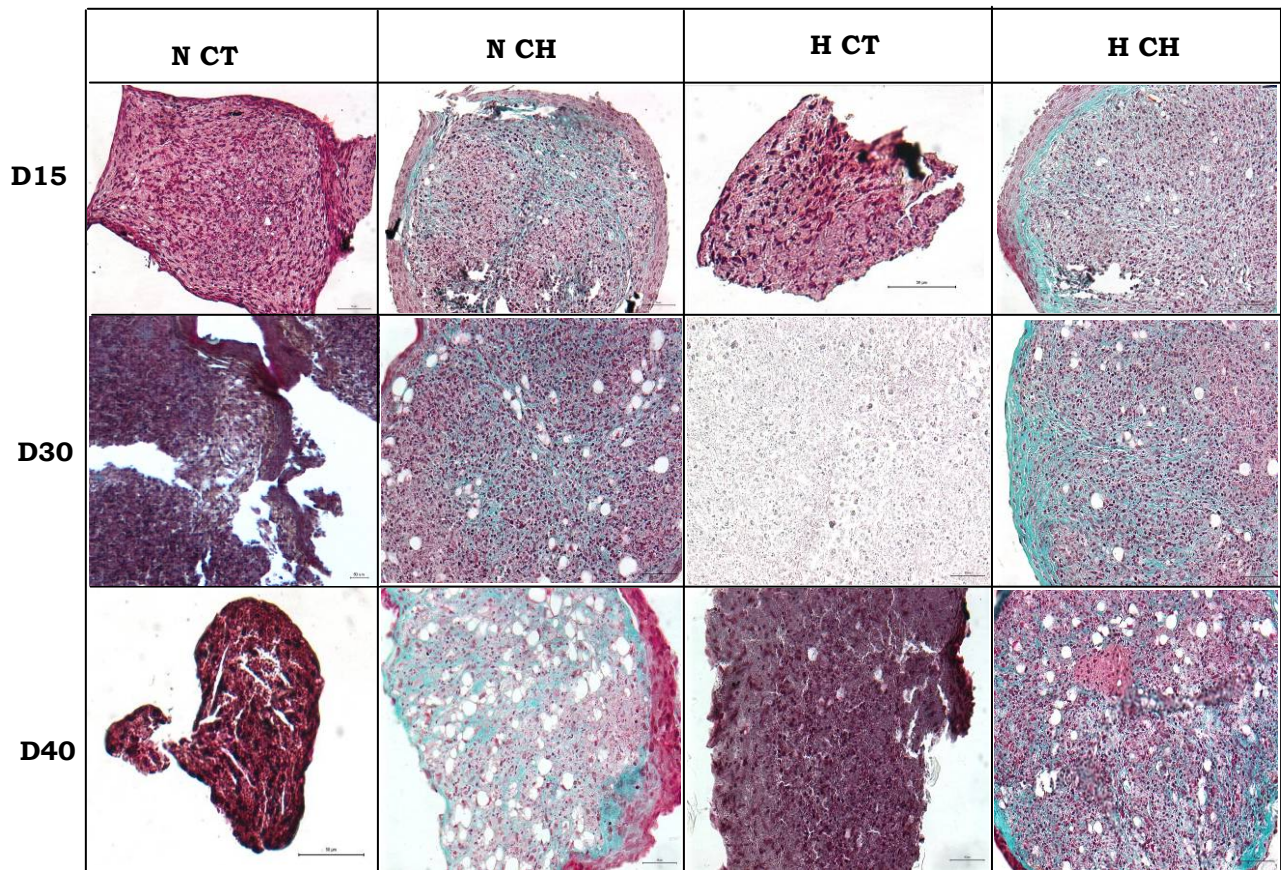
**Figura 56** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración azul de Alcian (x 400).



**Figura 57** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración TM (x 50).

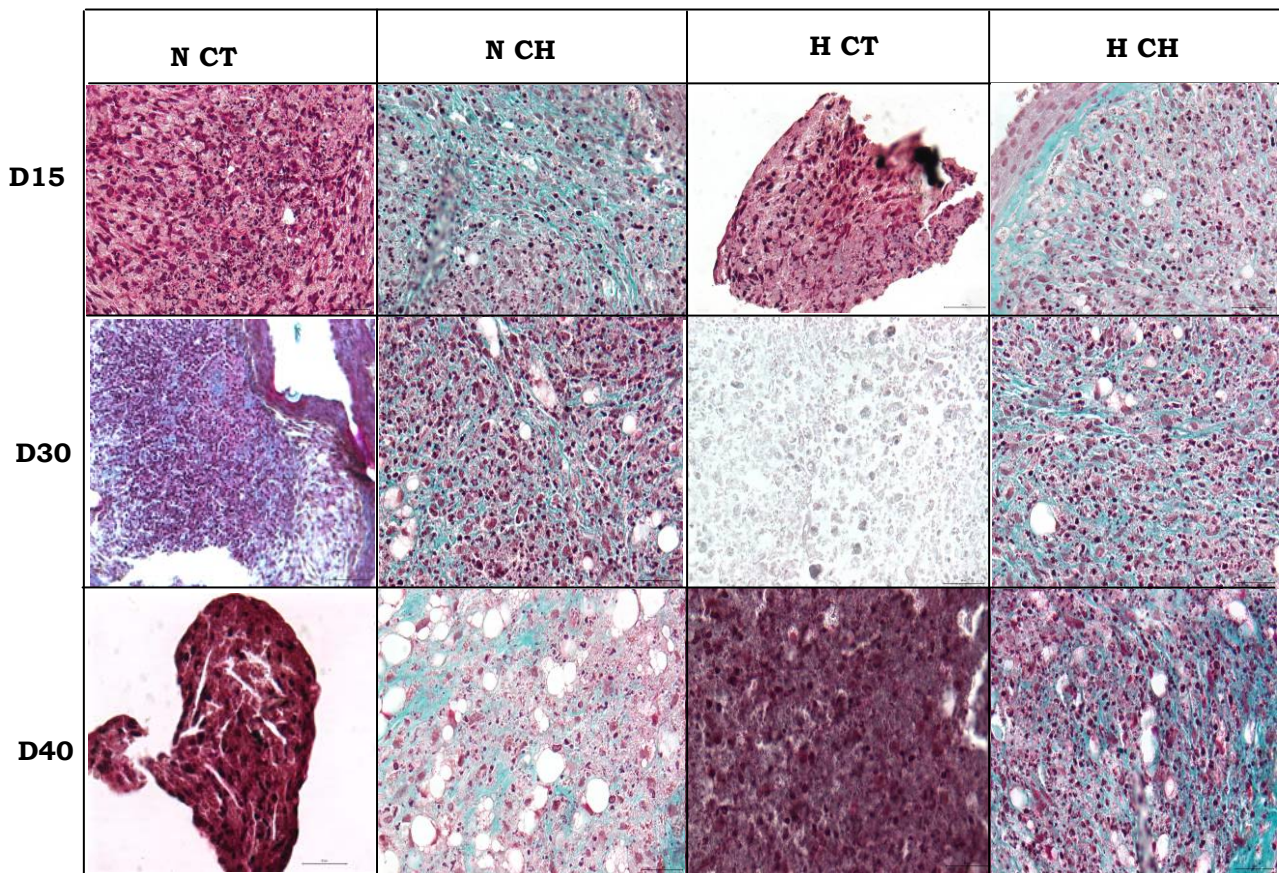


**Figura 58-** Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración TM (x100).



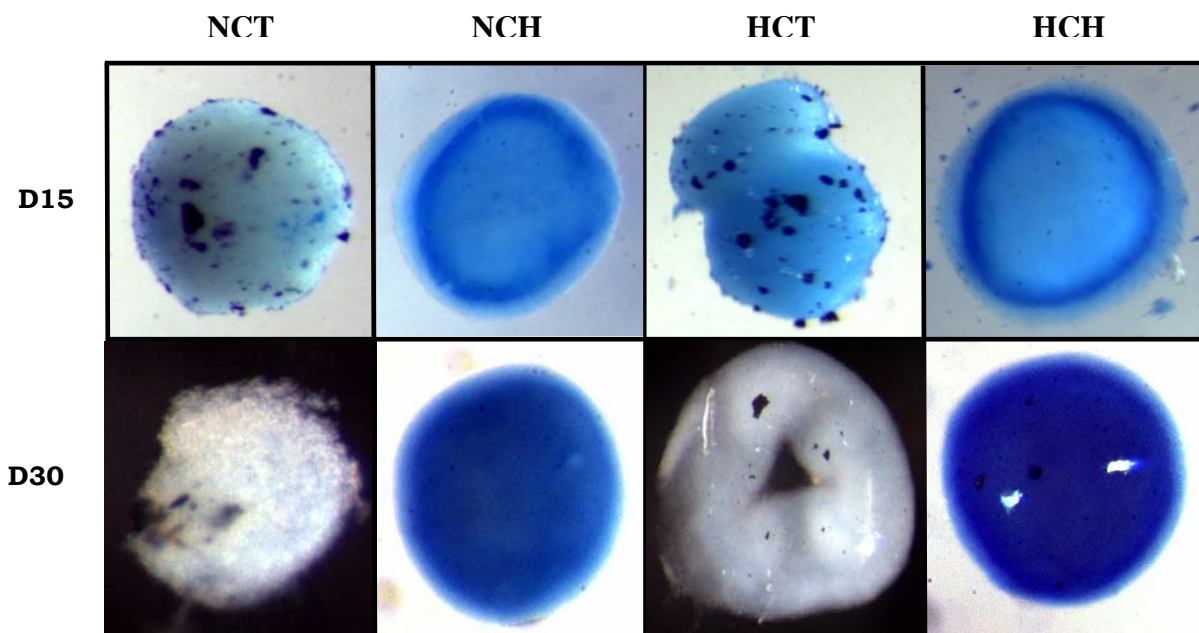
**Figura 59** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración TM (x200).





**Figura 60** - Cortes histológicos de los agregados CTDTA de caballo coloración TM (x400).

Con el fin de facilitar una visualización rápida de la condrogénesis, utilizamos una tinción de azul de Alcian, sobre el pellet entero (Fig. 61). Observamos una diferencia significativa entre las condiciones control y condrogénica para los días 15 y 30. En las condiciones condrogénicas, se vió una tinción positiva al azul de Alcian, mientras que esa expresión era negativa, para las condiciones control. Estas diferencias son más acentuadas en el día 30. A nivel macroscópico se pueden evidenciar conclusiones sobre las diferencias existentes entre las condiciones de hipoxia y normoxia.



**Figura 61** – Coloraciones histológicas de los agregados CTDTA de caballo azul de Alcian (x4).

## **5.-DISCUSIÓN**



La ingeniería de tejidos es un amplio campo de la ciencia, que busca el potencial de proporcionar soluciones permanentes para tejidos dañados (Langer y Vacanti, 1999). Esta ciencia tiene como principios básicos el uso de células, biomateriales y factores de señalización solos o combinados (Andersson y van den Berg, 2004).

Uno de los principales retos de este campo es el de encontrar una fuente celular ideal. Ésta debe cumplir una serie de requisitos como son el que debe ser aislada fácilmente, capaz de ser expandida y poder ser cultivada, para que pueda expresar y sintetizar moléculas cartilaginosas específicas (ej. colágeno tipo II y agregano) (Chung y Burdick, 2008). Se han estudiado diferentes abordajes celulares, siendo las utilizadas con más éxito, los condrocitos y las células troncales de distintos orígenes (Galois *et al.*, 2005).

Los condrocitos son la elección más sencilla, ya que se encuentran en el cartílago nativo y se han estudiado ampliamente, con el fin de descubrir su papel en producir, mantener y remodelar la matriz extracelular cartilaginosa. Sin embargo, estos condrocitos son células adultas que presentan el problema de tener una escasa proliferación y que cuando se cultivan sobre superficies plásticas se desdiferencian en células fibroblásticas. Cuando utilizamos los condrocitos nos encontramos con la necesidad de llevar a cabo una proliferación previa y una posterior rediferenciación de estos condrocitos.

Trabajos recientes se han enfocado a la utilización de células troncales multipotentes, que pueden ser aisladas de una amplia cantidad de tejidos. Estas células progenitoras pueden ser expandidas durante varios pases sin pérdida del potencial de diferenciación. Adicionalmente, todas las células pueden ser modificadas genéticamente para inducir y mejorar la condrogénesis (Chung y Burdick, 2008).

Para la realización de este trabajo, escogimos condrocitos auriculares y células troncales de grasa, con el objetivo de obtener cartílago *in vitro*. A pesar de los avances obtenidos, los progresos prácticos de esta tecnología han sido bloqueados por la falta de

capacidad para controlar el potencial de diferenciación de las células (Martin *et al.*, 2004).

### **5.1.- INFLUENCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS CONDROCITOS AURICULARES DEL CONEJO**

La respuesta fisiológica de los condrocitos para el mantenimiento de la matriz y respuesta a los estímulos, implica probablemente, la señalización de diversas fuentes incluyendo citocinas solubles, estimulación mecánica y señalización de la matriz extracelular

Las interacciones célula-matriz son importantes reguladoras de las funciones celulares, incluyendo aquí la síntesis de matriz, proliferación y diferenciación. Los condrocitos son un buen ejemplo por su característico fenotipo lábil, que se pierde en cultivo en monocapa. Este fenotipo se puede estabilizar en cultivo en suspensión bajo las condiciones apropiadas (Goessler *et al.*, 2006a).

En este trabajo caracterizamos los condrocitos auriculares de conejo y su matriz extracelular circundante, prestando especial atención a las relaciones entre ellos. La mayor parte de los estudios realizados acerca de las características de la matriz extracelular, se han realizado sobre el cartílago hialino, no existiendo muchos estudios en otros tipos de cartílago.

El conejo es un modelo muy adecuado para realizar análisis histológicos, bioquímicos y biomecánicos *in vitro* e *in vivo* en la reparación ósea y cartilaginosa (Floman *et al.*, 1980; Setton *et al.*, 1993; Sah *et al.*, 1997; LeRoux *et al.*, 2000). Además existen otros factores que nos llevaron a escoger el cartílago auricular de conejo, como son la facilidad de obtención de grandes cantidades de condrocitos sin comprometer la vida y las condiciones biológicas del animal, lo que permite su posterior utilización para efectuar implantes autógenos sin problemas. Algunos datos de estudios previos concluyen que el fenotipo

de este cartílago y el curso de su diferenciación son muy estables (Park y Ward, 1995), incluso en condiciones experimentales muy atípicas, como su transplante a la cámara anterior del ojo o al riñón (Bradamante *et al.*, 1991). Existen varios estudios dirigidos a la producción de cartílago auricular por técnicas convencionales de ingeniería de tejidos, y se ha visto que su implantación autógena dio resultados muy prometedores (Park y Ward, 1995; Britt y Park, 1998; Cao *et al.*, 1998a; Cao *et al.*, 1998b; Saim *et al.*, 2000; Arévalo-Silva *et al.*, 2001).

Los condrocitos auriculares ganaron importancia en los últimos años, debido a sus innumerables aplicaciones. De estas aplicaciones podemos destacar la reparación de tejido auricular (microtia) (Shieh *et al.*, 2004), la corrección del septum nasal (Yanaga *et al.*, 2006), el recubrimiento de las superficies lumbales de las prótesis del sistema cardiovascular (Scott-Burden *et al.*, 2002), reparación de los núcleos pulposos (Gorensek *et al.*, 2004), y el tratamiento de la deficiencia intrínseca del esfínter vesical (Bent *et al.*, 2001). Este tipo celular demostró tener como principal ventaja, con relación a otros tipos de condrocitos, poseer elevadas tasas de proliferación y baja morbilidad en el lugar de recogida de la biopsia (van Osch *et al.*, 2004). La utilidad de los condrocitos auriculares, por lo tanto, excede a la sustitución del cartílago elástico, siendo útil en varios campos.

### **5.1.1.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR *in situ***

Dentro de los diferentes tipos de cartílago en los mamíferos, el cartílago elástico auricular de la rata, ratón y murciélago tienen una estructura única (Baecker, 1928; Schaffer, 1930). Puede ser definida como celular (escasa matriz extracelular), elástica (fibras elásticas presentes en la matriz intercelular), y adiposa (transformación adiposa en los animales adultos) (Bradamant *et al.*, 1991). Existen pocos estudios de la ultraestructura del cartílago elástico, existiendo algunos

estudios en cartílago epiglótico de rata (Nelson, 1976; Nielson y Bitzer, 1979), otros en cartílago auricular de rata y ratón (Kostović-Knežević *et al.*, 1981; Bradamant *et al.*, 1991), no existiendo ningún estudio en cartílago auricular de conejo.

La percepción de la morfología del cartílago normal es fundamental, para tener un medio de comparación posterior que permita evaluar la calidad de las células obtenidas *in vitro*.

#### **5.1.1.1.- Caracterización morfológica**

Los estudios que realizamos a través de microscopía electrónica de transmisión vinieron a confirmar y esclarecer los resultados observados por microscopía óptica. Existe una clara diferencia de morfología entre las células de la zona periférica (con morfología fibroblástica) y las células de la zona central, que tienen una morfología redonda, con una única vesícula lipídica de gran dimensión que aplasta el núcleo hacia el margen de la célula, presentando estos condrocitos una gran similitud con los adipocitos.

Las vesículas de lípidos en los condrocitos fueron descritas previamente en condrocitos auriculares y cartílago hialino. En cartílago auricular, Sheldon en 1964, describió la presencia de una gran vesícula o varias pequeñas vesículas lipídicas en las células. Ishihara *et al.* en 1973, mencionaron que algunos condrocitos contienen vesículas de lípidos. Anderson en 1964, no observó la presencia de lípidos en el contenido del cartílago de animales jóvenes, mientras que en los adultos aparecía una gran vacuola lipídica central, como una de sus características más evidentes. Algunos autores (Anderson y Sadjera, 1971) demostraron la presencia de algunas vesículas de lípidos en células del cartílago hialino, mientras Thyberg y Friberg en 1971, encontraron lípidos en la zona hipertrófica del cartílago epifisario y, más frecuentemente, en la zona de calcificación que en otras zonas de la placa epifisaria. Thyberg *et al.* en 1973, no encontraron lípidos en las



células periféricas del cartílago costal, sin embargo, observaron un aumento en el contenido lipídico de las células intermedias y centrales.

El contenido de lípidos aumenta cuando nos acercamos hacia la zona central, hasta que el condrocito parece estar completamente lleno por una única vesícula de gran tamaño (Anderson, 1964).

Al contrario de lo observado por Nielson en 1976, constatamos que el RER está bastante desarrollado, estas diferencias se pueden deber a que este estudio se desarrolló en cartílago de epiglotis de rata.

En el cartílago auricular de conejo, la matriz territorial y la matriz interterritorial tienen una menor dimensión y están recubiertas por fibras elásticas espesas, al contrario de lo que ocurre en el cartílago articular (Poole *et al.*, 1984; Hunziker *et al.*, 1984; Hunziker y Schenk, 1984; Hunziker *et al.*, 1997). Comparativamente con el cartílago auricular de rata, el de conejo parece tener algo más de cantidad de matriz intercelular.

#### **5.1.1.2.- Caracterización de la distribución de los componentes de la matriz extracelular e integrinas**

Los resultados de la reparación y estudios *in vitro*, usualmente se correlacionan con el tejido cartilaginoso nativo y se centran en observaciones morfológicas, pruebas biomecánicas y análisis bioquímicos. Se han constatado, entre los diferentes subtipos de cartílago, diferencias en la matriz extracelular y biomecánicas (Naumann *et al.*, 2002). De esta forma, es importante caracterizar la expresión en el cartílago auricular *in situ*, de los componentes de la matriz y sus receptores, para que puedan ser comparados con otros experimentos *in vivo* e *in vitro*. Debido a su relevancia económica, muchos de los estudios se han realizado sobre cartílago hialino humano, siendo pocos los trabajos en otras especies y con otros tipos de cartílago (Woods *et al.*, 1994; Salter *et al.*, 1995; Ostergaard *et al.*, 1998).

El cartílago auricular de conejo demostró expresar cantidades significativas de colágeno II, en la región pericelular y menores cantidades en la matriz territorial y matriz interterritorial. El hecho de tener una mayor tinción en la región pericelular que en el resto de la matriz es característico del cartílago nasal y auricular (Naumann *et al.*, 2002). El colágeno tipo II no se expresa en el pericondrio, confirmando el estado indiferenciado de estas células. Estos resultados son coincidentes con los realizados por otros autores en el cartílago auricular de conejo (Madsen *et al.*, 1984; Naumann *et al.*, 2002). La expresión de colágeno tipo II en la matriz territorial e interterritorial parece ser común a todos los tipos de cartílago, existiendo pequeñas diferencias cuantitativas de su expresión. El cartílago nasal y articular parecen tener una mayor expresión de colágeno II en la matriz pericelular e interterritorial respectivamente (Naumann *et al.*, 2002). Confirmando los resultados anteriores por RT-PCR, podemos observar que el cartílago auricular de conejo expresaba colágeno tipo II y agrecano. Curiosamente observamos menores cantidades de expresión de colágeno II que de proteoglicanos.

En la tinción de azul de Alcian observamos una tinción fuerte azul en la región pericelular, sinónimo de la presencia de grandes cantidades de proteoglicanos. Estudios demostraron que en el cartílago articular, los proteoglicanos de la región pericelular podrían ser: queratán-sulfato, ácido hialurónico (Mason, 1981), proteoglicanos sulfatados (Pool *et al.*, 1984), perlecano (SundarRaj *et al.*, 1995), agrecano (Pool *et al.*, 1984) y biglicano (Miosge *et al.*, 1994).

Complementando la información que habíamos recogido por microscopía electrónica, observamos expresión de las fibras elásticas en la matriz territorial e interterritorial. Comparando con otros tipos de cartílago, vemos que los cartílagos elásticos son los que tienen mayor expresión de estas fibras en la matriz territorial e interterritorial. El cartílago nasal, expresa también gran cantidad de fibras elásticas en la región pericelular (Naumann *et al.*, 2003).

El control de la función condrocítica es fundamental para mantener la estructura y organización de este tejido. En un tejido poco celular como el cartílago, las interacciones célula matriz son potencialmente importantes en la regulación del metabolismo condrocítico (Salter *et al.*, 1992). Existen varios estudios sobre la expresión de integrinas en cartílago hialino (Salter *et al.*, 1992; Woods *et al.*, 1994; Ostergaard *et al.*, 1998), siendo el nuestro, el primer estudio realizado sobre la expresión de las integrinas en cartílago auricular. Este estudio demostró una fuerte expresión de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$  y el heterodímero  $\alpha \nu \beta 3$ , en este tipo de cartílago.

La subunidad  $\beta 1$  se expresa de forma bastante significativa al igual que ocurre en el cartílago articular (Woods *et al.*, 1994). Esta subunidad parece tener un papel importante en la conexión al colágeno, específicamente al de tipo II. La co-localización de la subunidad  $\beta 1$  y el colágeno tipo II, que observamos, permiten suponer que existe relación entre ellos, confirmando, de esta forma, la teoría de que las integrinas  $\alpha 1 \beta 1$ ,  $\alpha 2 \beta 1$  e  $\alpha 10 \beta 1$  son los receptores del colágeno tipo II (Loeser, 2002).

Se observó un aumento en la expresión de la subunidad  $\beta 1$  en el cartílago osteoartítico (OA) cuando se comparó con el cartílago normal. El mayor aumento relativo, tanto en cultivos como en OA fue para la integrina  $\alpha 1 \beta 1$  (Loeser *et al.*, 1995).

Observamos que el cartílago auricular expresa cantidades elevadas de las subunidad  $\alpha 5$  en la región pericelular. La subunidad  $\alpha 5$  esta presente en diversidad de tejidos, concretamente en células epiteliales, endoteliales, leucocitos y fibroblastos (Hemler *et al.*, 1987; Adams y Watt, 1990).

La co-localización de las subunidades  $\alpha 5$  con la  $\beta 1$  nos lleva a sospechar de la presencia de la integrina  $\alpha 5 \beta 1$ , receptor para la fibronectina (Loeser, 2000). La fibronectina en el cartílago parece estar localizada en la región pericelular, coincidiendo las dos subunidades, dando fuerza a esta suposición (Burton-Wurster *et al.*, 1988; Danen *et*

*al.*, 2002). Salter *et al.* en 1992, realizaron estudios de inmunohistoquímica en cartilago articular adulto humano, donde demostraron que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  era la que presentaba la expresión más abundante en este tejido, mientras que las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y la  $\alpha 3\beta 1$  tenían una expresión menor y variable.

Kurtis *et al.* en 2003, obtuvieron resultados que demuestran que en condrocitos articulares humanos la  $\alpha 5\beta 1$ , tiene un papel importante en la adhesión y mantenimiento de los condrocitos en el lugar del defecto después de procedimientos clínicos de trasplante de condrocitos.

En células aisladas de cartilago articular humano, la matriz extracelular favorece la supervivencia de los condrocitos vía receptores de la fibronectina. La implicación de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en prevenir la muerte celular, puede ser particularmente importante en los momentos precoces en cultivo, cuando tiene lugar la neoformación de la matriz extracelular (Pulai *et al.*, 2002).

La presencia de la  $\alpha v\beta 3$  puede relacionarse con la presencia de trombospondina, aunque esta proteína no esté descrita todavía en el cartilago auricular. La presencia de este receptor y el hecho de estar presente en el cartilago articular, específicamente la trombospondina-1, nos lleva a pensar en su posible presencia, siendo posiblemente, un factor de adhesión de los condrocitos. Usando la combinación de la inmunohistoquímica, de la inmunofluorescencia indirecta Woods *et al.* en 1994, verificaron en cartilago articular humano adulto, que el heterodímero  $\alpha v\beta 3$  era notablemente más reactivo en los condrocitos en las capas localizadas junto a la superficie articular. Las integrinas que contienen a la integrina  $\alpha v$ , se conectan a la vitronectina, osteopontina y pueden ser una alternativa para los receptores de la FN (Yang y Hynes, 1996).

De esta forma, constatamos que existe una co-localización de estas integrinas con el colágeno, fibronectina, trombospondina y proteoglicanos, teniendo certeza de que existe una influencia importante de estos componentes sobre el comportamiento de los

condrocitos. Aunque debemos ser cautelosos en la interpretación de los resultados de estos estudios. El tipo de fijación y procesamiento así como el potencial de enmascarar los epítomos por las proteínas de la matriz, pueden afectar a los resultados inmunohistoquímicos (Loeser, 2000).

### **5.1.2.- CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CARTILAGINOSAS**

#### **5.1.2.1.- Caracterización de las células cartilagosas en cultivo**

En la búsqueda de un sustituto cartilagososo, se han encontrado varios problemas, siendo el principal, la dificultad de obtener células cartilagosas en cantidad suficiente, para recubrir el defecto cartilagososo (Jackson *et al.*, 2001). La ingeniería de tejidos, con el objetivo de intentar obviar este problema, multiplica las células obtenidas por biopsia *in vitro* y posteriormente se implantan *in vivo*.

Constatamos que los condrocitos auriculares de conejo, cuando se cultivaban sobre superficies plásticas se desdiferenciaban. El fenómeno de desdiferenciación fue descrito por Holtzer, en 1960, y en 1977, von der Mark, sugirió que este proceso tendría, posiblemente, origen en las interacciones establecidas entre la matriz extracelular (concretamente el colágeno) y los condrocitos.

El cartílago auricular contiene como principales componentes de la matriz extracelular la elastina (el mayor componente), el colágeno tipo II y los proteoglicanos. Aunque esté demostrado que los condrocitos recién aislados del cartílago, sintetizan elastina (Moskalewski, 1976), nosotros en monocapas de cultivos de tres pases no observamos histológicamente fibras elásticas, colágeno tipo II ni proteoglicanos. Es decir, las células desdiferenciadas en monocapa, no expresan significativamente elementos característicos de la matriz del cartílago.

Se piensa que la modificación de las interacciones célula-matriz pueden ser la razón de la pérdida del potencial condrogénico (Chen *et al.*, 1995). Las interacciones célula-matriz están mediadas por receptores específicos, por ejemplo, las integrinas (Durr *et al.*, 1993;

Enomoto *et al.*, 1993; Shakibaei *et al.*, 1997; Shakibaei *et al.*, 1999; Mobasheri *et al.*, 2002). Las integrinas desempeñan un papel en la diferenciación precoz del cartílago, una vez que la presencia de anticuerpos anti-integrinas es capaz de inhibir la diferenciación de células del blastema en condroblastos (Shakibaei, 1998).

En nuestro trabajo observamos la expresión de  $\beta 1$  en condrocitos cultivados en monocapa. Shakibaei *et al.* en 1997, comprobaron que la influencia en el comportamiento celular, de las interacciones condrocito/colágeno tipo II, es dependiente de la acción de la subunidad  $\beta 1$ . Goessler *et al.* en 2005b, observaron en cartílago del septo nasal de humanos, que la expresión de  $\beta 1$  aumentaba a medida que los condrocitos se desdiferenciaban.

La delección mediada por Cre/loxP del gen de la subunidad  $\beta 1$ , aparece en la condrodisplasia severa, con elevada tasa de mortalidad. Esta condrodisplasia se caracteriza por tener condrocitos con forma anormal, cuya organización en columnas en la placa de crecimiento está alterada, aparece un reducido número celular y una red anormal de fibrillas de colágeno (Aszodi *et al.*, 2003).

El cartílago auricular también expresa cantidades elevadas de  $\alpha 5$ , que conjuntamente, con los resultados de la subunidad  $\beta 1$ , nos lleva a pensar en una elevada expresión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en los condrocitos en monocapa. Previamente se describió, que en condrocitos primarios, la integrina más abundante es el receptor para la fibronectina  $\alpha 5\beta 1$  (Shakibaei *et al.*, 1999). Las subunidades  $\beta 1$  y  $\alpha 5$  pueden ser marcadores de la actividad sintética, su presencia aumenta a medida que los condrocitos intentan generar matriz extracelular necesaria para su supervivencia (Spiteri *et al.*, 2008).

Durante la desdiferenciación de los condrocitos, se activan los componentes del receptor de la fibronectina  $\alpha 5\beta 1$ . Conjuntamente con esta activación del receptor de la fibronectina, se pone de manifiesto la sobrerregulación de la fibronectina en el curso de la desdiferenciación. Un hecho curioso es que por un lado, el receptor de la fibronectina puede ser marcador para células indiferenciadas (Fukumoto *et al.*,

2002) y por otro lado, este receptor puede auxiliar el proceso de desdiferenciación (Goessler *et al.*, 2006a; Goessler *et al.*, 2006b).

Tuckwell *et al.* en 1994, describieron que la  $\alpha 5\beta 1$  media la adhesión al colágeno desnaturalizado por un puente de fibronectina. Estudios demostraron que la regulación de la producción de las MMP13, era influenciada por la  $\alpha 5\beta 1$ , desempeñando, esta integrina, un papel fundamental en la osteoartritis (Forsyth *et al.*, 2002; Loeser *et al.*, 2003).

Los receptores para la vitronectina y osteopontina ( $\alpha v\beta 3$ ) o laminina ( $\alpha 6\beta 1$ ) se han descrito en el cartílago articular (Enomoto *et al.*, 1993; Durr *et al.*, 1993). En los condrocitos auriculares, a pesar de que observamos marcaje en algunas células, vemos que la expresión del  $\alpha v\beta 3$  no se altera significativamente con el proceso de desdiferenciación.

Otros receptores, no estudiados por nosotros, que parecen tener influencia en la desdiferenciación son  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ . Durante la desdiferenciación en cultivos en monocapa y también en cartílago en envejecimiento, los condrocitos pasan de producir colágeno tipo II a producir colágeno tipo I y sintetizan receptores de la superficie celular (integrinas) la  $\alpha 3$  para  $\alpha 1$  (Shakibaei *et al.*, 1993; Shakibaei *et al.*, 1995). Durante la condrogénesis inicial, existía un cambio del tipo I de colágeno hacia el tipo II, y de la subunidad  $\alpha 1$  hacia la  $\alpha 3$  (Shakibaei *et al.*, 1995).

Los resultados de la expresión de las integrinas *in vitro*, parecen presentar diferencias variadas entre los diversos estudios. Los niveles de integrinas medidos en los condrocitos pueden verse afectados por las condiciones proteolíticas necesarias para disociar las células de la matriz, por el estado de diferenciación de las células, adición de suero o factores de crecimiento, tiempo de cultivo y origen de las células (Loeser, 1997; Loeser *et al.* 2000; Knudson y Loeser, 2002; Kim *et al.*, 2003; Fukumoto *et al.*, 2002; Goessler *et al.*, 2005a).

### **5.1.2.2.- Rediferenciación por agregación**

Se sabe, y fue constatado también por nosotros, que los condrocitos auriculares sufren alteraciones morfológicas cuando se cultivan sobre superficies plásticas. Se ha demostrado que este cambio fenotípico se acompaña de un aumento, relativamente rápido, en la producción de colágeno I y por una disminución gradual de la producción de colágeno tipo II (Zaucke *et al.*, 2001; Schnabel *et al.*, 2002). También, a lo largo de los pases, las cantidades de proteoglicanos van disminuyendo.

Está descrito que se pueden rediferenciar los condrocitos por diferentes sistemas; por una parte cultivo en alginato (Bonaventure *et al.*, 1994; Hauselmann *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998), en cultivos 3D y cultivos en superficies recubiertas por agar (Villar-Suárez *et al.*, 2004), entre otros.

Los contactos célula a célula parecen desempeñar un papel importante durante la primera fase de la diferenciación condrocítica, en una fase conocida como condensación celular (Denker *et al.*, 1999; Loty *et al.*, 2000). Esta fase parece ocurrir en los momentos precoces de cultivos de elevada densidad. La rediferenciación de condrocitos desdiferenciados en cultivos de elevada densidad es similar a la diferenciación condrocítica primaria de las células mesenquimales.

En nuestros trabajos de cultivos de condrocitos en agar, constatamos la formación de agregados con mucha producción de matriz extracelular. Observamos que las células del centro del agregado presentan una morfología redonda y las de la periferia una morfología más fibroblástica. La expresión de colágeno tipo II y proteoglicanos, fue más significativa en el centro del agregado, confirmando que las células rediferenciadas se encuentran en la zona central de las formaciones cartilagosas. Se sabe que los condrocitos únicamente manifiestan una gran proliferación cuando las tensiones de oxígeno son bajas, y tienden a desdiferenciarse en un ambiente normóxico y rediferenciarse en condiciones de hipoxia *in vitro* (Domm *et al.*, 2002; Malda *et al.*,



2004). La hipótesis que planteamos es que las células del centro del agregado, como están sujetas a menor tensión de oxígeno, se rediferencian, mientras que las que están en la periferia, debido a su exposición al oxígeno permanecen más desdiferenciadas.

Escogimos células de monocapa en P3, porque varios estudios refieren que células desdiferenciadas provenientes de monocapas P5-P8, no son capaces de rediferenciarse ni en cultivos de elevada densidad, ni en cultivos en alginato. Estas células se mantuvieron fibroblásticas y no produjeron ningún marcador cartilaginoso específico, ni en monocapa ni en cultivos en alginato (Schulze-Tanzil *et al.*, 2002).

El colágeno tipo II y el agrecano son importantes marcadores para evaluar el grado de diferenciación celular. Los resultados que obtuvimos por RT-PCR en las monocapas de P3 y en los agregados de P3, confirman las diferencias fenóticas que observamos en los cultivos. No obstante, aunque ambos tipos celulares expresaron marcadores de diferenciación condrocítica, observamos una amplificación bastante más significativa en los agregados, demostrando que el cultivo en agregación, promueve la rediferenciación.

Estudios realizados en condrocitos articulares evidenciaron que, a pesar de que las células se desdiferenciaban fenotípicamente a partir del primer pase, los marcadores de diferenciación condrogénica sólo desaparecen totalmente al cabo de 16 semanas, quedando claro que es más complicado rediferenciar las células cuanto mayor es el número de semanas en cultivo (Zaucke *et al.*, 2001).

Además de esto, otros marcadores pueden ser estudiados en el futuro para poder juzgar mejor el potencial de rediferenciación, concretamente la proteína oligomérica cartilaginosa (COMP) y el colágeno IX, ya probados como marcadores sensibles y precoces para el estado de diferenciación de los condrocitos articulares primarios (Zaucke *et al.*, 2001; Darling y Athanasiou, 2005).

Se observó que factores de crecimiento como el FGF-2 y BMP-2 pueden inducir la rediferenciación (Denker *et al.*, 1999; Martin *et al.*,

1999) aumentando la expresión del factor de transcripción Sox9 (Enomoto-Iwamoto *et al.*, 1998; Healy *et al.*, 1999).

## **5.2.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES A PARTIR DEL TEJIDO ADIPOSEO DE RATA**

La ingeniería de tejidos ofrece la posibilidad de reparación o sustitución de tejidos enfermos o dañados. El componente celular de esta aproximación regenerativa desempeña un papel fundamental en el desarrollo de esta tecnología (Strem *et al.*, 2005). Las células troncales derivadas del tejido adiposo ofrecen una alternativa prometedora, siendo una fuente abundante y asequible de células troncales (Gimble y Guilak, 2003; Frazer *et al.*, 2006).

A pesar de las ventajas de estas células, el progreso en su utilidad en ingeniería de tejidos se ha visto limitado por la dificultad para ejercer el control sobre su diferenciación. Las células troncales tienen una mayor capacidad proliferativa que los condrocitos articulares adultos, pero no tienen la habilidad intrínseca para diferenciarse en condrocitos, si no se les proporcionan estímulos específicos (Huckle *et al.*, 2003).

En este trabajo, en primer lugar obtuvimos y cultivamos células troncales derivadas del tejido adiposo de la región abdominal e inguinal de rata. A continuación evaluamos y caracterizamos las células obtenidas y comprobamos su capacidad para diferenciarse en adipocitos, condrocitos y células neuronales *in vitro*. Finalmente, estudiamos la criopreservación de estas células y comprobamos su capacidad de adhesión a varios biomateriales susceptibles de ser utilizados en ingeniería del tejido cartilaginoso.

### **5.2.1.- OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MULTIPOTENTES**

*Especie, lugar y método de recogida del tejido*

La especie escogida para la realización de este trabajo científico fue *Ratus norvegicus* por ser uno de los animales probados en la reparación experimental del cartílago, dentro de los animales de experimentación es uno de los que tiene una amplia gama de

marcadores comerciales disponibles y tiene un rápido ciclo biológico, que permite con facilidad una rápida evaluación de los resultados *in vivo* en futuros trabajos (Djian *et al.*, 1983; Tholpady *et al.*, 2003; Dausse *et al.*, 2003; Anraku *et al.*, 2008). Pretendemos también, con esta elección, establecer la rata como un modelo celular de CTDTA. Para probar la capacidad regenerativa de las células troncales de humanos, es necesario utilizar un ratón atómico y modelos animales inmunocompetentes. A pesar de que la reparación y regeneración de tejidos con CTDTA humanas deban ser estudiadas en modelos atómicos, para evitar el rechazo, estos modelos tienen limitaciones. Los modelos inmunodeprimidos son propensos a infecciones y enfermedades sistémicas, o presentan dificultades que pueden afectar o retrasar el proceso de regeneración. Además se asume (aunque no está comprobado), que la regeneración tiene lugar de forma similar en ratas atómicas y en animales normales. Los animales inmunocompetentes, no tienen estos problemas y pueden imitar con una mayor similitud, la biología de los humanos, con ventajas significativas (Tholpady *et al.*, 2003).

En cuanto al lugar de recogida de tejido, escogimos la grasa subcutánea abdominal e inguinal, por ser una fuente de fácil acceso y con mínima morbilidad para el animal. Kern *et al.* en 2006, compararon las células troncales del cordón umbilical, tejido adiposo y medula ósea y observaron que el tejido adiposo era el que tenía mayor cantidad de células troncales. Para *Ratus norvegicus* se ha descrito la biopsia de tejido adiposo en la grasa visceral (Tholpady *et al.*, 2003), grasa perirenal (Djian *et al.*, 1983), epididimal (Greenwood y Hirsch, 1974; Bjorntorp *et al.*, 1979; Djian *et al.*, 1983) y subcutánea (Yoshimuri *et al.*, 2006).

Existen en la bibliografía varios métodos para la obtención de tejido adiposo, como son la resección por biopsia (Yoshimura *et al.*, 2007; Mehlhorn *et al.*, 2006), lipoaspiración por ultrasonidos y lipoaspiración tumescente (Erickson *et al.*, 2002; Aust *et al.*, 2004). Nosotros empleamos el método de resección por biopsia, porque

Oedayrajsingh-Varma *et al.* en 2006, demostraron que las células obtenidas por este método tienen una mayor viabilidad, frecuencia y capacidad de replicación.

#### *Método de aislamiento*

Usamos con éxito el método de digestión enzimática descrito por Rodbell en 1964, para la separación por centrifugación diferencial *in vitro* de adipocitos maduros y sus progenitores a partir de grasa epididimaria. El sobrenadante resultante de esta centrifugación diferencial, contenía adipocitos maduros, mientras que el *pellet* celular resultante contenía componentes de un color rojizo, la fracción estromal vascular (FEV).

Observamos que la fracción estromal vascular inicialmente obtenida en cultivo, consiste en una población heterogénea constituida por dos grandes grupos, el de las células no nucleadas y el de células nucleadas, resultados que coinciden con trabajos previos (Van *et al.*, 1976; Zuk *et al.*, 2001). Las células no nucleadas son eritrocitos, de menor tamaño y de aspecto discoidal. Estas células no se pegan a la superficie plástica, de tal manera que con los lavados realizados en los diferentes pases desaparecen. En el microscopio óptico pudimos observar, que en la fracción estromal vascular, la mayoría de las células nucleadas eran de mayor tamaño. Boquest *et al.* 2005, describieron que esta fracción heterogénea está constituida por una población heterogénea que incluye preadipocitos, fibroblastos, células del músculo liso, pericitos, eritrocitos y células endoteliales.

En trabajos realizados recientemente se ha intentado purificar esta fracción estromal vascular, de forma que la contaminación por células indeseadas sea mínima. De esta forma, se han utilizado métodos comparados de aislamiento de las CTDTA. Se han probado métodos enzimáticos, por gradiente de *percoll* y se ha recurrido a camas inmunomagnéticas recubiertas con CD45-CD31- Stro-1+, CD34+31- o CD105 (Boquest *et al.*, 2005; Sengenès *et al.*, 2005; Radá *et al.*, 2007).

Todos los métodos de aislamiento de las células fueron capaces de obtener una diferenciación osteoblástica, siendo la última técnica la que presenta mejores resultados (Radá *et al.*, 2007).

Aunque algunos grupos hayan centrado su atención exclusivamente en el mínimo procesamiento de la fracción estromal-vascular (Festy *et al.*, 2005), otros han trabajado en expandir la subpoblación de células troncales derivadas del tejido adiposo adherente en varios estadios de pases diferentes (Estes *et al.*, 2006b). La primera tiene como ventaja el mínimo procesamiento, y consecuentemente, menores alteraciones celulares en el cultivo, el segundo abordaje tiene como principal ventaja el mayor número de células obtenidas debido a su expansión *in vitro* y una mayor homogeneidad celular.

#### *Cultivo de las células multipotentes sobre superficies plásticas*

Las CTDTA cultivadas sobre superficies plásticas toman una forma fibroblástica característica y constante a lo largo de los pases. Con los pases, las células aumentan de tamaño y presentan mayor número de prolongaciones. Las diferencias de tamaño se cuantifican fácilmente en microscopía electrónica. Es obvio que existe una uniformización celular con los pases.

Conseguimos cultivar durante 6 meses, totalmente indiferenciadas, las CTDTA en un total de 30 pases. Todavía no está claro si las células mantienen propiedades de células troncales después de 25-30 duplicaciones, existiendo pocos estudios de los efectos de los pases sucesivos de CTDTA y sus efectos en las características de multipotencia de esta población celular. Estes *et al.* 2006b, afirmó que las CTDTA mostraron una mayor expresión de genes condrocíticos después de nueve pases comparado con 4 y 0 pases (Estes *et al.*, 2006b). Se recogen datos contradictorios en diversos estudios que examinan los efectos de diversos pases en una población celular similar pero distinta, las CTMO. Diversos grupos demostraron que las CTMO

mantenidas en cultivo durante bastante tiempo y varios pases, experimentaron un decrecimiento en el potencial de diferenciación, tasas proliferativas bajas, acortamiento de los telómeros, pérdida del potencial de diferenciación condrogénico, adipogénico y osteogénico (Bruder *et al.*, 1997; Banfi *et al.*, 2000; Baxter *et al.*, 2004; Parsch *et al.*, 2004; Vacanti *et al.*, 2005).

Las cualidades que hacen estas células tan atractivas para la medicina, especialmente la capacidad para replicar *ad infinitum*, también abren la puerta hacia otros problemas. Existen evidencias que sugieren que pueden ser una fuente de células mutantes que dan origen a tumores (Marx, 2003). Se ha constatado la posibilidad de transformación tumoral de estas células, a lo largo de los pases (Rubio *et al.*, 2005).

Otra evidencia que nos sugiere que distintos cánceres se pueden originar de las células troncales, provienen de estudios de la maquinaria biológica que permite la autorenovación. Células troncales normales y carcinogénicas demostraron similitudes admirables (Marx, 2003). Recientemente, distintos investigadores demostraron que los genes Bmi-1 y Wnt, causan cáncer cuando son mutados, y son también necesarios para la autorenovación en células normales y cancerígenas.

Para intentar maximizar el potencial de las células, evitando los problemas mencionados anteriormente, se han sugerido muchas alternativas, concretamente la utilización de células en los primeros pases (máximo hasta el cuarto pase), hacer la purificación selectiva *in vitro* y sucesiva proliferación y utilizar los protocolos de diferenciación que eviten este tipo de problemas (Heng *et al.*, 2004).

### *Cultivos en agregación*

Se observó que el cultivo en confluencia de CTDTA conducía a una rediferenciación espontánea de las células. De esta forma, intentamos observar lo que pasaría con las células si las cultivásemos sobre agar. Observamos que las CTDTA de P0, cuando se cultivan en

agar forman agregados con una elevada producción de matriz. Estos agregados fueron positivos para el Oil Red O. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que existen preadipocitos presentes en la FEV, que pueden llevar a la diferenciación de las CTDTA adyacentes. Estos agregados son bastante compactos y, debido a su contenido en lípidos flotan. Las células de estos agregados se presentan fenotípicamente redondas, perdiendo la forma fibroblástica que presentaban en los cultivos sobre sustrato plástico.

Esta técnica puede ser innovadora para ser utilizada en aquellos estudios descritos que incluyen la adición de insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina e indometacina como factores de diferenciación condrocítica (Zuk *et al.*, 2001; Aust *et al.*, 2004). Pensamos que sería más sencillo hacer la rediferenciación mediante cultivo en agregación porque implicaría una intervención menor de factores externos a las células, evitando, de esta forma, alteraciones indeseadas. Aunque son necesarios más estudios, como cuantificar el grado de rediferenciación conseguido utilizando cultivo en agregación y compararlo con los referentes al añadir factores de crecimiento.



## **5.2.2.- EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS**

### **5.2.2.1.- Número, proliferación y viabilidad celular**

Con este método y lugar de recogida utilizado conseguimos obtener cantidades bastante aceptables de grasa, cerca de 2,95 +/- 1,7 gramos de grasa, obteniendo de media un total de 300.000 +/- 284.663 células nucleadas por animal. Observamos una correlación lineal entre el peso y la grasa recogida. Existen diversos estudios que intentan averiguar el número de células nucleadas adherentes, y su variación con la alteración de diversos parámetros. El número de células nucleadas primarias en la FEV, es de media de 404.000 células por ml de lipoaspirado, en una población con 44 años de media edad y con la media de índices de masa corporal entre 24-26 (Aust *et al.*, 2004).

Aunque son necesarios estudios más pormenorizados, parecen existir trabajos que encontraron correlaciones negativas entre el IMC (índice de masa corporal) y la cantidad de células obtenidas por ml, en otro estudio se observaron correlaciones negativas entre la edad y el número de células (van Harmelen *et al.*, 2003; Aust *et al.*, 2004). Además existen resultados contradictorios en estos trabajos debido, posiblemente, a la elección de diferentes métodos, lugares de recogida y falta de uniformidad de la muestra, así como muestras poco representativas. Esta última se debe a que las muestras provienen de pacientes de cirugía de lipoaspiración, que son normalmente personas con más de 30 años y del sexo femenino.

La proliferación de estas células, es una de sus características más apreciadas, habiéndose demostrado que su proliferación es superior a las CTMO (Lee *et al.*, 2004b). Las tasas de expansión de cultivos primarios de CTDTA de ratón fueron hasta 5 veces más rápidas en los primeros 5-7 días comparados con CTMO de la misma especie (Cowan *et al.*, 2003). También se ha demostrado que las CTDTA de la grasa subcutánea tienen mayor capacidad proliferativa que la grasa

omental de los mismos pacientes. Todavía no se observaron diferencias significativas en la capacidad de diferenciación entre los dos tipos de grasa (van Harmelen *et al.*, 2004).

Es también importante hacer notar que la variabilidad individual de la cuantificación de estos parámetros, puede llevar a diferentes niveles de beneficios terapéuticos en aplicaciones futuras. El conocimiento de factores demográficos del donante como IMC, edad, sexo, estado de salud, deposición de grasa, pueden ayudar a estimar el potencial de estas células para un determinado paciente (Estes *et al.*, 2006b).

#### **5.2.2.2.- Caracterización de las células a través de marcadores de superficie celular**

Antes de que estas células puedan ser utilizadas rutinariamente como terapia celular, es necesario describir parámetros que definan e identifiquen la población celular (Aust *et al.*, 2004). El fenotipo de las hCTDTA es similar a las observadas en las hCTMO y comparten gran parte de las moléculas y receptores de adhesión (Kuznetsov *et al.*, 1997; Pittinger *et al.*, 1999; Gronthos *et al.*, 2001).

La expresión positiva para los marcadores CD29 y CD73 son coincidentes con los resultados previos, obtenidos en otros estudios con este tipo celular en humanos (Zuk *et al.*, 2002; Dicker *et al.*, 2004). El CD 29, también conocido como la subunidad  $\beta 1$ , se expresa en CTDTA en varios estudios (Gronthos *et al.*, 2001; Erickson *et al.*, 2002; Zuk *et al.*, 2002; De Ugarte *et al.*, 2003; Aust *et al.*, 2004; Dicker *et al.*, 2005; Strem *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2004b, Guilak *et al.*, 2006).

El CD73 es una ecto-5'-nucleotidasa (5'-NT), una proteína de 68 kDa, con actividades enzimáticas. La 5'-NT cataliza la desfosforilación extracelular del nucleósido monofosfato 5', en una forma que pueda entrar en las células. El CD73 puede representar un factor común entre el desarrollo estromal y linfocítico. Es considerado un marcador relevante para identificar células troncales por el Mesenchymal and

Tissue Stem Cell Committee for the International Society for Cellular Therapy (Barry *et al.*, 2001b; Dicker *et al.*, 2005).

### **5.2.2.3.- Citometría de flujo**

#### *A) Tamaño y complejidad*

Los resultados obtenidos en relación con el tamaño, confirmaron lo que observamos en el microscopio de contraste de fases y microscopía electrónica, un ligero aumento de tamaño entre los pases sucesivos. Observamos un aumento muy significativo del tamaño entre la FEV y resto de los pases. Esto se explica fundamentalmente por la presencia de los eritrocitos en la FEV, que por su pequeño tamaño bajan el promedio de tamaño de la FEV.

Observamos también, un aumento muy significativo en la complejidad entre la FEV y el resto de los pases celulares. Esto es debido a la presencia de eritrocitos, que al no tener núcleo bajan el promedio de complejidad. En cuanto a las diferencias de complejidad entre el resto de pases, no existe una tendencia definida, ya que la diferencia entre los distintos pases puede ser debida a la mayor o menor confluencia de las células en el frasco de cultivo, con presencia de más o menos vesículas, vacuolas y metabolismo celular específico.

#### *B) Expresión de los marcadores CD29 y CD73 en los distintos pases*

Constatamos un aumento progresivo de la expresión de CD29 y CD73, a lo largo de los pases. Se observó en trabajos en tejido adiposo humano, que la fracción estromal vascular mostraba bajos niveles de expresión de marcadores estromales (CD29, CD73), mientras que en pases más tardíos se observaba un aumento significativo de estos marcadores (Mitchell *et al.*, 2006; Yoshimura *et al.*, 2006). Estos cambios también se verifican en las células troncales de médula ósea

(Pittinger, 1999). Se nota por tanto, que con los países existe una mayor uniformización de la población celular.

Aunque en general los resultados sean coincidentes con diversos autores, existen algunas diferencias entre los porcentajes, probablemente debido a diferentes métodos de aislamiento celular, el tiempo que las células son cultivadas antes del análisis, el uso de MABs para detectar diferentes epítomos de la misma proteína de superficie, diferencias de sensibilidad entre los métodos de inmunohistoquímica y citometría de flujo. En otros estudios se constató, que la presencia de antibiótico y antimicótico no influenciaba el inmunofenotipo de estas células (Aust *et al.*, 2004).

### **5.2.3.- MULTIPOTENCIA DE LAS CTDTA**

Realizamos experimentos de diferenciación neurogénica, adipogénica y condrogénica con la intención de demostrar la capacidad de multipotencia de estas CTDTA.

#### **5.2.3.1.- Neurogénesis**

Las CTDTA mostraron tener capacidad para cambiar la morfología a través del uso de mercaptoetanol, y aparecieron positivas a la tinción de van Nissl. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos previamente (Safford *et al.*, 2002; Raposio *et al.*, 2006). En cualquier estudio de diferenciación celular multipotente, la integridad de las conclusiones obtenidas está limitada por la especificidad con que definimos diferenciación. Para confirmar la diferenciación neurogénica, tendríamos que buscar marcadores tempranos de diferenciación neurogénica, más específicamente la proteína de neurofilamento, nestina, enolasa específica neuronal (NSE), o la proteína nuclear específica neuronal (neuN).

A lo largo de los últimos años, algunos autores han cuestionado la neurogénesis química obtenida *in vitro*, sugiriendo que no se trata de una verdadera diferenciación, sino que representa una expresión

desordenada de genes con alteraciones morfológicas concurrentes, como una respuesta a un estímulo tóxico (Neuhuber *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004).

Pero varios autores refutaron esta teoría afirmando que las CTDTA tratadas con insulina, indometacina e IBMX expresaban NSE, NeuN, NGFr y demostraron la capacidad de transmisión de estímulos (Zuk *et al.*, 2002; Ashjian *et al.*, 2003; Safford *et al.*, 2002; Safford *et al.*, 2004; Kingham *et al.*, 2007). Ning *et al.*, en 2007, revelaron que el IGF mediaba la diferenciación neurogénica de las CTDTA inducidas por el IBMX.

Para probar el potencial de las CTDTA en la diferenciación de células neuronales, éstas fueron administradas en modelos de infartos isquémicos en pequeños animales, detectándose mejoras de los déficits neurológicos (Kang *et al.*, 2003).

### **5.2.3.2.-Adipogénesis**

Estudios realizados en *Ratus norvegicus* demuestran que las CTDTA tienen un potencial adipogénico superior a células troncales procedentes de otros orígenes (Yoshimura *et al.*, 2007; Sakaguchi *et al.*, 2005). La presencia de preadipocitos en la fracción estromal vascular, constatado por nosotros en la población adherente del FEV, puede ser la razón de tal capacidad.

En este trabajo decidimos realizar el cultivo en agregación de esta población heterogénea, mimetizando el fenómeno de rediferenciación espontánea descrita por muchos autores, cuando se conseguía la confluencia (Van *et al.*, 1976; Zuk *et al.*, 2001).

Dentro de las células obtenidas de la fracción estromal vascular del tejido adiposo, existen preadipocitos, que se diferencian en adipocitos maduros. La diferenciación adipogénica proviene, básicamente, del compromiso de algunos preadipocitos, que en condiciones tridimensionales inducen, probablemente, a las CTDTA a diferenciarse (Dicker *et al.*, 2005). Se sabe que solamente unas pocas

células del FEV son preadipocitos, y nosotros obtuvimos un número de células diferenciadas en adipocitos muy superior.

De esta forma, estudiamos la capacidad de estos agregados diferenciados y positivos al Oil Red de diferenciar monocapas de células troncales indiferenciadas. Observamos que los agregados se adherían rápidamente a la monocapa y las células circundantes empezaron a presentar vacuolas que demostraron ser positivos al Oil Red O. Es difícil saber si las células se diferencian directamente por contacto con el agregado, si provienen del propio agregado o si inducen la diferenciación por factores de crecimiento. Observamos también, por experimentos en los cuales incluimos agregados en agar, que era necesario el contacto directo entre las células y los agregados para que la diferenciación tuviese lugar. Deberían realizarse otros estudios para verificar cómo actúan estos fenómenos de diferenciación, pero constatamos que el número de células positivas al Oil Red O, supera en gran cantidad el número de células presentes en los agregados, lo que nos lleva a pensar que las células se diferencian por el contacto célula a célula.

Concluimos que la presencia de células precursoras de los adipocitos en la FEV, permite obtener con mayor facilidad la diferenciación adipogénica.

### **5.2.3.3.- Condrogénesis**

Se ha demostrado la escasa o nula capacidad del cartilago para la reparación intrínseca después de estar lesionado, esto condujo a los investigadores a desarrollar nuevas modalidades para lograr la regeneración (Erickson *et al.*, 2002).

Observamos que las CTDTA obtenidas de grasa subcutánea abdominal e inguinal son capaces, en cultivo en micromasa y en presencia de mediadores solubles específicos (TGF- $\beta$ 1, Ascorbato, ITS), de expresar proteínas de la matriz cartilaginosa, dando positivo al azul de Alcian. Se obtuvieron la formación de nódulos a partir de los 3 a 4

días en cultivo, alcanzando la producción máxima de matriz a los 14 días. Estos resultados, conjuntamente con estudios previos, sustentan el potencial condrogénico de estas células (Zuk *et al.*, 2001; Tholpady *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 2007).

Nuestros resultados demostraron que la morfología celular redondeada es necesaria para promover el fenotipo condrocítico en CTDTA de rata. Cuando cultivamos las CTDTA con TGF $\beta$ 1, ascorbato, dexametasona, expresan marcadores bioquímicos característicos de condrocitos articulares (Zuk *et al.*, 2001; Awad *et al.*, 2003; Erickson *et al.*, 2002; Wickham *et al.*, 2003). Un requerimiento importante para la diferenciación condrogénica parece ser el mantenimiento de una forma celular redondeada con un sistema de cultivo tridimensional, como por ejemplo, el cultivo en micromasa (Barry *et al.*, 2001a), o como células individuales suspendidas en una matriz de gel como el alginato o agarosa (Awad *et al.*, 2003; Erickson *et al.*, 2002). Cuando se mantienen en cultivos de pellet o encapsuladas en “camas” de alginato (*alginate beads*) y cultivadas con 10 ng/ml de TGF $\beta$ 1, las CTDTA expresan un fenotipo condrocítico y sintetizan colágeno tipo II, agregano, proteína de conexión y condroitín sulfato de forma dependiente del tiempo (Erickson *et al.*, 2002). Cuando los condrocitos se cultivan en suspensión, en presencia de ascorbato, las células forman clusters. Esta agregación es dependiente de la integrina  $\beta$ 1 y del colágeno tipo II (Enomoto *et al.*, 1993).

La capacidad de diferenciación parece estar interconectada con el ambiente del cultivo celular. Los factores utilizados en expansión en monocapa, entre otros factores, parecen tener una influencia significativa en la proliferación y el mantenimiento de la influencia sobre la capacidad para proliferar y la capacidad condrocítica (Estes *et al.*, 2008). Aumentar el número de pases en presencia de EGF, bFGF y TGF $\beta$ 1 tiene un efecto marcado en el potencial de diferenciación condrogénica de las células hADAS (Estes *et al.*, 2006b).

Varios estudios, dirigidos a determinar el potencial condrogénico de las CTMO y CTDTAs, obtuvieron resultados no congruentes entre sí,

algunos recogían el mejor potencial condrogénico de las CTDTAs (Zuk *et al.*, 2002; Erickson *et al.*, 2002; Gimble y Guilak, 2003; Awad *et al.*, 2004; Estes *et al.*, 2006a), con respecto a las CTMO (Zuk *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2005 ), mientras que otros concluyeron que las CTMOs son superiores a las CTDTAs ( Winter *et al.*, 2003; Im *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005; Sakaguchi *et al.*, 2005; Afizah *et al.*, 2007).

Estas diferencias parecen tener su origen en diferentes respuestas a los factores de crecimiento. La diferenciación condrogénica de las CTDTA puede inducirse en cultivos en micromasa solamente con la influencia del TGF $\beta$ 1, mientras que las CTMO requerían de los efectos sinérgicos del TGF $\beta$ 1 y dexametasona para que ésta tuviera lugar (Estes *et al.*, 2006a).Las CTDTA necesitan de protocolos específicos de diferenciación condrogénica para que se pueda sacar el máximo partido de todas sus potencialidades.

#### **5.2.4.- PRESERVACIÓN**

La médula ósea se ha criopreservado con éxito desde 1955 (Barnes y Loutit, 1955; Debelak-Fehir *et al.*, 1975; English *et al.*, 1979; Stiff *et al.*, 1987), y se han utilizado métodos similares, también exitosos para preservar células troncales derivadas de sangre periférica (Jackson *et al.*, 1992; Warkentin *et al.*, 1994).

También fueron criopreservadas células troncales embrionarias incluyendo ratón (Robertson,1987), cerdo (Shim *et al.*, 1997), humanos (Reubinoff *et al.*, 2001) y primates (Fujioka *et al.*, 2004), utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector. En un estudio reciente, se desarrolló un método óptimo de criopreservación de células troncales hematopoyéticas progenitoras; con el fin de eliminar las características tóxicas de elevadas concentraciones de DMSO, consistente en la utilización de bajas concentraciones de trealosa (Buchanan *et al.*, 2004).



#### **5.2.4.1.-Preservación del tejido antes de la disociación**

A nivel práctico la preservación del tejido adiposo, tiene bastante utilidad. La mejoría de las técnicas de preservación, permiten la posibilidad del almacenamiento de tejido adiposo humano, lo cual permite reducir los costes por paciente, la incomodidad y el tiempo asociado a diversos procedimientos de obtención. Atik *et al.* en 2006, demostraron que congelando grasa en nitrógeno líquido a  $-35^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses, permite el mantenimiento del tejido viable. Lidagoster *et al.* en 2000, probaron diversas formas de preservación, incluyendo la refrigeración y la congelación a  $-16^{\circ}\text{C}$ , observaron una disminución del número de células viables obtenidas y señales de inflamación cuando el tejido era reimplantado. Ullmann *et al.*, almacenaron grasa durante 7 meses a  $-18^{\circ}\text{C}$ , siendo los resultados obtenidos en la reimplantación inferiores para la grasa congelada cuando eran comparados con la fresca.

Los resultados de Macrae, en 2004 demostraron que la grasa, cuando se almacenaba a temperaturas bajo cero, mantenían su actividad metabólica mitocondrial en comparación con la grasa almacenada en una incubadora a  $32^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.2.4.2.- De las células**

##### **5.2.4.2.1.- Técnicas de criopreservación después de la amplificación**

No existen muchos estudios sobre criopreservación de CTDTA, y existían en la bibliografía dos métodos distintos de criopreservación distintos, el primero (80% SFB+10% DMEM+10% DMSO)(Goh *et al.*, 2008) y el segundo (80% DMEM+10% DMSO+10% SFB) (Thirumala *et al.*, 2005a y Thirumala *et al.*, 2005b). Observamos que el método que mejores resultados dio para las células troncales de rata fue el primero.

Kim *et al.*, describieron un método para criopreservar células con 90% de SFB y 10% de DMSO, con buenos resultados.

#### **5.2.4.2.2.- Impacto de la criopreservación en los marcadores de superficie de células troncales**

El objetivo fundamental de este punto fue caracterizar el impacto de la criopreservación en la expresión de dos importantes marcadores, CD29 y CD73. Gonda *et al.*, en 2008 observaron que no había alteraciones en los marcadores de la superficie celular después de 6 meses de criopreservación de CTDTA sin pérdida de la capacidad de diferenciación o proliferación. Díaz-Romero *et al.* en 2005, observaron el mismo patrón de expresión en los condrocitos criopreservados y no criopreservados.

Nosotros observamos la misma distribución a lo largo de los pases, en la expresión del CD29 y CD73 en las células congeladas cuando se compararon con células frescas. La diferencia mayor se observó para los dos anticuerpos en la fracción estromal vascular, que parece deberse a la menor resistencia de los eritrocitos al proceso de congelación. En los otros pases, las diferencias son menores y pueden explicarse por la presencia de un mayor número de células muertas en las células congeladas que observamos en el azul de trypan, este hecho fue constatado por Díaz-Romero *et al.* en 2005.

#### **5.2.5.- BIOMATERIALES**

Mucha de la investigación de las células troncales se ha enfocado a controlar la diferenciación usando únicamente factores químicos solubles (como factores de crecimiento) y/o manipulando las señales a las cuales las células están expuestas; se ha dado una menor importancia a las matrices como factor en la regulación de la diferenciación y el crecimiento tisular (Awad *et al.*, 2002; Hunzinker *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que las hCTDTA pueden diferenciarse en un fenotipo condrogénico bajo unas condiciones de cultivo bien definidas (Ericksson *et al.*, 2002; Awad *et al.*, 2003). Awad *et al.* en 2003, demostraron que las propiedades del tejido cartilaginoso varía con las condiciones, tiempo de cultivo y elección del biomaterial.

El biomaterial también tiene influencia en la diferenciación de las CTDTA y las propiedades funcionales de la construcción del tejido, cuando se mantiene en condiciones de cultivo *in vitro* con un medio de diferenciación condrogénico basal consistente en TGF  $\beta$ 1, ascorbato y dexametasona (Awad *et al.*, 2004).

En este trabajo pretendemos ver la posible adhesión y comportamiento de las células troncales del tejido adiposo a distintos biomateriales, que ya demostraron ser viables en ingeniería del tejido cartilaginoso a partir de células cartilaginosas y CTMO, concretamente el ácido poliglicólico, el colágeno tipo I y el agar.

### **Ácido Poliglicólico**

Las células que se adherían mayoritariamente al ácido poliglicólico, presentaron un fenotipo heterogéneo, con una parte significativa de las células con apariencia fibroblástica. Lee *et al.* en 2004a, demostraron que en cultivos sin suero fetal, la adhesión al poliglicólico recubierto de arginina está mediada por la subunidad  $\beta$ 1 y es de extrema importancia en el período inicial de la adhesión celular.

### **Colágeno tipo I**

La utilización de este biomaterial tuvo como base los estudios previos de Schuman *et al.* en 1995, que demostraron que cultivando condrocitos articulares de bovino en distintos geles de colágeno, el de colágeno tipo I de piel de bovino, era lo que tenía una tasa más baja de desdiferenciación (10 a 20%).

En nuestros estudios el colágeno tipo I, demostró ser un buen biomaterial, permitiendo una buena adhesión celular, con una distribución uniforme de las células en el biomaterial, presentando las células una forma redondeada. Se formaron grandes agregados celulares, compactos que pudieron ser observados macroscópicamente.

Con este estudio podemos concluir que el colágeno tipo I de bovino diluido en ácido acético 0,01 M, permite la adhesión de células troncales del tejido adiposo, siendo, por tanto, un buen candidato para intentar realizar la diferenciación condrocítica.

### **Agarosa**

La inclusión de las células en gel de agar, llevó a que las células presentasen una morfología celular esférica, con buena distribución en el biomaterial. La agarosa mantiene durante los 28 días cultivados la misma dimensión sin contracciones, ni cambios en la textura y densidad.

La capacidad de algunas matrices de interactuar con las células, pueden explicar algunas de las diferencias en el comportamiento de éstas dependiendo del biomaterial. Este trabajo permitió hacer una selección de los posibles biomateriales en que los tipos celulares tenían adhesión. En trabajos futuros, se realizarán en nuestro laboratorio estudios, concretamente con colágeno y ácido poliglicólico añadiendo medios condrogénicos.

En conclusión, podemos afirmar que existen diferencias significativas en el comportamiento celular relacionadas con el tipo de biomaterial usado.

### **5.2.6.- PERSPECTIVAS DE ESTA TECNOLOGÍA**

El tejido adiposo es abundante y fácilmente accesible comparado con la mayor parte de tejido viable, presentándose como una fuente

potencial de células troncales para aplicaciones en medicina regenerativa (Guilak *et al.*, 2004; Strem y Hedrick, 2005).

Existen un conjunto de dificultades básicas y aplicadas que hacen que esta tecnología no tenga una mayor aplicación, concretamente la funcionalidad, su seguridad y el coste efectivo de las células.

Con el fin de intentar obviar las alteraciones normales que tienen lugar durante el cultivo de las células, éstas pueden utilizarse en ensayos clínicos sin ser necesaria su expansión *in vitro*, debido a la gran cantidad de células obtenidas en el lipoaspirado. Normalmente, la utilización de células con la menor manipulación posible puede llevar a procedimientos más seguros y eficaces. Pero para poder usar la implantación de estas células a la propia fracción estromal vascular hay que estudiarla con más detalle.

En estudios *in vivo* realizados por Cowan *et al.* en 2004, se utilizaron estas células para tratar defectos de grandes dimensiones en ratón. El transplante de las CTDTA en el ratón mdx, un modelo animal de la distrofia muscular de Duchenne, da lugar a una substancial expresión de la distrofina (Rodríguez *et al.*, 2005b). Datos preclínicos, obtenidos en modelos animales pequeños y grandes demostraron mejorar la función cardíaca después de sufrir un infarto de miocardio (Strem y Hedrick, 2005). La inyección intraventricular de CTDTA transfectadas con un retrovirus que sobreexpresa el gen de la telomerasa humana, demostró aumentar la recuperación funcional en estos animales (Jun *et al.*, 2004).

Esta tecnología está ya siendo comercializada en E.E.U.A. para caballo por la empresa Vet Stem Cell. Para ello se está recogiendo grasa del inicio de la cola, con el objetivo de utilizar estas células en terapia regenerativa de tendones, ligamentos y articulaciones. En este caso no existe expansión celular, apenas se obtiene el aislamiento de la FEV, se inyecta directamente en la zona de la lesión, para aplicar el tratamiento. La misma empresa está implementando este servicio para el tratamiento en perros de las patologías articulares.

La aplicación de las células troncales adultas en la ingeniería de tejidos ha demostrado ser un campo realmente prometedor en el futuro (Rodríguez *et al.*, 2005a). A pesar de los muchos avances y de los éxitos recientes, existen pocas aplicaciones clínicas utilizando como base las células troncales. Los trabajos iniciales se han enfocado en métodos de ensayo-error, y existe la necesidad de equilibrar estas técnicas con una ingeniería más conservadora para el diseño y producción del producto. Además, otras tecnologías emergentes, especialmente biomateriales, química y diseño de biorreactores, pueden tener un impacto significativo en tecnologías de células troncales.

### **5.3.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE CÉLULAS TRONCALES DE TEJIDO ADIPOSO (GRASA INFRAPATELAR) DE CABALLO**

Se realizaron estudios iniciales generales en el campo de la regeneración de cartilago, utilizando modelos animales de pequeño tamaño. Sin embargo, es necesario desarrollar modelos animales de mayor tamaño como perros, cabras y caballos, ya que éstos reproducen mejor las condiciones de los pacientes humanos (Reinholz *et al.*, 2004). Por otra parte la importancia clínica y económica que representa en Veterinaria el mundo del caballo hace imprescindible el desarrollo de estos modelos aplicables en animales de gran tamaño. Antes de ejecutarse ensayos clínicos en humanos, las terapias basadas en células troncales para enfermedades que no sean mortales, deben ser evaluados tanto en seguridad como en eficacia, utilizando modelos animales con enfermedades espontáneas y no solamente en modelos de animales de laboratorio con lesiones inducidas (Koch y Betts, 2007).

El caballo es el candidato ideal para aplicaciones clínicas de problemas articulares, por ser un animal de competición con enfermedades articulares asociadas a esta actividad (Boyde y Firth, 2004; Doube *et al.*, 2007) y tener una gran relevancia económica. Se ha utilizado el caballo como modelo para ensayos clínicos de tratamiento de problemas articulares (Barnewitz *et al.*, 2006; Litzke *et al.*, 2004). Sin embargo, los estudios que utilizan los equinos como modelos de enfermedad experimental son muy caros, en comparación con aquellos que emplean pequeños animales. Por ello, la industria equina y la comunidad veterinaria debería implicarse en el proceso de investigación, disminuyendo los costes de investigación (Koch y Betts, 2007).

Un elevado número de caballos de carreras deben ser retirados debido a problemas articulares y la industria ha puesto en marcha diversos programas de donación y reubicación, con el fin de reducir el

número de caballos de carreras eutanasiados después de abandonar la pista. Estos caballos podrían ser una excelente fuente de material de investigación para problemas articulares (Koch y Betts, 2007).

Planteamos este estudio con el objetivo de determinar la capacidad de diferenciación condrogénica de las células de grasa infrapatelar de caballo, e intentar desarrollar un modelo capaz de reproducir la hipertrofia de los condrocitos.

### **5.3.1.- OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MULTIPOTENTES**

La morfología celular de las células de la FEV en cultivos primarios es diversa, debido a su naturaleza heterogénea, con una distribución uniforme por todo el frasco, sin formar colonias. La morfología dominante es la fibroblástica, aunque una pequeña parte de las células presentaba una morfología distinta. Con los pases la población se volvió morfológicamente más uniforme, estos datos son coincidentes con los presentados por Vidal *et al.*, 2007.

### **5.3.2.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA DE CTDTA DE CABALLO**

El cartílago articular demostró tener un escaso o ningún potencial para la reparación intrínseca de la lesión, llevando a los investigadores a buscar nuevas estrategias para potenciar la regeneración de los tejidos.

Este proceso parece estar influenciado por un determinado número de factores, incluyendo la presencia de factores de crecimiento apropiados y condiciones atmosféricas adecuadas (Grimshaw y Mason, 2000).

#### *Efectos de los factores de crecimiento*

Los factores de crecimiento son citocinas, con funciones reguladoras en el tratamiento del sistema musculoesquelético. Varios



estudios describen que los efectos combinados de distintos factores de crecimiento tienen efectos significativos en la inducción condrogénica de las células troncales y en el tratamiento de lesiones articulares (Martinek *et al.*, 2003).

Se realizaron varios trabajos, relacionados con la obtención y diferenciación condrogénica de células troncales de médula ósea y de cordón umbilical equino (Fortier *et al.*, 1998; Hoynowski, 2007; Wilke *et al.*, 2007). Vidal *et al.* en 2007, demostró la capacidad osteogénica y adipogénica de las CTDTA, pero no su potencial condrogénico. Hasta el momento no se ha descrito en la bibliografía la diferenciación condrogénica de CTDTA de caballo.

Nuestros resultados demuestran que la diferenciación condrogénica de las CTDTA de caballo tiene lugar en presencia de medio condrogénico, implicando una rápida biosíntesis de glucosaminoglicanos y colágeno, acompañándose la deposición de la matriz extracelular, por una clara alteración en la morfología celular. En los cultivos a los que no se les adicionó factor de crecimiento, los pellets obtenidos eran de pequeño tamaño, con poca evidencia de acumulación de matriz. Observamos que el cultivo en medio control, a partir de los 28 días conduce al sufrimiento celular.

La inducción de la condrogénesis en CTDTA cultivadas *in vitro* requiere la suplementación con mediadores específicos solubles. Las 3 isoformas de TGF $\beta$  tienen la capacidad de inducir esta respuesta, y bajo determinadas condiciones de cultivo se hace evidente la producción de componentes de la matriz extracelular de cartílago en 24 horas (Barry *et al.*, 2001a). En las CTMO se demostró que el TGF $\beta$ 2 y 3 son más efectivos en inducir la condrogénesis, provocando un aumento de hasta dos veces en la producción de glicosaminoglicanos y una deposición de colágeno tipo II precoz y más amplia (Barry *et al.*, 2001a). En las CTDTA, el TGF $\beta$ 1 parece tener igual o mayor potencial de inducción que sus isoformas (Estes *et al.*, 2006a).

El factor de crecimiento TGF $\beta$ 1 es un factor clave en la regulación de la proliferación celular y puede llevar a la diferenciación

cartilaginosa (Izumi *et al.*, 1992). Nuestros resultados demostraron que el TGF $\beta$ 1 en combinación con otras sustancias de suplementación, llevan a las CTDTA de equino a producir marcadores cartilagosos, similares a los encontrados en células mesenquimales derivadas de la médula ósea en las mismas condiciones (Johnston *et al.*, 1998).

Otros factores de crecimiento parecen desempeñar un papel importante en la inducción de la condrogénesis de las CTDTA, concretamente el BMP-6 e IGF-1. En contraste con los efectos osteogénicos de la BMP-6, en diversos tipos celulares, los efectos de la BMP-6 en CTDTA en cultivos tridimensionales son bastante condrogénicos, siendo uno de los más potentes reguladores de la condrogénesis (Estes *et al.*, 2006a). El IGF-1 no parece tener un fuerte efecto en promover el sinergismo con TGF  $\beta$ 3 y BMP-6; de hecho, la adición de IGF-1 y TGF  $\beta$ 3 al BMP-6 provoca la inhibición parcial de la respuesta condrogénica de las células al BMP-6. Estos resultados sugieren que la respuesta de las CTDTA difiere considerablemente de la respuesta de otras células progenitoras derivadas del mesénquima (Estes *et al.*, 2006a).

Constatamos que con el tiempo, las tasas de biosíntesis de proteoglicanos y colágeno en condiciones condrogénicas disminuyen. Estudios previos demostraron que las moléculas propias de la matriz extracelular son potentes modificadores del metabolismo celular. Por ejemplo, un aumento en las concentraciones extracelulares de proteoglicanos causan una reducción de la tasa de síntesis por los condrocitos, debido a un mecanismo de feedback negativo en el cual está implicado el CD44 (Aguiar *et al.*, 1999).

Estas observaciones demuestran el potencial relevante de los factores de crecimiento en el futuro de la ingeniería de tejidos de equinos y terapias médicas regenerativas.

*Influencia de las distintas condiciones controladas*

Las variaciones de las condiciones atmosféricas del cultivo desempeñan un papel importante en la regulación del equilibrio entre el crecimiento celular y la actividad biosintética. El uso potencial de la tensión de oxígeno como un interruptor metabólico tiene implicaciones significativas tanto *in vivo* como *in vitro*, en el contexto de la ingeniería de tejidos con respecto a la condrogénesis y otras líneas de diferenciación (Strehl *et al.*, 2002).

La reducida tensión de oxígeno lleva al aumento de la producción de ácido láctico por las CTDTA humanas, en cultivos control y condrogénicos. Este aumento sugiere un aumento de la glicólisis anaerobia, que no requiere oxígeno (Shapiro *et al.*, 1991). Este mecanismo de producción de ATP existe también en los condrocitos articulares, siendo el producto final el ácido láctico (Spencer *et al.*, 1990; Otte, 1991). Es interesante destacar que la adición de ácido láctico exógeno, puede favorecer la diferenciación condrogénica de fibroblastos dérmicos, sugiriendo que los metabolitos celulares relacionados con la glicólisis anaerobia puede tener un efecto autocrino o paracrino en la diferenciación celular (Shapiro *et al.*, 1991; Nicoll *et al.*, 2001). La glucosa es el sustrato para que la glicólisis ocurra y la concentración de glucosa en el medio puede afectar el desarrollo de células mesenquimales precartilaginosas (Leonard *et al.*, 1989). En muchos tipos celulares, el ATP es generado vía fosforilación oxidativa dependiente de oxígeno, que es un mecanismo de producción de ATP más eficiente. Si la tensión de oxígeno sólo se reduce al 5%, es probable que la producción de ATP ocurra a través de la fosforilación oxidativa. Por esta razón, utilizamos medios con elevadas concentraciones de glucosa, aunque también probamos la diferenciación con medios con baja glucosa y la diferenciación fue bastante más complicada.

Observamos que los pellets, cuando se cultivaban en condiciones de hipoxia, en general eran más pequeños, pero como no hicimos

amplificación *in vitro*, en condiciones de hipoxia no podemos sacar conclusiones objetivas sobre la proliferación celular en diferentes condiciones atmosféricas.

Nuestros resultados están parcialmente de acuerdo con otros estudios, concretamente con los trabajos de Rempel y Abrahamsson, que en 2001 observaron que una reducida tensión de oxígeno inhibía la proliferación celular de los explantes sinoviales de conejo, Nevo *et al.*, 1988 demostraron que tensiones de oxígeno más bajas favorecen la proliferación de CTDTA humanas, condrocitos embrionarios de pollo, fibroblastos humanos (Taylor *et al.*, 1974), células progenitoras humanas (Bradley *et al.*, 1978; Maeda *et al.*, 1986; Koller *et al.*, 1992) y células troncales de la médula ósea (Lennon *et al.*, 2001).

Además existen estudios de células del ligamento cruzado anterior (ACL) derivado de fibroblastos. Mostraron el máximo grado de proliferación al 10 % de oxígeno, teniendo tasas moderadas de proliferación al 21% de oxígeno, y tasas mucho más bajas al 0% de oxígeno (Fermor *et al.*, 1998). Este último estudio sugiere que el grado de reducción de la tensión de oxígeno desde niveles atmosféricos, puede también determinar si la célula prolifera o produce proteínas de la matriz extracelular. Esas diferencias en los efectos de la tensión de oxígeno en la proliferación celular puede estar potencialmente influenciada por diferencias en el tipo celular, la madurez, así como las condiciones de cultivo.

Nuestros resultados apuntan a que la hipoxia tiene un efecto condrogénico muy potente a corto plazo, con una expresión mucho más elevada del colágeno y proteoglicano en el día 14 que en condiciones de normoxia. En tiempos más prolongados se observa que los pellets en normoxia producen más proteoglicanos e igual cantidad de colágeno. Estos datos indican que la baja tensión de oxígeno (5%) y las condiciones condrogénicas pueden aumentar significativamente la síntesis del colágeno total y glicosaminoglicanos sulfatados de las CTDTA a corto plazo. La hipoxia parece desempeñar un papel más marcado en la biosíntesis del colágeno que en los proteoglicanos.

Wang *et al.* en 2005, sugieren que la reducción en la tensión atmosférica puede alterar significativamente el metabolismo celular *in vitro*. En estudios anteriores, una baja tensión de oxígeno demostró restaurar el fenotipo condrogénico en condrocitos articulares de bovino cuando eran cultivados en monocapa (Murphy y Sambanis, 2001). Comparando una tensión de oxígeno del 20 % O<sub>2</sub>, con una baja tensión (5%), se observa que aumenta significativamente la expresión de colágeno tipo II y proteína de agregano, moléculas típicamente expresadas por los condrocitos, pero no tienen ningún efecto en la expresión de colágeno tipo I, que está generalmente asociado con la desdiferenciación condrocítica en un fenotipo fibroblástico (Murphy y Sambanis, 2001).

La hipoxia parece tener un efecto muy relevante en la expresión de colágeno tipo II e importante, aunque en menor medida, en el agregano en condrocitos articulares humanos. Después de la exposición de los condrocitos a la hipoxia durante 7 días, se produce un aumento en la expresión de Sox-9. Estos datos en conjunto muestran que la hipoxia actúa como regulador del fenotipo condrocítico (Lafont *et al.*, 2007).

Antes que el oxígeno pueda ser utilizado como una potente herramienta en la condrogénesis, es necesario desarrollar más trabajos para entender cómo las diferentes tensiones de oxígeno pueden afectar a la condrogénesis. Alteraciones en las tensiones de oxígeno pueden promover la diferenciación y la actividad biosintética. Wang *et al.* en 2005, sugieren que la manipulación del ambiente de cultivo mediante la alteración de las condiciones físico-químicas, como la tensión de oxígeno, puede proporcionar medios adicionales de crecimiento controlado y metabolismo de células indiferenciadas.

### 5.3.3.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA HIPERTRÓFICA DE CTDTA DE CABALLO

La identificación de las señales externas, que son críticas para el mantenimiento y control de la diferenciación de una línea de precursores multipotentes, constituye un gran desafío en la biología de células troncales. A pesar de que se han hecho muchos progresos en los últimos años en el desarrollo del cartílago y su reparación, la contribución relativa de cada uno de los factores en la diferenciación cartilaginosa está aún por descubrir (Zou *et al.*, 1997; Enomoto-Iwamoto *et al.*, 1998; de Crombrughe *et al.*, 2001).

La influencia de varios factores de crecimiento y mediadores de condrogénesis de las CTDTA pueden ser aditivos o sinérgicos, dependiendo de la concentración y tiempo de exposición. Por ejemplo, la combinación de un sustituto del suero, el ITS (insulina, transferrina y selenio) con TGF  $\beta$ 1 pueden aumentar la proliferación de las CTDTA de una forma aditiva en “camas de alginato” (*alginate beads*) en relación con los cultivos control. De forma similar, las tasas de síntesis proteica se ven aumentadas por la combinación TGF $\beta$ 1 y dexametasona en la presencia de ITS o SFB. El TGF $\beta$ 1 aumenta significativamente la síntesis de proteoglicanos, sin embargo, este efecto es suprimido por la dexametasona (Awad *et al.*, 2003). El BMP-6, parece inhibir la expresión de colágeno tipo X, y consecuentemente el fenotipo condrocítico hipertrófico en cultivo (Estes *et al.*, 2006b).

El proceso de diferenciación hipertrófica del cartílago está regulado por multitud de vías de señalización, incluyendo la proteína relacionada con la hormona paratiroides (PTHrP), Indian Hedgehog (Ihh) y las proteínas morfogenéticas óseas (Vortkamp *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1998). Semevolos en 2006, reveló que la expresión de las moléculas reguladoras parecen estar más afectadas en las transiciones prenatal a posnatal y prepuberal a puberal.

En este trabajo estudiamos el potencial de inducción hipertrófica por parte de la dexametasona.

*Influencia de las condiciones de cultivo*

En este estudio probamos dos condiciones de cultivo para inducir la diferenciación condrocítica, concretamente cultivos en dos y tres dimensiones, con medio combinando TGF $\beta$ 1 con dexametasona.

Un hecho interesante que observamos *in vitro*, es que células estromales derivadas del tejido adiposo sembradas en monocapa y mantenidas en presencia de medio condrogénico formaron esférulas después de 7 días de cultivo.

Este fenómeno se observó previamente en otras células en cultivo con medio conteniendo TGF $\beta$ 1 y el fenotipo de las esférulas era similar al del cartilago (Delise *et al.*, 2000). Este proceso es necesario para que las células produzcan colágeno tipo II. Estos resultados combinados proporcionan evidencias de que la bioquímica y biofísica de las condiciones de cultivo desempeñan un papel crucial en el fomento del fenotipo condrocítico.

Se han descrito resultados contradictorios sobre la posibilidad de diferenciación condrogénica en cultivos en dos dimensiones, ya que algunos autores, al contrario de los resultados obtenidos por nosotros, afirman que no existe diferenciación en dos dimensiones (Solursh, 1991). Un trabajo demostró que las CTMO no eran capaces de diferenciarse en condrocitos si eran cultivados en monocapa (Yoo *et al.*, 1998) apoyando el papel relevante de la forma celular y un medio tridimensional en el favorecimiento del fenotipo condrocítico.

En cultivos en dos dimensiones conseguimos obtener diferenciación condrocítica en condiciones de normoxia y de hipoxia. Se observó una gran producción de matriz, pero no conseguimos observar células hipertróficas. Estos resultados nos hacen pensar que son necesarios cultivos tridimensionales para lograr alcanzar *in vitro* la diferenciación terminal, con la consecuente hipertrofia.

En los cultivos tridimensionales conseguimos obtener condrocitos hipertróficos, con vacuolas de gran dimensión. En un sistema

condrogénico de pellet de CTMO, la proliferación celular ocurre entre el día 0 y 7 únicamente, mientras que la apoptosis tiene lugar continuamente. La ausencia de proliferación celular coincide con la aparición de marcadores de diferenciación condrogénica (Sekiya *et al.*, 2001).

#### *Inducción de la hipertrofia en medio con dexametasona*

Varios estudios *in vitro* demostraron que la dexametasona tiene el potencial para inducir múltiples fenotipos (Grigoriadis *et al.*, 1990; Shalhoub *et al.*, 1992). La dexametasona no es un diferenciador específico condrogénico, aunque varias publicaciones demostraron que la dexametasona facilita la diferenciación condrogénica de células mesenquimales. La dexametasona indujo la condrogénesis en cultivos de células embrionarias de ratón (Zimmermann y Cristea, 1993) y en células progenitoras del mesodermo (Poliard *et al.*, 1995). Tanaka *et al.* observaron que la dexametasona estimulaba la expresión de mRNA del colágeno tipo IIA pero no el tipo IIB. Por otro lado, Locker *et al.* en 2004, demostraron que la adición de la dexametasona, lleva a un aumento de la expresión de Sox9.

La afirmación de que la dexametasona puede inducir la diferenciación no sólo de células del cráneo fetal (Grigoriadis *et al.*, 1998), sino también de cultivos en micromasa de células troncales de la médula ósea, sustentan la hipótesis de que algunas células progenitoras son objetivos diana de la acción de la dexametasona. James *et al.* en 2007, observaron que el receptor de los glucocorticoides es un potencial regulador de la hipertrofia condrocítica.

Las células se cultivaron en nódulos tridimensionales, intentando imitar las condensaciones precondrogénicas *in vivo*. La exposición continua a dexametasona, conduce a las células multipotentes a la diferenciación condrogénica, y posteriormente las convierten en condrocitos maduros. Pero los estudios de Oshina *et al.* en 2007, revelan que la dexametasona además de inducir la diferenciación,



también induce la apoptosis de las CTMO. Pusimos de manifiesto que las células a las cuales añadimos dexametasona, presentan un mayor tamaño y vesículas de gran tamaño, coincidentes con condrocitos maduros, que producen colágeno y proteoglicanos. La diferenciación hipertrófica es visible en algunas células en el día 14, pero es más acentuada a partir del día 30 y 40. No parece haber grandes diferencias entre la hipoxia y normoxia, pero para tener una información más certera se debería realizar RT-PCR.

Grigoriadis *et al.* en 1998, observaron que el tratamiento con dexametasona, potenciaba la diferenciación condrogénica y que concentraciones elevadas de dexametasona pueden también estimular la proliferación de precursores condrocíticos. Los efectos de los glucocorticoides en la proliferación condrocítica varían dependiendo del sistema de cultivo y las especies utilizadas.

## **6.- CONCLUSIONES**



- 1.** El cartilago auricular de conejo presenta una colocalización entre las proteínas de la matriz y las integrinas  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\beta 3$ .
- 2.** Los condrocitos auriculares de conejo se desdiferencian en cultivo en superficies plásticas.
- 3.** Los cultivos en agregación indujeron la rediferenciación de los condrocitos auriculares de conejo *in vitro*, con expresión de marcadores de diferenciación como el colágeno tipo II y el agregano.
- 4.** El grado de rediferenciación es mayor en el centro del agregado que en la periferia, probablemente debido a la influencia de la hipoxia.
- 5.** Las células en cultivo expresan las integrinas  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\beta 3$ , pero en menor grado que las células adultas pudiendo desempeñar un papel en la desdiferenciación que tiene lugar en las superficies plásticas.
- 6.** Las CTDTA abdominal e inguinal de rata tienen la capacidad de diferenciación en adipocitos, condrocitos y neuronas. Estas células mostraron expresión de marcadores de células troncales, concretamente CD29 y CD73.
- 7.** El tamaño de las CTDTA aumentaba a lo largo de los pases, sin embargo su complejidad no mostró un patrón definido.

- 8.** La expresión de los marcadores CD29 y CD73 aumentaba a lo largo de los pases, siendo más del 98% en el último pase analizado.
- 9.** El medio de criopreservación constituido por 80% de suero fetal bovino +10% de Dimetilsulfóxido +10% de DMEM demostró ser el más eficaz en la criopreservación de las células.
- 10.** La criopreservación de las células parece no influenciar significativamente la tendencia de expresión de los marcadores CD29 y CD73, influenciando sin embargo su grado de expresión, siendo siempre más elevada en las congeladas.
- 11.** Las CTDTA tienen una buena adherencia al agar, colágeno tipo I y ácido poliglicólico, pudiendo ser utilizados en un futuro en ingeniería de tejidos. De todos ellos el que demostró tener mejores resultados fue el ácido poliglicólico.
- 12.** Las CTDTA de caballo tienen potencial para diferenciarse en condrocitos, produciendo componentes propios de la matriz extracelular adulta, concretamente el colágeno y proteoglicanos.
- 13.** Las condiciones de hipoxia favorecen la expresión precoz de colágeno y proteoglicanos, desempeñando un papel más relevante en el colágeno.
- 14.** La adición de dexametasona, conjuntamente con el TGF- $\beta$ 1, ITS y ascorbato puede llevar a la creación *in vitro*, de un modelo de condrocitos hipertróficos.

- 1.** The rabbit auricular cartilage presents a colocalization between the protein matrix and the integrins  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha \nu \beta 3$ ,  $\beta 3$ .
- 2.** Rabbit auricular chondrocytes dedifferentiate in culture on plastic surfaces.
- 3.** The rabbit dedifferentiated chondrocytes culture in aggregation promotes the redifferentiation of auricular chondrocytes *in vitro*, with the expression of differentiation markers like collagen type II and aggrecan.
- 4.** The redifferentiation degree is bigger in the pellet center than in the surroundings, probably because of the hypoxia influence.
- 5.** The cells in culture expressed the integrins  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha \nu \beta 3$ ,  $\beta 3$ , but in a lower degree than the adult cells, so they can play a role in the dedifferentiation on plastic surfaces.
- 6.** The ADSC obtained from rat abdominal and inguinal fat, have the capacity to differentiate in adipocytes, chondrocytes and neurons. These cells have expressed stem cell markers, namely CD29 and CD73.
- 7.** The size of adipose derived stem cells has increased between the passages, but the complexity did not demonstrate a defined pattern.
- 8.** The expression of the markers CD29 and CD73 has increased along the passages, being higher than 98% in the last passage analyzed.

**9.** The cryopreservation medium composed by 80% calf serum + 10% Dimethyl sulfoxide + 10% of medium demonstrated to be the most effective in cell cryopreservation.

**10.** The cell cryopreservation does not seem to have significant influence on the tendency to markers CD29 and CD73 expression, but influences the markers expression percentage, being always higher in the frozen ones.

**11.** The ADSC adhered well to agar, to collagen type I and poliglycolic acid, allowing its future use in tissue engineering. The best results seem those obtained with polyglycolic acid.

**12.** The horse ADSC have the potential to differentiate in chondrocytes producing extracellular matrix components namely collagen and proteoglycans.

**13.** The hypoxic conditions favored the early expression of collagen and proteoglycans, playing a more important role in the collagen synthesis.

**14.** The addition of dexamethasone with TGF- $\beta$ 1, ITS and ascorbic acid permits *in vitro*, the creation of a hypertrophic chondrocytes useful model.

## **7.-BIBLIOGRAFIA**





- Abraham, E.J.; Leech, C.A.; Lin, J.C.; Zulewski, H.; Habener, J.F.** (2002) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology*. 143(8):3152-61
- Adams, J.C. y Watt, F.M.** (1990) Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes  $\alpha 5\beta 1$  integrin loss from the cell surface. *Cell*. 63:425-35
- Afizah, H.; Yang, Z.; Hui, J.; Ouyang, H-W; Lee, E-H** (2007) A Comparison Between the Chondrogenic Potential of Human Bone Marrow Stem Cells (BMSCs) and Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Taken from the Same Donors. *Tissue Engineering*. 13(4): 659-666
- Agrawal, C.M. y Ray, R.B.** (2001) Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 55(2):141-50
- Aguiar, D.J.; Knudson, W.; Knudson, C.B.** (1999) Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Exp Cell Res.* 252(2):292-302
- Aigner, T.; Bertling, W.; Stöss, H.; Weseloh, G.; von der Mark, K.** (1993) Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 91:829-837
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.** (1989) Cell Adesion, Cell Junctions and Extracellular Matrix. In: *The molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc New York & London. 802-836
- Alhadlaq, A. y Mao, J.J.** (2004) Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics. *Stem Cells And Development*. 13:436-448
- Altaf, F.M.; Hering, T.M.; Kazmi, N.H.; Yoo, J.U.; Johnstone, B.**(2006) Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater.*12:64-70
- Almqvist, K.F.; Wang, L.; Wang, J; Baeten, D.; Cornelissen, M.; Verdonk, R.; Veys, E.M.; Verbruggen, G.**(2001) Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks. *Ann Rheum Dis.* 60(8):781-90
- Anderson, D.R.** (1964) The ultrastructure of elastic and hialine cartilage of the rat. *Amer. J. Anat.* 114:403-433
- Anderson, H.C. y Sajdera, S.W.** (1971) The fine structure of bovine nasal cartilage. *J.Cell Biol.* 49:650-663
- Andersson, H. y van den Berg** (2004) Microfabrication and microfluidics for tissue engineering: state of the art and future opportunities. *Lab Chip*. 4:98-103
- Andrews, G.P.; Gorman, S.P.; Jones, D.S.** (2005) Rheological characterisation of primary and binary interactive bioadhesive gels composed of cellulose derivatives designed as ophthalmic viscosurgical devices. *Biomaterials*. 26(5):571-80
- Anraku, Y.; Mizuta, H.; Sei, A.; Kudo, S.; Nakamura, E.; K. Senba; Takagi, K.; Hiraki, Y.**(2008) The chondrogenic repair response of undifferentiated mesenchymal cells in rat full-thickness articular cartilage defects. *Osteoarthritis and Cartilage*. En prensa

- Aota, Y.; An, H.S.; Imai, Y.; Thonar, E.J.; Muehleman, C.; Masuda, K.** (2006) Comparison of cellular response in bovine intervertebral disc cells and articular chondrocytes: effects of lipopolysaccharide on proteoglycan metabolism. *Cell Tissue Res.* 326(3):787-93
- Arai, F.; Ohneda, O.; Miyamoto, T.; Zhang, X. Q.; Suda, T.** (2002) Mesenchymal Stem Cells in Perichondrium Express Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule and Participate in Bone Marrow Formation. *J. Exp. Med.* 195(12):1549-1563
- Archer, C.W. y Francis-West, P.** (2003) The chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 35(4):401-4
- Arévalo-Silva, C.A.; Eavey, R.D.; Cao, Y.; Vacanti, M.; Weng, Y.; Vacanti, C.A.** (2000) Internal support of tissue-engineered cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 126(12):1448-52
- Arévalo-Silva, C.A.; Cao, Y.; Weng, Y.; Vacanti, M.; Rodríguez, A.; Vacanti, C.A.; Eavey, R.D.** (2001) The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on porcine chondrocytes and tissue-engineered autologous elastic cartilage. *Tissue Engineering.* 7: 81-8
- Ashjian, P.H.; Elbarbary, A.S.; Edmonds, B.; DeUgarte, D.; Zhu, M.; Zuk, P.A.; Lorenz, H.P.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H.** (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast. Reconstr. Surg.* 111: 1922- 1931
- Aszodi, A.; Hunziker, E.B.; Brakebusch, C.; Fässler, R.** (2003)  $\beta$ 1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes & Development.* 24:65-2479
- Atik, O.S.; Uslu, M.M.; Eksioğlu, F.** (2005) Osteochondral multiple autograft transfer (OMAT) for the treatment of cartilage defects in the knee joint. *Bull Hosp Jt Dis.* 63(1-2):37-40
- Atik, B.; Oztürk, G.; Erdoğan, E.; Tan, O.** (2006) Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 118(7):1533-7
- Atsumi, T.; Miwa, Y.; Kimata, K.; Ikawa, Y.** (1990) Chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev.* 30(2):109-16
- Aust, L.; Devlin, B.; Foster, S.J.; Halvorsen, Y.D.C.; Hickok, K.; Laney, T.; Sen, A.; Willingmyre; Gimble, J.M.** (2004) Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy.* 6 (1): 7-14
- Awad, H.; Erickson, G.; Guilak, F.** (2002) Biomaterials for cartilage tissue engineering. In: K.-U. Lewandrowski, D. Wise, D. Trantolo, J. Gresser, M. Yaszemski and D. Altobelli, Editors, *Tissue engineering and biodegradable equivalents: Scientific and clinical applications*, Marcel Dekker Inc, New York. 267-299
- Awad, H.A.; Halvorsen, Y.D.; Gimble, J.M.; Guilak, F.** (2003) Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 9(6):1301-12
- Awad, H.A.; Wickam, M.Q.; Leddy, H.A.; Gimble, J.M.; Guilak, F.** (2004) Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate and gelatin scaffolds. *Biomaterials.* 25:3211-3222

**Bacou, F.; el Andaloussi, R.B.; Daussin, P.A.; Micallef, J.P.; Levin, J.M.; Chammas, M.; Casteilla, L.; Reyne, Y.; Nougues, J.** (2004) Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant.* 13 : 103-111

**Baecker, R.**(1928) Zur Histologie des Ohrknorpels der Sauger. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 15:274-367

**Bai, X.; Xiao, Z.; Pan, Y.; Hu, J.; Pohl, J.; Wen, J.; Li, L.** (2004) Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 325:453-460

**Baksh, D.; Song, L.; Tuan, R. S.** (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 8(3), 301-316

**Banfi, A.; Muraglia, A.; Dozin, B.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Quarto, R.,** (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* 28: 707-715

**Banks, W. J.** (1992) Tecido de sustentação-Cartilagem / Tecido de sustentação-osso. In: *Histologia Veterinária Aplicada.* 1ª Edição brasileira. Editora Manole Ltda. 124-132 y 137-154

**Banu, N.; Banu, Y.; Sakai, M.; Mashino, T.; Tsuchiya, T.** (2005) Biodegradable polymers in chondrogenesis of human articular chondrocytes. *J Artif Organs.*8(3):184-91

**Bargmann, W.** (1968) II. Los tejidos de sostén o de soporte. In: *Histología y Anatomía-Microscópica Humanas.* Tercera edición española. Editorial Labor. 151-162

**Barnewitz, D; Endres, M.; Kruger, I.; Becker, A.; Zimmermann, J.; Wilke, I.; Ringe, J.; Sittinger, M.; Kaps, C.** (2006) Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials.* 27: 2882-2889

**Barry, F.P.; Boynton, R.E.; Haynesworth, S.; Murphy, J.M.; Zaia, J.**(1999) The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* 265(1):134-9.

**Barry, F.P.; Boynton, R.E.; Liu, B.; Murphy, J.M.** (2001a) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res.* 268:189-200

**Barry, F.P.; Boynton, R.; Murphy, M.; Haynesworth, S., Zaia, J.** (2001b) SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.*289(2):519-24

**Barry, F.P. y Murphy J.M.** (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biology.* 36(4):568-84

**Barnes, D.W.H. y Loutit, J.F.** (1955) The radiation recovery factor: Preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. *J. Natl Cancer Inst.*15:901

**Bassas, L.; de Pablo, F.; Lesniak, M.A.; Roth, J.**(1985) Ontogeny of receptors for insulin-like peptides in chick embryo tissues: early dominance of insulin-like growth factor over insulin receptors in brain.*Endocrinology.*117(6):2321-9

- Baxter, M.A.; Wynn, R.F.; Jowitt, S.N.; Wraith, J.E.; Fairbairn, L.J.; Bellantuono, I.** (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 22:675-682
- Beck, F.; Samani, N.J.; Penschow, J.D.; Thorley, B.; Tregear, G.W.; Coghlan, J.P.** (1987) Histochemical localization of IGF-I and II mRNA in the developing rat embryo. *Development*. 101:175-184
- Becker, J.C.; Beckbauer, M.; Domschke, W.; Herbst, H.; Pohle, T.** (2005) Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury, and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointest Endosc*. 61(4):560-7
- Benjamin, M. y Ralphs J.R.** (2004) Biology of fibrocartilage cells. *International Review of Cytology*. 233: 1-45
- Bennett, V.D.; Pallante, K.M.; Adams, S.L.** (1991) The splicing pattern of fibronectin mRNA changes during chondrogenesis resulting in an unusual form of the mRNA in cartilage. *J Biol Chem*. 266(9):5918-24
- Benson, K.C.M.; Benson, J.D.; Critser, J.K.** (2008) An improved cryopreservation method for a mouse embryonic stem cell line. *Cryobiology*. 56(2):120-30
- Bent, A.E.; Trutone, R.T.; McLennan, M. T.; Lloyed, L.K.; Kennely, M.J.; Bladani, G.** (2001) Treatment of intrinsic sphincter deficiency using autologous ear chondrocytes as bulking agent. *Neurology and urodynamics*. 20:157-165
- Bernsfield, M.; Gotte; Park, P. W.; Reizes, O.; Fitzgerald, M. L.; Lincecum, J.; Zako, M.** (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Ver. Biochem.*. 68:729-777
- Bishop, A.E.; Buttery, L.D.; Polak, J.M.** (2002) Embryonic stem cells. *J Pathol*. 197(4):424-9
- Bhakta, N.R.; Garcia, A.M.; Frank, E.H.; Grodzinsky, A.J.; Morales, T.I.** (2000) The insulin-like growth factors (IGFs) I and II bind to articular cartilage via the IGF-binding proteins. *J Biol Chem*. 275(8): 5860-6
- Bjorntorp, P.; Karlsson, M.; Gustafsson, L.; Smith, U.; Sjostrom, L.; Cigolini, M.; Storck, G.; Pettersson, P.** (1979) Quantitation of different cells in the epididymal fat pad of the rat. *Journal of Lipid Research*. 20, 97-106
- Blau, H.M.; Brazelton, T.R.; Weimann, J.M.** (2001) The evolving concept of a stem cell. *Cell*. 105:829-841
- Bonaventure, J.; Kadhon, N.; Cohen-Solal, L.; Ng, K.H.; Bourguignon, J.; Lasselin, C.; Freisinger, P.** (1994) Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*. 212(1):97-104
- Bloom, W. y Fawcett, D. W.** (1975) Tecidos conjuntivos / Cartilagem In: *Tratado de Histologia*. Tradução e adaptação da 10ª Edição em Inglês de Saunders Company. Editorial Acribia. 159-175 y 235-246
- Bloom, W. y Fawcett, D. W.** (1994) Cartilage/Bone In: *A textbook of Histology*. 12º Edition, Chapman & Hall. 182-233

**Boot-Handford, R. P.; Tuckwell, D.S.; Plumb, D.A.; Rock, C.F.; Poulson, R.** (2003) A novel and highly conserved collagen (pro(α)1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J. Biol. Chem.* 278(33):31067-77

**Boquest, A.C.; Shahdadfar A.; Fronsdal K.; Sigurjonsson O.; Tunheim S. H.; Collas, P.; Brinchmann J.E.** (2005) Isolation and Transcriptional Profiling of Purified Uncultured Human Stromal Cells: Alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Molecular Biology of the Cell.* 16: 1131-1141

**Boyde, A y Firth, E.C.** (2004) Articular calcified cartilage canals in the third metacarpal bone of 2-year-old thoroughbred racehorses. *J. Anat.* 205:491-500

**Bradamante, Z.; Kostovic-Knezevic, L.; Levak-Svajer, B.; Svajger, A.** (1991) Differentiation of the secondary elastic cartilage in the external ear of the rat. *Int. Journal Dev. Biol.* 35: 311-320

**Bradham, D.M.; Passaniti, A.; Horton, W.E.** (1995) Mesenchymal cell chondrogenesis is stimulated by basement membrane matrix and inhibited by age-associated factors. *Matrix Biol.* 14: 561-571

**Bradley, T.R.; Hodgson, G.S.; Rosendaal, M.** (1978) The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation in vitro. *J Cell Physiol.* 97:517-522

**Britt, J.C. y Park, S.S.** (1998) Autogenous tissue-engineered cartilage. Evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 124:671-7

**Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L.** (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New England Journal of Medicine.* 331:889-895

**Bruder, S.P.; Jaiswal, N.; Haynesworth, S.E.** (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J.Cell Biochem.* 64, 278-294

**Brun, P.; Abatangelo, G.; Radice, M.; Zacchi, V.; Guidolin, D.; Gordini, D.; Cortivo, R.** (1999) Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res.*46(3): 337-46

**Bryant, S.J. y Anseth, K.S.** (2002) Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research.* 59:63-72

**Buchanan, S.S.; Gross, S.A.; Acker, J.P.; Toner, M.; Carpenter, J.F.; Pyatt, D.W.** (2004) Cryopreservation of stem cells using trehalose: Evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem Cells Dev.* 3:295-305

**Bulic, K.** (1996) Articular chondrocytes interact with basement membrane Matrigel through laminin active binding sites. *Acta Med Croatica.* 50:69-74

**Buschmann, M.D.; Gluzband, Y.A.; Grodzinsky, A.J.; Kimura, J.H.; Hunziker, E.B.** (1992) Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *Journal of Orthopaedic Research.* 10:745-752

**Buckwalter J.A. y Mankin H.J.** (1997a) Articular cartilage part I: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Journal of Bone and Joint Surgery.* 79A (4):600-611

- Buckwalter, J.A. y Mankin H.J.** (1997b) Articular cartilage part II: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 79A (4), 612-632
- Buckwalter, J.A. y Rosenberg, L.C.** (1982) CD44: The hyaluronan receptor. *J. Cell Sci.* 103:293-298
- Burton-Wurster N.; Horn, V.J.; Lust, G.** (1988) Immunohistochemical localization of fibronectin in canine articular cartilage. *J Histochem Cytochem.* 36:581-8
- Burton-Wurster, N.; Lust, G.; Macleod, J.N.** (1997) Cartilage fibronectin isoforms: in search of functions for a special population of matrix glycoproteins. *Matrix Biol.* 15(7):441-54
- Burg, M.A.; Tillet, E.; Timpl, R.; Stallcup, W.B.** (1996) Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem.* 271(42):26110-6
- Camper, L.; Hellman, U.; Lundgren-Åkerlund, E.** (1998) Isolation, Cloning, and Sequence Analysis of the Integrin Subunit  $\alpha 10$ , a  $\beta 1$ - associated Collagen Binding Integrin Expressed on Chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* 273(32):20383-20389
- Camper, L.; Holmvall, K.; Wängnerud, C.; Aszódi, A.; Lundgren-Åkerlund, E.** (2001) Distribution of the collagen-binding integrin  $\alpha 10\beta 1$  during mouse development. *Cell Tissue Res.* 306:107-116
- Cao, Y.; Lach, E.; Kim, T.H.; Rodríguez, A.; Arévalo, C.A.; Vacanti, C.A.** (1998a) Tissue-Engineered nipple reconstruction. *Plastic & Reconstructive Surgery.* 102:2293-96
- Cao, Y.; Rodriguez, A.; Vacanti, M.; Ibarra, C.; Arevalo, C.; Vacanti, C.A.** (1998b) Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polymer Edn.* 9:475-87
- Carlín, R.; Davis, D.; Weiss, M.; Schultz, B.; Troyer, D.** (2006) Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 4:8
- Carranza-Bencano, A.; Armas-Padrón, J.R.; Gili-Miner, M.; Lozano, M.A.** (2000) Carbon fiber implants in osteochondral defects of the rabbit patella. *Biomaterials.* 21(21):2171-6
- Carossino, A.M.; Recenti, R.; Carossino, R.; Piscitelli, E.; Gozzini, A.; Martinetti, V.; Mavilia, C.; Franchi, A.; Danielli, D.; Aglietti, P.; Ciardullo, A.; Galli, G.; Tognarini, I.; Moggi Pignone, A.; Cagnoni, M.; Brandi, M.L.** (2007) Methodological models for in vitro amplification and maintenance of human articular chondrocytes from elderly patients. *Biogerontology.* 8(5):483-98
- Casper-Bauguil, S.; Cousin, B.; Galinier, A.; Segafredo, C; Nibbelink, M; André, M.; Casteilla, L.; Penicaud, L.** (2005) Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific changes in obesity. *FEBS Lett.* 579:3487-3492
- Caterson, E.J.; Nesti, L.J.; Li, W.J.; Danielson, K.G.; Albert, T.J.; Vaccaro, A.R.; Tuan, R.S.** (2001) Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. *Journal of Biomedical Materials Research.* 57: 394-403

- Celeste, A. J.; Iannazzi, J.A.; Taylor, R. C.; Hewick, R.M.; Rosen, V.; Wang, E.A.; Wozney, J.M.** (1990) Identification of transforming growth factor  $\beta$  family members present in bone protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:9843-9847
- Chang, J. y Poole, C.A.** (1996) Sequestration of type VI collagen in the pericellular microenvironment of adult chondrocytes cultured in agarose. *Osteoarthritis Cartilage.* 4(4):275-85
- Chang, C.H.; Liu, H.C.; Lin, C.C.; Chou, C.H.; Lin, F.H.** (2003) Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 24: 4853-4858
- Chang, C.H.; Lin, F.H.; Lin, C.C.; Chou, C.H.; Liu, H.C.**(2004) Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 71(2): 313-21
- Chapekar, M.S.**(2000) Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res.* 53(6):617-20
- Cherubino, P.; Grassi, F.A.; Bulgheroni, P.; Ronga, M.** (2003) Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: A preliminary report. *Journal of Orthopaedic Surgery.* 11(1):10-15
- Chen, Q.; Johnson, D.M.; Haudenschild, D.R.; Goetinck, P.F.** (1995) Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Dev Biol.* 172(1):293-306
- Chen, G.; Ushida, T.; Tateishi, T.** (2002) Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience.* 2:67-77
- Chiquet, M. y Frambrough, D. M.** (1984) Chick myotendinous antigen. A monoclonal antibody marker for the tendon and muscle morphogenesis. *J. Cell. Biol.*98:1926-1936
- Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J.A., Ganan, Y, Macias, D., Merino, R.Hurle, J.M.** (2003) Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol.* 257:292-301
- Chou, C.H.; Cheng, W.T; Kuo, T.F.; Sun, J.S.; Lin, F.H.; Tsai, J.C.** (2007) Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: the results of real-time polymerase chain reaction. *Biomed Mater Res A.* 82(3):757-67
- Chu, T.M.; Warden, S.J.; Turner, C.H.; Stewart, R.L.**(2007) Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.*28(3):459-67
- Chubinskaya, S.; Hakimiyan, A.; Pacione, C.; Yanke, A.; Rappoport, L.; Aigner, T.; Rueger, D.C.; Loeser, R.F.** (2007) Synergistic effect of IGF-1 and OP-1 on matrix formation by normal and AO chondrocytes cultured in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage.*15:421-430
- Chubinskaya, S. y Kuettner, K.E.** (2003). Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1223-1340
- Chung, U.I.; Lanske, B.; Lee, K.; Li, E.; Kronenberg, H.** (1998) The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*95(22):13030-5



**Chung, C.; Mesa, J.; Miller, G.J.; Randolph, M.A.; Gill, T.J.; Burdick, J.A.** (2006a) Effects of auricular chondrocyte expansion on neocartilage formation in photocrosslinked hyaluronic acid networks. *Tissue Engineering* 12:2665–2673

**Chung, C.; Mesa, J.; Randolph, M.A.; Yaremchuk, M.; Burdick, J.A.** (2006b) Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic acid networks. *Journal of Biomedical Materials Research A*. 77:518–525

**Chung, C. y Burdick, J.A.** (2008) Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60:243–263

**Collins, P.** (1995) Embryology and development. In : *Gray's Anatomy*. Editor: Williams P. L., Thirty-Eight Edition. Churchill Livingstone. 264–298

**Cormack, D. H.** (1987) Tendons, ligaments and cartilage In: *Ham's Histology*. Ninth Edition, Lippincott. 264–323

**Cormack, D. H.** (1996) Tejido conjuntivo denso, cartilagem, ossos e articulações In: *Fundamentos de histologia*. Editora Guanabara Koogan. 129–155

**Cousin, B.; André, M.; Arnaud, E.; Pénicaud, L.; Casteilla, L.** (2003) Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 301(4):1016–22

**Coveñas, R.; Riñero, J., Aguirre, J.A.; Aijon, A.; López Campos, J.L.** (1982) Aplicación de las técnicas histoquímicas y convencionales a los cortes semifinos. *Morf Normal Patol*. A.6: 209–217

**Cowan, C. M.; Quarto, N.; Warren, S.M.; Salim, A.; Longaker, M.T.** (2003) Age – related changes in the biomolecular mechanisms of calvarial osteoblast biology affect fibroblast growth factor-2 signaling and osteogenesis. *J Biol Chem*. 278:32005–13

**Cowan, C.M.; Shi, Y-Y; Aalami, O.O.; Chou, Y-F-; Mari, C.; Thomas, R.; Quarto, N.; Contag, C.H.; Wu, B.; Longaker, M.T.** (2004) Adipose-derived adult stem cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat. Biotechnol*. 22:560–567

**Danen, E.H.J.; Sonneveld, P.; Brakebusch, C.; Fässler, R.; Sonnenberg, A.** (2002) The fibronectin-binding integrins  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha v \beta 3$  differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *The Journal of Cell Biology*. 159(6):1071–1086

**Darling, E.M. y Athanasiou, K.A.** (2005) Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*. 23(2):425–32

**Das, S.; Bonaguidi, M.; Muro, K.; Kessler, J.A.** (2008) Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus*. 24(3–4):E4

**Dausse, Y.; Grossin, L.; Miralles, G.; Pelletier, S.; Mainard, D.; Hubert, P.; Baptiste, D. Gillet, P.; Dellacherie, E.; Netter, P.; Payan, E.** (2003) Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis and Cartilage*. 11:16–28

**Deasy, B.M.; Jankowski, R.J.; Huard, J.** (2001) Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 27(5):924–33

- De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Tylzanowski, P.; Luyten, F.P.**(2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44(8):1928-42
- Debelak-Fehir, K.M.; Catchatourian, R.; Epstein, R.B.** (1975) Hemopoietic colony forming units in fresh and cryopreserved peripheral blood cells of canines and man. *Exp. Hematol.* 3:109-116
- de Crombrughe, B.; Lefebvre, V.; Nakashima, K.** (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol.* 13(6):721-7
- DeFail, A.J.; Chu, C.R.; Izzo, N.; Marra, K.G.** (2006) Controlled release of bioactive TGF-beta 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels. *Biomaterials.* 27(8):1579-85
- Delise, A. M.; Fischer, L.; Tuan, R. S.** (2000) Cellular interactions and signalling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage.* 8: 309-334
- Dellmann, H.D. y Brown, E.M.** (1987) 3. Connective and Supportive Tissues. In: Textbook of Veterinary Histology. Third edition. Lea & Febiger. 51-59
- Denker, A.E.; Haas, A.R.; Nicoll, S.B.; Tuan, R.S.** (1999) Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high density micromass cultures. *Differentiation.* 64:67-76
- De Pablo F, Roth J, Hernandez E, Pruss RM.**(1982) Insulin is present in chicken eggs and early chick embryos. *Endocrinology.* 111(6):1909-16
- De Ugarte, D.A.; Alfonso, Z.; Zuk, P.A.; Elbarbary, A.;Zhu, M.; Ashjian, P.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H.; Fraser, J.K.** (2003) Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett.* 89(2-3):267-70
- Derfoul, A.; Miyoshi, A.D.; Freeman, D.E.; Tuan, R.S.** (2007) Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* 15(6):646-55
- Deslex S.; Negrel, R.; Vannier, C.; Etienne, J.M.; Ailhaud, G.** (1987) Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined medium. *International Journal Obesity.*11:19-27
- Dessau, W. H.; von der Mark, H.; von der Mark, K.; Fisher, S.** (1980) Changes in the pattern of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 57: 51-60
- Dewey, M.J.; Martin, D.W.; Martin, G.R.; Mintz, B.** (1977) Mosaic mice with teratocarcinoma-derived mutant cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5564-5568
- Diaz-Romero, J.; Gaillard, J.P.; Grogan, S.P.; Nestic, D.; Trub, T.; Mainil-Varlet,P.** (2005) Immunophenotypic Analysis of Human Articular Chondrocytes: Changes in Surface Markers associated with Cell Expansion in Monolayer Culture. *Journal of Cell Physiology.* 202:731-742
- DiCesare, P.E.; Mörögelin, M.; Mann, K.; Paulsson, M.** (1994) Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding. *Eur J Biochem.*223(3):927-37

- Dicker, A.; Le Blanc, K.; Åström, G.; van Harmelen, V.; Götherström C.; Blomqvist, L.; Arner P.; Rydén, M.** (2005) Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose stem cells. *Experimental Cell Research*. 308:283-290
- Dietrich, I.** (2004) Influencia da composição do carreador biodegradável na viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano. *Tese doutoramento Universidade de S. Paulo*.1-83
- Djian, P.; Roncari, D.A.K.; Hollenberg, C.H.** (1983) Influence of Anatomic Site and Age on the Replication and Differentiation of Rat Adipocyte Precursors in Culture. *J. Clin. Invest.* 72:1200-108
- Domm, C.; Schünke, M.; Christesen, K.; Kurz, B.**(2002) Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage*. 10(1):13-22
- Doube, B. P.; Firth, E.C.; Boyde, A.** (2007) Variations in articular calcified cartilage by site and exercise in the 18-month-old equine metacarpal condyle. X
- Douchis, J.S.; Coutts, R.D.; Amiel, D.** (2000) Cartilage repair with autogenic perichondrium cell/poly(lactic acid) grafts: a two-year study in rabbits. *J. Orthop Res*. 18:512-515
- Dragoo, J.L.; Carlson, G.; McCormick, F.; Khan-Farooqi, H.; Zhu, M.; Zuk, P.A.; Benhaim, P.** (2007) Healing Full-Thickness Cartilage Defects Using Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering*. 13(7):1615-1621
- Drury, J.L. y Mooney D.J.** (2003) Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*.24(24):4337-51
- Duda, G.N.; Haisch, A.; Endres, M.; Gebert, C.; Schroeder, D.; Hoffmann, J.E.; Sittinger, M.** (2000) Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo. *J Biomed Mater Res*.53(6):673-7
- Dunkelman, N.S.; Zimmer, M.P.; LeBaron, R.G.; Pavelec, R.; Kwan, M.; Purchio, A.F.** (1995) Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system. *Biotechnology Bioengineering*. 46:299-305
- Duprez, D.M.; Coltey, M.; Amthor, H.; Brickell, P.M; Tickle, C.**(1996) Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Inhibits Muscle Development and Promotes Cartilage Formation in Chick Limb Bud Cultures. *Development Biology*.174:448-452
- Dürr, J.; Goodman, S.; Potocnik, A.; von der Mark, K.** (1993) Localization of  $\beta 1$  in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp. Cell Res*. 207:235-244
- Dürr, J.; Lamni, P.; Goodman, S. L.; Aigner, T., von der Mark, K.** (1996) Identification and immunolocalization of laminin in cartilage. *Exp. Cell Res*.10: 225-233
- Ekblom, P.; Lonai, P.; Talts, J. F.** (2003) Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biology*. 22:35-47
- Elisseeff, J.; McIntosh, W.; Fu, K.; Blunk, T.; Langer, R.** (2001) Controlled-release of IGF-I and TGF- $\beta 1$  in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research*. 19(6):1098-1104

**Elisseff, J.; Anseth, K.; Sims, D.; McIntosh, W.; Randolph, M.; Langer, R.**(1999) Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.96(6):3104-7

**Ellsworth, J.L.; Berry, J.; Bukowski, T.; Claus, J.; Feldhaus, A.; Holderman, S.; Holdren, M.S.; Lum, K.D.; Moore, E.E.; Raymond, F.; HongPing Ren; Shea, P.; Sprecher, C.; Storey, H.; Thompson, D. L.; Waggle, K.; Yao, L.; Fernandes, R. J.; Eyre, D. R.; Hughes, S. D.** (2002) Fibroblast growth factor-18 is a trophic factor for mature chondrocytes and their progenitors. *Osteoarthritis Cartilage*. 10:308-320

**Elsaid, K.A.; Jay, G.D.; Chichester, C.O.** (2007) Reduced expression and proteolytic susceptibility of lubricin/superficial zone protein may explain early elevation in the coefficient of friction in the joints of rats with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 56(1):108-16.

**Elsaid, K.A.; Jay, G.D.; Warman, M.L.; Rhee, D.K.; Chichester, C.O.**(2005) Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 52(6):1746-55

**English, D.; Paterson, A.H.; Bone, G; MaPherson, T.A.** (1979) Cryopreservation of canine hematopoietic cells. *Clin Invest Med*. 2:67-74

**Enomoto, M.; Leboy, P.S.; Menko, A.S.; Boettiger, D.** (1993)  $\beta$ 1-Integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res*. 205:276-285

**Enomoto-Iwamoto, M.; Iwamoto, M.; Mikudai, Y.; Kawakami, Y., Noho, T.; Higuchi, Y., Takemoto, S., Ohuchi, H., Noji, S., Kurisu, K.** (1998) Bone morphogenetic protein signalling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *The Journal of Cell Biology*. 140(2):409-418

**Erickson, GR; Gimble, J.M.; Franklin, D.M.; Rice, H.E.; Awad, H.; Guilak, F.** (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 290(2):763-9

**Estes, B.T.; Wu, A.W.; Guilak, F.** (2006a) Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis & Rheumatism*. 54(4):1222-1232

**Estes, B.T.; Wu, A.W.; Storms, R.W.; Guilak, F.**(2006b) Extended Passaging, but not Aldehyde Dehydrogenase Activity, Increases the Chondrogenic Potential of Human Adipose-Derived Adult Stem Cells. *Journal Of Cellular Physiology*. 209:987-995

**Estes, B.T.; Diekman. B.O.; Guilak, F.** (2008) Monolayer cell expansion conditions affect the chondrogenic potential of adipose derived stem cells. *Tissue engineering and Delivery Systems*. 9(4):986-95

**Estrada, L.E.; Dodge, G.R.; Richardson, D.W.; Farole, A.; Jimenez, S.A.** (2001) Characterization of a biomaterial with cartilage-like properties expressing type X collagen generated in vitro using neonatal porcine articular and growth plate chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 9(2):169-77

**Eurell, J. A. C. y Sickle, D. C. V.** (1998) Conective and supportive tissues. In: *Textbook of Veterinary Histology*. Editores: Delmann H. D. y Eurell J. A. 5ª Edição. Lippincott Williams & Wilkins.44-51

**Eyre, D.** (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research*. 4:30-35

**Facchini, A., Lisignoli, G.; Cristino, S.; Roseti, L., De Franceschi, L., Marconi, E.; Grigolo, B.** (2006) Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology*.43:471-480

**Fan, H.; Hu, Y.; Qin, L.; Li, X.; Wu, H.; Lv, R.** (2006) Porous gelatin-chondroitin-hyaluronate tri-copolymer scaffold containing microspheres loaded with TGF-beta1 induces differentiation of mesenchymal stem cells in vivo for enhancing cartilage repair. *J Biomed Mater Res A*. 77(4):785-94

**Farquharson, C.; Berry, J.L.; Mawer, E.B.; Seawright, E.; Whitehead, C.C.**(1995) Regulators of chondrocyte differentiation in tibial dyschondroplasia: an in vivo and in vitro study. *Bone*.17(3): 279-86

**Ferraris, C.; Chevalier, G.; Favier, B.; Jahoda, C.A.; Dhouailly, D.** (2000) Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development*. 27(24):5487-95

**Festy, F.; Hoareu, L.; Bes-Houtmann, S.; Pequignot, A.M.; Gonthier, M.P.; Munstun, A.; Hoarau J. J.; Césari, M.; Roche, R.** (2005) Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. *Histochem Cell Biology*. 124(2):113-21

**Fermor, B.; Urban, J.; Murray, D.; Pocock, A.; Lim, E.; Francis, M.; Gage, J.** (1998) Proliferation and collagen synthesis of human anterior cruciate ligament cells in vitro: Effects of ascorbate-2-phosphate, dexamethasone and oxygen tension. *Cell Biol Int*. 22:635-640

**Floman, Y.; Eyre, D.R.; Glimcher, M.J.** (1980) Induction of Osteoarthritis in the rabbit knee joint:: biochemical studies on the articular cartilage. *Clin Orthop*. 147:278-286

**Fortier, L.A.; Nixon, A.J.; Williams, J.; Cable, C.S.**(1998) Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res*. 59:1182-1187

**Forsyth, C.B.; Pulai, J.; Loeser, R.F.** (2002) Fibronectin Fragments and Blocking Antibodies to  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  Integrins Stimulate Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Increase Collagenase 3 (Matrix Metalloproteinase 13) Production by Human Articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 46(9):2368-2376

**Fragonas, E.; Valente, M.; Pozzi-Mucelli, M.; Toffanin, R.; Rizzo, R.; Silvestri, F.; Vittur, F.**(2000) Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*. 21(8):795-801

**Franceschi, R.T.** (1992) The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutr Rev*. 50(3):65-70

**Franzen, A.; Heinegard, D.; Solorsh, M.** (1987) Evidence for sequential appearance of cartilage matrix proteins in developing mouse limbs and in cultures of mouse mesenchymal cells. *Differentiation*. 36: 199-202

**Frazer, A.; Seid, J.M.; Hart, K.A.; Bentley, H.; Buning, R.A.D.; Russel, R.G.G.** (1991) Detection of mRNA for the transforming growth factor  $\beta$  family in human articular chondrocytes by the polymerase chain reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 180(2):602-608

- Frazer, J. K.; Wulur, I.; Alfonso, Z.; Hedrick, M.H.** (2006) Fat Tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 24(4):150-4
- Freed, L.E. y Vunjak-Novakovic G.** (1995) Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity. *Biotechnology and Bioengineering*. 46:306-313
- Freed, L.E. y Vunjak-Novakovic, G.** (1998) Culture of organised cell communities. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 33:15-30
- Freed, L.E.; Marquis, C.; Nohria, A.; Emmanuel, J.; Mikos, A.G.; Langer, R.** (1993) Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J. Biomater Res*. 27:11-23
- Freed, L.E.; Vunjak-Novakovic, G.; Biron, R.J.; Eagles, D.B.; Lesnoy, D.C.; Barlow, S.K.; Langer, R.** (1994a) Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Bio/Technology*. 12:689-693
- Freed, L.E.; Vunjak-Novakovic, G.; Marquis, J.C.; Langer, R.** (1994b) Kinetics of chondrocyte growth in cell-polymer implants. *Biotechnology and Bioengineering*. 43: 597-604
- Freed, L.E.; Hollander, A.P.; Martin, I.; Barry, J.R.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G.** (1998) Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Experimental Cell Research*. 240:58-65
- Freed, L.E.; Martin, I.; Vunjak-Novakovic, G.** (1999) Frontiers in tissue engineering: *in vitro* modulation of chondrogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 367S, S46-S58
- Freemont, A.J. y Hoyland, J.** (2006) Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage: Its significance in cartilage repair and replacement. *European Journal of Radiology*. 57: 32-36
- French, M.M. y Athanasiou, K.A.** (2003) Chapter 2- Differentiation Factors and Articular Cartilage Regeneration. *Topics in Tissue Engineering*. Eds. N. Ashammakhi & P. Ferretti
- French, M. M.; Smith, S. E.; Akanbi, K.; Sanford, T.; Hecht, J.; Farach-Carson; Carson, D. D.** (1999) Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. *The Journal of Cell Biology*. 145(5):1103-1115
- Frenz, D.A.; Jaikaria, N.S.; Newman, S.A.** (1989) The mechanism of precartilage mesenchymal condensation: A major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Dev. Biol*. 136: 97-103
- Friedenstein, A.J.P. y Petrakova, K.V.** (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *The Journal of Embryological Experimental Morphology*. 16:381-390
- Fukumoto, T.; Sanyal, A.; Fitzsimmons J.S.; O'Driscoll, SW.** (2002) Expression of  $\beta 1$  integrins during periosteal chondrogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 10:135-144
- Fukumoto, T.; Sperling J.W.; Sanyal, A.; Fitzsimmons, J.S.; Reinholz. G.G.; Conover, C.A.; O'Driscoll, S.W.** (2003) Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 11(1):55-64

- Fukushi, J., Makagiansar, I.T., Stallcup, W.B.** (2004) NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and  $\alpha 3 \beta 1$  integrin. *Mol Biol Cell*. 15(8):3580-90
- Fujioka, T.; Yasuchika, K.; Nakamura, Y.; Nakatsuji, N.; Suemori, H.** (2004) A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*. 48:1149-1154
- Fujisato, T.; Sajiki, T.; Liu, Q.; Ikada, Y.**(1996) Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold. *Biomaterials*. 17(2):155-62
- Fusseneger, M.; Meinhart, J.; Hobling, W.; Kullich, W.; Bernatzky, G.** (2003) Stabilized autologous fibrin-chondrocyte constructs for cartilage repair in vivo. *Ann Plast Surg*. 51:493-498
- Gabe, M.** (1968) *Techniques Histologiques*. Masson.
- Galois, L.; Freyria, A.-M.; Herbage, D.; Mainard, D.** (2005) Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches. *Pathologie Biologie*. 53:590–598
- Gaustad, K.G.; Boquest, A.C.; Anderson, B.E.; Gerdes, A.M.; Collas, P.** (2004) Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 314(2):420-7
- Genes, N.G.; Rowley, J.A.; Mooney, D.J.; Bonassar, L.J.**(2004) Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. *Arch Biochem Biophys*.422(2):161-7
- Gelse, K.; Jiang, Q.J.; Aigner, T.; Ritter, T.; Wagner, K.; Pöschl, E.; von der Mark, K.; Schneider, H.**(2001) Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum*.44(8):1943-53
- Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T.** (2003) Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55:1531– 1546
- Giannoni, P. y Hunziker, E.B.**(2003) Release kinetics of transforming growth factor-beta1 from fibrin clots. *Biotechnol Bioeng*. 83(1):121-3
- Gibson, G.J. y Flint, M.H.** (1985) Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J Cell Biol*.101:277–284
- Gimble, J.M.** (2003) Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 3(5):705-13
- Gimble, J.M. y Guilak, F.** (2003) Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 5(5):362-369
- Girbau, M.; Gomez, J.A.; Lesniak, M.A.; de Pablo, F.** (1987) Insulin and insulin-like growth factor I both stimulate metabolism, growth, and differentiation in the postneurula chick embryo. *Endocrinology*.121(4):1477-82
- Ghadially, F.N.; Lalonde, J.M.; Wedge, J.H.** (1983) Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat*.136(4):773-91
- Glauert, A.M.** (1975) Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. Ed. A.M. GLAUERT. North Holland, Amsterdam

**Glant, T.T.; Hadhazy, C.S.; Mikecz, K.; Sipos, A.** (1985) Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II. *Histochemistry*. 82:149-158

**Gluhak, J.; Mais, A.; Mina, M.** (1996) Tenascin- C is associated with early stages of chondrogenesis by chick mandibular ectomesenchymal cells in vivo and in vitro. *Dev. Dyn.* 205:24-40

**Goessler, U.R.; Bugert, P.; Bieback, K.; Deml, M.; Sadick, H.; Hormann, K. ; Riedel, F.** (2005a) *In-Vitro* Analysis Of The Expression Of TGF $\beta$  Superfamily members During Chondrogenic Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells And Chondrocytes During Dedifferentiation In Cell Culture. *Cellular & Molecular Biology Letters*.10:345-362

**Goessler, U.R.; Bugert, P.; Bieback, K.; Huber, K.; Fleischer, L.I.; Hormann, K.; Riedel, F.** (2005b) Differential Modulation of Integrin Expression in Chondrocytes During Expansion for Tissue Engineering. *In Vivo*. 19:501-508

**Goessler, U.R.; Bieback, K.; Bugert, P.; Heller, T.; Sadick, H.; Hörmann, K.; Riedel, A.F.** (2006a) *In vitro* analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture. *International Journal Of Molecular Medicine*.17:301-307

**Goessler, U.R.; Bugert, P.; Bieback, K.; Sadick, H.; Baisch, A.; Hormann, K. Riedel, F.** (2006b) In Vitro Analysis of Differential Expression of Collagens, Integrins, and Growth Factors in Cultured Human Chondrocytes. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 134:510-515

**Goh, B. C.; Thirumala, S.; Kilroy, G.; Devireddy, R. V.; Gimble, J. M.** (2007) Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *J Tissue Eng Regen Med*. 1:322-324

**Gomes, R. R. J.; Farach-Carson, M. C.; Carson, D.D.** (2004) Perlecan functions in chondrogenesis: Insights from in vitro and in vivo models. *Cells Tissues and Organs*. 176(1-3): 79-86

**Gomillion, C. T. y Burg K.J.L.** (2006) Stem Cells and Adipose Tissue Engineering. *Biomaterials*. 27:6052-6063

**Gonda, K.; Shigeura, T.; Sato, T.; Matsumoto, D.; Suga, H.; Inoue, K.; Aoi, N.; Kato, H.; Sato, K.; Murase, S.; Koshima, I.; Yoshimura, K.** (2008) Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*. 121(2):401-10

**Gorensek, M.; Jaksimović, C.; Kregar-Velikonja, N.; Gorensek, M.; Knezevic, M.; Jeras, M.; Pavlovcic, V.; Cör, A.** (2004) Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes. *Cell Mol Biol Lett*.9(2):363-73

**Gooch, K.J.; Blunk, T.; Courter, D.L.; Sieminski, A.L.; Bursac, P.M.; Vunjak-Novakovic, G., Freed, L.E.** (2001) IGF-1 and mechanical environment interact to modulate engineered cartilage development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 286:909-915

**Grad, S.; Kupcsik, L.; Gorna, K.; Gogolewski, S.; Alini, M.** (2003) The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials*. 24:5163-5171



- Grande, D.A.; Halberstadt, C.; Naughton, G.; Schwartz, R.; Manji, R.**(1997) Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res.* 34(2): 211-20
- Grande, D.A.; Breitbart, A.S.; Mason, J.; Paulino, C.; Laser, J.; Schwartz, R.;** (1999) Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 367S: S176-S185
- Green, W.T. Jr.** (1977) Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop Relat Res.*(124):237-50
- Greenwood, M. R. C. y Hirsch, J.** (1974) Postnatal development of adipocyte cellularity in the normal rat.15:474-483
- Grigolo, B.; Lisignoli, G.; Piacentini, A.; Fiorini, M.; Gobbi, P.; Mazzotti, G.; Duca, M.; Pavesio, A.; Facchini, A.** (2002) Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF™ 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials.* 23:1187-1195
- Grigoriadis, A.E.;Heersche,J.N.; Aubin, J.E.** (1990) Continuously growing bipotential and monopotent myogenic, adipogenic, and chondrogenic subclones isolated from the multipotential RCJ 3.1 clonal cell line. *Dev Biol.* 142:313-318
- Grimshaw, M.J. y Mason, R.M.** (2000) Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage.* 8(5):386-92
- Grompe, M.** (2005) Embryonic stem cells without embryos? *Nat Biotechnol.* 23(12):1496-7
- Gronthos, S.; Franklin, D.M.; Leddy, H.A.; Robey, P.G.; Storms, R.W.; Gimble, J.M.** (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell Physiology.* 189(1):54-63
- Gruber, R., Mayer, C., Bobackz, K., Krauth, M.T., Graninger, W., Luyten, F.P., Erlacher, L.** (2001). Effects of cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 on osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells. *Endocrinology.* 142:2087-2094
- Grunder, T.; Gaissmaier, C.; Fritzzyz, J.; Stoop, R.; Hortschanskyk, P.; Mollenhauer, J.; Aicher, W.K.** (2004) Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *OsteoArthritis and Cartilage.* 12:559-567
- Guilak, F.; Awad, H.A.; Fervor, B.; Leddy, H.A.; Gimble, J.M.** (2004) Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology.* 41(3-4):389-99
- Guilak, F.; Lott, K.E.; Awad, H.A.; Cao, Q.; Hickok, K.C.; Fermor, B.; Gimble, J.M.** (2006) Clonal Analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J. Cell Physiology.* 206(1):229-37
- Guimble, J.M. y Guilak, F.** (2003) Adipose-derived stem cells: isolation, characterization and differentiation potencial. *Cytotherapy.* 5:362-369
- Gunatillake, P.A. y Adhikari, R.**(2003) Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater.*5:1-16
- Guo, T; Zhao, J; Changa, J; Dinga, Z; Honga, H; Chena, J; Zhang, J** (2006) Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor- $\beta$ 1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials.* 27:1095-1103

- Habuchi, H.; Conrad, H.E.; Glaser, J.H.**(1985) Coordinate regulation of collagen and alkaline phosphatase levels in chick embryo chondrocytes. *J Biol Chem.* 260(24): 13029-34
- Hall, B. K. y Miyake, T.** (1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited.*International Journal of Development Biology.* 39:881-893
- Hattori, H.; Masuoka, K.; Sato, M.; Ishihara, M.; Asazuma, T.; Takase, B.; Kikuchi, M.; Nemoto, K.; Ishihara, M.** (2006) Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 76(1):230-9
- Hauner, H.; Entenmann, G.; Wabitsch, M.; Gaillard, D.; Ailhaud, G.; Negrel, R.; Pfeiffer, E.F.** (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest.* 84(5):1663-70
- Hauselmann, H. J.; Fernández, R.J.; Mok, S.S.; Schmid, T.M.; Block, J.A.; Aydelotte, M.B.; Kuettner, K.E.; Thornar, E.J.** (1994) Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J.Cell Sci.*107:17-27
- Heath C.A. y Magari, S.R.** (1996) Mini-review: mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro. *Biotech. Bioeng.* 50:430- 437
- Healy, C.; Uwanogho, D.; Sharpe, P.T.** (1999) Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn.* 215(1):69-78
- Hedbom, E.; Antonsson, P.; Hjerpe, A.; Aeschlimann, D.; Paulsson, M.; Rosa-Pimentel, E.; Sommarin, Y.; Wendel, M.; Oldberg, A.; Heingård, D.** (1992) Cartilage matrix proteins: An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J.Biol. Chem.* 267: 6132-6136
- Hemler, M.E.; Huang, C.; Schwartz, L.**(1987) The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 weight beta unit. *J Biol Chem.* 262:3300-9
- Hendrickson, D.A.; Nixon, A.J.; Grande, D.A.; Todhunter, R.J.; Minor, R.M.; Erb, H.; Lust, G.** (1994) Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res.* 12: 485-497
- Heng, B.C.; Cao, T.; Lee, E.H.** (2004) Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells.* 22:1152-1167
- Hickok, N.J.;Hass, A. R.; Tuan, R. S.** (1998) Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microscopy Research and Technique.* 43: 174-190
- Hildebrand, A.; Romarís, M.; Rasmussen, L.M.; Heinegård, D.; Twardzik, D.R.; Border, W.A.; Ruoslahti, E.**(1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J.* 302 ( Pt 2):527-34
- Hinsch, K. y Zupanc, G.K.** (2006) Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. *J Neurosci Methods.* 158(1):75-88

- Hocking, A. M.; Shinomura, T.; McQuillan, D.J.**(1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of extracellular matrix. *Matrix. Biol.* 17:1-19
- Holtzer, H.; Abbott, J.; Lash, J.; Holtzer, S.** (1960) The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro, I. Dedifferentiation of cartilage cells. *PNAS.* 46(12):1533-1542
- Holland, T.A.; Tabata, Y.; Mikos, A.G.**(2005) Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Control Release.* 101(1-3):111-25
- Horner, A.; Kemp, P.; Summers, C.; Bord, S.; Bishop, N. J.; Kelsall, A. W.; Coleman, N.; Compston, J. E.** (1998) Expression and Distribution of Transforming Growth Factor- $\beta$  Isoforms and Their Signaling Receptors in Growing Human Bone. *Bone.* 23(2): 95-102
- Horwitz, A.L. y Dorfman A.** (1970) The growth of cartilage cells in soft agar and liquid suspension. *J Cell Biol.* 45(2):434-8
- Hötten, G.C.; Matsumoto, T.; Kimura, M.; Bechtold, R.F.; Kron, R.; Ohara, T.; Tanaka, H.; Satoh, Y.; Okazaki, M.; Shirai, T.; Pan, H.; Kawai, S.; Pohl, J.S.; Kudo, A.** (1996) Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors.* 13(1-2):65-74
- Hoynowski, S.M.; Fry, M.M.; Gardner, B.M.; Leming, M.T.; Tucker, J.R.; Black, L.; Sand, T.; Mitchell, K.E.** (2007) Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 362:347-353
- Hsu, H.P.; Zanella, J.M.; Peckham, S.M.; Spector, M.**(2006) Comparing ectopic bone growth induced by rhBMP-2 on an absorbable collagen sponge in rat and rabbit models. *J Orthop Res.* 24(8):1660-9
- Huang, J.I.; Beanes, S.R.; Zhu, M.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H.; Benhaim, P.** (2002) Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 109: 1033-1041
- Huang, J.I.; Kazmi, N.; Durbhakula, M.M.; Hering, T.M.; Yoo, J.U.; Johnstone, B.** (2005) Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J.Orthop. Res.* 23:1383-1389
- Huang, X.; Yang, D.; Yan, W.; Shi, Z.; Feng, J.; Gao, Y.; Weng, W.; Yan, S.**(2007) Osteochondral repair using the combination of fibroblast growth factor and amorphous calcium phosphate/poly(L-lactic acid) hybrid materials. *Biomaterials.* 28(20): 3091-100
- Huckle, J.; Dootson, G.; Medcalf, N.; McTaggart, S.; Wright, E.; Carter, A.; Schreiber, R.; Kirby, B.; Dunkelman, N.; Stevenson, S.; Riley, S.; Davisson, T.; Ratcliffe, A.** (2003) Differentiated chondrocytes for cartilage tissue engineering. In: *Tissue engineering of cartilage and bone (Novartis Foundation Symposium)*. Editors: Bock G and Goode J. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 249:103-117
- Humphries, M.J.; McEwan, P.A.; Barton, S.J.; Buckley, P. A.;Bella, J.; Mould, A.P.** (2003) Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 28(6):313-320

**Hunzinker, E.B.** (2001) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*. 10:432-463

**Hunziker, E.B.** (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 10: 432-463

**Hunzinker E. B. y Schenk, R.K.** (1984) Cartilage Ultrastructure after High Pressure Freezing, Freeze Substitution, and Low Temperature Embedding.II. Intercellular Matrix Ultrastructure- Preservation of Proteoglycans in Their Native State. *The Journal of Cell Biology*. 98:277-282

**Hunzinker, E. B.; Herrmann, W.; Schenk, R.; K . Mueller, M ; Moor, H.**(1984) Cartilage Ultrastructure after High Pressure Freezing, Freeze Substitution, and Low Temperature Embedding .I. Chondrocyte Ultrastructure-Implications for the Theories of Mineralization and Vascular Invasion. 98(1):267-276

**Hunziker, E.B.; Michel, M.; Studer, D.** (1997) Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. *Microsc Res Tech*.37(4):271-84

**Hynes, R.O.** (1992) Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell*. 69:11-25

**Hynes, R.O.** (1996) Targeted Mutations in Cell Adhesion genes: What Have We Learned from Them? *Development Biology*.180:402-412

**Idrus, R.B.; Chua, K.H.; Sha'Ban, M.; Noruddin, N.A.A.; Saim, A.B.** (2005) Tissue engineered cartilage with different human chondrocytes sources: articular, auricular and nasal septum. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*. 15: 5-12

**Im, G.I.; Shin, Y.W.;Lee, K.B.** (2002) Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 13:845-53

**Iruela-Arispe, M. L.; Liska, D. J.; Sage, E.H.; Bornstein, P.** (1993) Differential expression of thrombospondin 1,2 and 3 during murine. *Dev. Dyn*.197:40-56

**Ishaug-Riley, S.L.; Okun, L.E.; Prado, G.; Applegate, M.A.; Ratcliffe, A.** (1999) Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. *Biomaterials*.20(23-24): 2245-56

**Ishihara, T.; Iwata, T.; Fusutani, H.; Uchino, F.** (1973) Relapsing polychondritis-report of a case with ultrastructural findings of the ear cartilage. *Acta Path. Jap*. 23:577-590

**Isogai, N.; Asamura, S.; Higashi, T.; Ikada, Y.; Morita, S.; Hillyer, J.; Jacquet, R., Landis, W.J.**(2004) Tissue engineering of an auricular cartilage model utilising cultured chondrocyte-poly(L-lactide-ε-caprolactone) scaffolds. *Tissue Engineering*. 10(5/6):673-687

**Isogai, N.; Morotomi, T.; Hayakawa, S.; Munakata, H.; Tabata, Y.; Ikada, Y.; Kamiishi, H.**(2005) Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J Biomed Mater Res A*. 74(3):408-18

**Isogai, N.; Kusuhara, H.; Ikada, Y.; Ohtani, H.; Jacquet, R.; Hillyer, J.; Lowder, E.; Landis, W.J.** (2006) Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Engineering*. 12:691-703

- Iozzo, R. V.** (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Ver Biochem.* (67): 609-652
- Iozzo, R. V.** (2001). Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J. Clin. Invest.* 108:165-167
- Izadpanah, R.; Trygg, C.; Patel, B.; Kriedt, C.; Dufour, J.; Gimble, J.M.; Bunnell, B.A.** (2006) Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 99(5):1285-97
- Izumi, T.M; Scully, S.P.; Heydemann, A.; Bolander, M.E.** (1992) Transforming growth factor beta 1 stimulates type II collagen expression in cultured periosteum-derived cells. *J Bone Miner Res.* 7(1):115-21
- Jackson, D.W. y Simon, T.M.** (1999) Tissue engineering principles in orthopaedic surgery. *Clinical Orthopaedics.* 367S:S31-S45
- Jackson, J.; Kloster, T.; Welniak, L.; Damon, M.; Rehder, B.; Schmechel, B.; Ward, B.; Kessinger, A.** (1992) Peripheral blood-derived stem cells can be successfully cryopreserved without using controlled-rate freezing. *Prog. Clin. Biol. Res.* 377:367-371
- Jackson, D. W.; Scheer, M. J.; Simon, T. M.**(2001) Cartilage Substitutes: Overview of Basic Science and Treatment Options. *J Am Acad Orthop Surg.* 9:37-52
- Jakob, M.; Démarteau, O.; Schäfer, D.; Hintermann, B.; Dick, W.; Heberer, M.; Martin, I.** (2001) Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation *in vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry.* 81:368-377
- James, C.G.;Ulici,V.;Tuckermann, J.; Underhill, T.M.; Beier, F.** (2007) Expression profiling of Dexamethasone-treated primary chondrocytes identifies targets of glucocorticoid signalling in endochondral bone development. *BMC Genomics.*8:205-232
- Jiang, Y.; Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L.; Schwartz, R.E.; Keene, C.D.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W.C.; Largaespada, D.A.; Verfaillie, C.M.** (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418(6893):41-9
- Jones, P.H.; Harper, S.; Watt, F.M.** (1995) Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell.* 80(1):83-93
- Johnson, J.; Shinomura, T.; Eberspaecher, H.; Pinero, G.; de Crombrughe, B.; Höök, M.** (1999) Expression and localization of Pg-Lb/Epiphycan during mouse development. *Dev. Dyn.* 21:499-510
- Johnson, T.S.; Xu, J.W.; Zaporojan, V.V.; Mesa, J.M.; Weinand, C.; Randolph, M.A.; Bonassar, L.J.; Winograd, J.M.; Yaremchuk, M.J.** (2004) Integrative repair of cartilage with articular and nonarticular chondrocytes. *Tissue Engineering.* 10:1308-1315
- Johnstone, B.; Hering, T.M.; Caplan, A.I.; Goldberg, V.M.; Yoo, J.U.** (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 238(1):265-72
- Jones, J.I. y Clemmons, D.R.** (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews.*16:3-34

**Jun, E.S.; Lee, T.H.; Cho, H.H.; Suh, S.Y.; Jung, J.S.**(2004) Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol Biochem.* 14:261-268

**Junqueira, L. C.; Carneiro, J.; Kelley, R. D.**(1998) Chapter 7-Cartilage In: *Basic Histology.* Ninth Edition. Large Medical Book/Macgraw-Hill. 127-133

**Kafienah, W.; Jakob, M.; Démarteau, O.; Frazer, A.; Barker, M.D.; Martin, I.; Hollander, A.P.** (2002) Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Engineering.* 8(5):817-526

**Kaji, E.H. y Leiden, J.M.** (2001) Gene and stem cell therapies. *JAMA.* 285(5):545-50

**Kang, S.K.; Lee, D.H.; Bae, Y.C.; Kim, H.K.; Baik, S.Y.; Jung, J.S.**(2003) Improvement of neurologic deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 183:355-366

**Kaps, C.; Bramlage, C.; Smolian, H.; Haisch, A.; Ungethum, U.; Burmester, G.R.; Sittinger, M.; Gross, G.; Haupl, T.** (2002) Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum.* 46:149-162

**Karande, T.S.; Ong, J.L.; Agrawal, C.M.** (2004) Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. *Ann Biomed Eng.* (12):1728-43

**Katayama, R.; Wakitani, S.; Tsumaki, N.; Morita, Y.; Matsushita, I.; Gejo, R.; Kimura, T.** (2004) Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology.* 43:980-985

**Kato, Y. y Gospodarowicz, D.** (1985), Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth-factor *Journal of Cell Biology.* 100:477-485

**Kato, Y. y Iwamoto, M.** (1990) Fibroblast growth factor is na inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem.* 265:5903-5909

**Katz, A.J.;Tholpady, A.; Tholpady, S.S.; Shang, H.; Ogle, R.C.** (2005) Cell Surface and Transcriptional Characterization of Human Adipose-Derived Adherent Stromal (hADAS) Cells. *Stem Cells.* 23:412-423

**Kaul, G., Cucchiaroni, M.; Arntzen, D.; Zurakowski, D.; Menger, M.D.; Kohn, D.; Trippel, S.B.; Madry, H.** (2006) Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med.* 8:100-111

**Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Kluter, H.; Bieback, K.** (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24(5):1294-301

- Kellner, K.; Schulz, M.B.; Göpferich, A.; Blunk, T.** (2001) Insulin in tissue engineering of cartilage: a potential model system for growth factor application. *Journal of Drug Targeting*. 9:439-448
- Khalafi, A.; Schmid, T.M.; Neu, C.; Reddi, A.H.** (2007) Increased accumulation of superficial zone protein (SZP) in articular cartilage in response to bone morphogenetic protein-7 and growth factors. *J Orthop Res*. 25:193-303
- Kiatpongsan, S.** (2007) From embryonic stem cells to functioning germ cells: science, clinical and ethical perspectives. *J Med Assoc Thai*. 90(10):2233-7
- Kim, S.E.; Park, J.H.; Cho, Y.W.; Chung, H.; Jeong, S.Y.; Lee, E.B.; Kwon, I.C.**(2003a) Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *J Control Release*. 91(3):365-74
- Kim, S.J.; Kim, E.J.; Kim, Y.H.; Hahn, S.B.; Lee, J.W.** (2003b) The Modulation of Integrin Expression by the Extracellular Matrix in Articular Chondrocytes. *Yonsei Medical Journal*. 44 (3):493-501
- Kim, M.H.; Kim, I.; Kim, S-H.; Jung, M.K.; Han, S.; Lee, J.E.; Nam, J-S; Lee, S-K; Bang, S.I.** (2007) Cryopreserved human adipogenic-differentiated pre-adipocytes: a potential new source for adipose tissue regeneration. *Cytotherapy*. 9(5): 468-476
- King, J.A.; Marker, P.C.; Seung, K.J.; Kingley, D.M.** (1994) BMP5 and 6 the molecular, skeletal and soft-tissue alteration short ear mice. *Dev. Biol*. 166(1):112-122
- Kingham, P. J.; Kalbermatten, D.F.; Mahay, D; Armstrong,S.J.; Wiberg,M.; Terenghi,G.** (2007) Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology*. 207: 267–274
- Kipnes, J.; Calberg, A. L.; Loredó, G. A.; Lawler, J.; Tuan, R. S.; Hall, D. J.** (2003) Effect of cartilage oligomeric matrix protein on mesenchyma chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 11(6):442-454
- Klein, T.J.; Schumacher, B.L.; Schmidt, T.A.; Li, K.W.; Voegtline, M.S.; Masuda, K.; Thonar, E.J.M.A.; Sah, R.L.** (2003) Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations. *Osteoarthritis and Cartilage*. 11:595–602
- Kleffens, V.; Groffen, C.; van Neck, J.W.; Vermeij-Keers, C.; Drop, S.L.S**(1999) Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev*. 80:159-170
- Knippenberg, M.; Helder, M.N.; Zandieh, D. B.; Wuisman, P.I.; Klein-Nulend, J.** (2006) Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 342(3):902-8
- Knudson, C.B. y Tool, B. P.** (1987) Hyaluronate-cell interactions during differentiation of chick embryo limb mesoderm. *Development Biology*.124:82-90
- Knudson, C. B. y Knudson, W.** (2001) Cartilage proteoglycans. *Cell & Development Biology*. 12: 69-78
- Knudson, W. y Loeser, R.F.** (2002) CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci*. 59:36-44

- Knudson, W.; Aguiar, D.J.; Hua, Q.; Knudson, C.B.** (1996) CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis. *Exp. Cell Res.* 228:216-228
- Koch, T.G. y Betts, D.G.** (2007) Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model. *Expert Opin. Biol. Ther.* 7(11):1-6
- Koller, M.R.; Bender, J.G.; Papoutsakis, E.T.; Miller, W.M.** (1992) Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood.* 80:403-411
- Kondo, M.; Wagers, A.J.; Manz, M.G.; Rohaska, S.S.; Scherer, D.C.; Beilhack, G.F.; Shizuru, J.A.; Weissman, I.L.** (2003) Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annu ver Immunol.* 21:759-806
- Kose, G.T.; Korkusuz, F.; Ozkul, A.; Soysal, Y.; Ozdemir, T.; Yildiz, C.; Hasirci, V.** (2005) Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials.* 26:5187-5197
- Kostović-Knezević, L.; Bradamante, Z.; Svajger, A.** (1981) Ultrastructure of elastic cartilage in the rat external ear. *Cell Tissue Res.* 218(1):149-60
- Kukekov, V.G.; Laywell, E.D.; Suslov, O.; Davies, K.; Scheffler, B.; Thomas, L.B.; O'Brien, T.F.; Kusakabe, M.; Steindler, D.A.** (1999) Multipotent Stem/Progenitor Cells with Similar Properties Arise from Two Neurogenic Regions of Adult Human Brain. *Exp Neurol.* 156(2):333-44
- Kulyk, W.M.; Upholt, W.B.; Kosher, R.A.** (1989) Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development.* 106(3):449-455
- Kuo, C.K. y Ma, P.X.** (2001) Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials.* 22(6):511-21
- Kuroda, R.; Ishida, K.; Matsumoto, T.; Akisue, T.; Fujioka, H.; Mizuno, K.; Ohgushi, H.; Wakitani, S.; Kurosaka, M.** (2007) Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 15(2):226-31
- Kurth, T.; Hedbom, E.; Shintani, N.; Sugimoto, M.; Chen, F.H.; Haspl, M., Martinovic, S.; Hunziker, E. B.** (2007) Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *OsteoArthritis and Cartilage.* 15:1178-1189
- Kurtis, M.S.; Srchmidt, T.A.; Bugbee, W.D.; Loeser, R.F.; Sah, R.F.** (2003) Integrin-Mediated Adhesion of human Articular Chondrocytes to Cartilage. *Arthritis & Rheumatism.* 48(1):110-118
- Kuznetsov, S.A.; Krebsbach, P.H.; Satomura, K.; Kerr, J.; Riminucci, M.; Benayahu, D.; Robey, P.G.** (1997) Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after the transplantation in vivo. *J. Bone Min. Res.* 12:1335-1347
- Lafont, J.E.; Talma, S.; Hopfgarten, C.; Murphy, C.L.** (2008) Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 283(8):4778-86
- Lakkakorpi, J.; Li, K.; Decker S.; Korkeela, E.; Piddington, R.; Abrams, V.; Bashir, M.; Uitto, J.; Rosenbloom, J.** (1999) Expression of elastin promoter in novel tissues cites in transgenic mouse embryos. *Conect. Tissue Res.* 40(2):155-162



**Lama, V.N.; Smith, L.; Badri, L.; Flint, A.; Andrei, A.C.; Murray, S.; Wang, Z.; Liao, H.; Toews, G.B.; Krebsbach, P.H.; Peters-Golden, M.; Pinsky, D.J.; Martinez, F.J.; Thannickal, V.J.** (2007) Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest.* 117(4): 989-96

**Langer, R.S. y Vacanti, J.P. (1999)** Tissue engineering: The challenges ahead. *Scientific American.* 280:86-89

**LeBaron, R.G. y Athanasiou, K.A.** (2000) Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials.* 21(24):2575-87

**Lee, R.B. y Urban, J.P.** (1997) Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J.* 321 (1):95-102

**Lee, G.M. y Loeser, R.F.** (1998) Interactions of the chondrocytes with its pericellular matrix. *Cells and Materials.* 8:135-149

**Lee, C.R.; Breinan, H.A.; Nehrer, S.; Spector, M.** (2000) Articular cartilage chondrocytes in Type I and Type II collagen-GAG matrices exhibit contractile behaviour *in vitro*. *Tissue Engineering.* 6(5):555-565

**Lee, J. W.; Kim, Y. H.; Park, K. D.; Jee, K. S.; Shin, J. W.; Hahn, S. B.** (2004a) Importance of integrin b1-mediated cell adhesion on biodegradable polymers under serum depletion in mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Biomaterials.* 25:1901-1909

**Lee, R.H.; Kim, B.; Choi, I.; Kim, H.; Choi, H.S.; Suh, K.; Bae, Y.C.; Jung, J.S.**(2004b) Characterization and expresión analisis of mesenchymal ítem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 14(4-6):311-24

**Lefebvre, V. y Li, P.** (1998) A new long form of Sox-5 (L-Sox-5), Sox6 e Sox 9, are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *The Emb. Journal.* 17(19): 5718-5733

**Lennon, D.P. ; Edmison, J.M. ; Caplan, A.I.** (2001) Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol.* 187:345-355

**Leonard, C.M.; Bergman, M.; Frenz, D.A.; Macreery, L.A.; Newman, S.A.** (1989) Abnormal ambient glucose levels inhibit proteoglycan core protein gene expression and reduce proteoglycan accumulation during chondrogenesis: Possible mechanism for teratogenic effects of maternal diabetes. *Proc Natl Acad Sci.* 86:10113-10117

**LeRoux, M.A.; Arokoski, J.P.; Vail, T.P.; Guilak, F.; Hyttinen, M.M.; Kiviranta, I.; Setton, L.A.** (2000) Simultaneous changes in the mechanical properties, quantitative collagen organization, and proteoglycan concentration of articular cartilage following canine meniscectomy. *J Orthop Res.* 18:383-392

**Li, Y.; Tew, S.R.; Russell, A.M.; Gonzalez, K.R.; Hardingham, T.E.;Hawkins, R.E.** (2004) Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. *Tissue Engineering.* 10:575-584

**Lidagoster, M.I.; Cinelli, P.B.; Leveé, E.M.; Sian, C.S.**(2000) Comparison of autologous fat transfer in fresh, refrigerated, and frozen specimens: an animal model. *Ann Plast Surg.* 44(5):512-5

- Lindenhayn, K.; Perka, C.; Spitzer, R.; Heilmann, H.; Pommerening, K.; Mennicke J.; Sittinger, M.** (1999) Retention of hyaluronic acid in alginate beads: aspects for *in vitro* cartilage engineering. *J Biomed Mater Res.* 44(2):149-55
- Litzke, L.F.; Wagner, E.; Baumgaertner, W.; Hetzel, U.; Josimović-Alasević; Libera, J.** (2004) Repair of Extensive Articular Cartilage Defects in Horses by Autologous Chondrocyte Transplantation. *Annals of Biomedical Engineering.* 32(1):57-69
- Liu, H.; McKenna, L.A.; Dean, M.** (1997) An N-terminal peptide from link protein stimulates synthesis of cartilage proteoglycans. *Biochem Soc Trans.* 25(3):427S
- Liu, H.; Lee, Y.W.; Dean, M. F.** (1998) Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads. *Biochim. Biophys. Acta.* 1425:505-515
- Liu, T.M.; Martina, M.; Hutmacher, D.W.; Hoi, J.; Hui, P.; Lee, E.H.; Lim, B.** (2006) Identification of common pathways mediating Differentiation of Bone Marrow and adipose tissue derived human Mesenchymal stem cells (MSCs) into Three Mesenchymal Lineages. 25(3):750-760
- Locker, M.; Kellermann, O.; Boucquey, M.; Khun, H.; Huerre, M.; Poliard, A.** (2004) Paracrine and Autocrine Signals Promoting Full Chondrogenic Differentiation of a Mesoblastic Cell Line. *J Bone Miner Res.* 19:100-110
- Lodish, H.; Baltimore, D.; Bark, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Darnell, J.** (1995) Multicellularity: cell-cell and cell-matrix interactions. In: *Molecular Cell Biology.* 3<sup>rd</sup> Edition, Scientific American Books. 1126-1136
- Loeser, R.F.** (1997) Differential Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 and Transforming Growth Factor  $\beta$  on  $\alpha 1\beta 1$  Integrin Expression and Chondrocyte Adhesion to Type VI Collagen. *Arthritis & Rheumatism.* 40(2):270-276
- Loeser, R.F.** (2000) Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology.* 37:109-116
- Loeser, R.F.** (2002) Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology.* 39:119-124
- Loeser, R.F.; Carlson, C.S.; McGee, M.P.** (1995) Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp. Cell Res.* 217:248-257
- Loeser, R.F.; Sadiev, S.; Tan, L.; Goldring, M.B.** (2000) Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen. *Osteoarthritis and Cartilage.* 8:96-105
- Loeser, R.F.; Forsyth, C.B.; Samarel, A. M.; Im, H-J** (2003) Fibronectin Fragment Activation of Proline-rich Tyrosine Kinase PYK2 Mediates Integrin Signals Regulating Collagenase-3 Expression by Human Chondrocytes through a Protein Kinase C-dependent Pathway. *The Journal of Biological Chemistry.* 278(27):24577-24585
- Loeser, R.F.; Chubinskaya, S.; Pacione, C.; Im, H.J.** (2005) Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 52:3910-3917

- Lohmander, L. S.; Saxne, T.; Heinegard, D. K.**(1994) Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann. Rheumat.Dis.* 53:8-13
- Longobardi, L.; O'Rear, L.; Aakula, S.; Johnstone, B.; Shimer, K.; Chytil, A.; Horton, W.A.; Moses, H.L.; Spagnoli, A.** (2006) Effect of IGF-I in the Chondrogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Presence or Absence of TGF- $\beta$  Signaling. *Journal Of Bone And Mineral Research.* 21(4): 626-636
- Loty, S.; Foll, C.; Forest, N.; Sautier, J-M** (2000) Association of enhanced expression of gap junctions with in vitro chondrogenic differentiation of rat nasal septal cartilage-released cells following their dedifferentiation and redifferentiation. *Arch. Oral Biol.*45:843-856
- Lu, P.; Blesch, A.; Tuszynski, M.H.** (2004) Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77:174-191
- Lucic, D.; Mollenhauer, J.; Kilpatrick, K.E.; Cole, A.A.**( 2003) N-telopeptide of type II collagen interacts with annexin V on human chondrocytes. *Connect Tissue Res.* 44(5):225-39
- MacDonald, M. E. y Hall, B. K.** (2001) Altered timing of the extracellular-matrix-mediated epithelial-mesenchymal interaction that initiates mandibular skeletogenesis in three inbred strains of mice: development, heterochrony, and evolutionary changes in morphology. *Journal of Experimental Zoology.* 291: 258-273
- Mackie, E. J.; Thesleef, I.; Chiquet-Ehrismann, R.** (1987) Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J. Cell Biol.* 105: 2569-2579
- Mackie, E. J. y Murphy, A. L.** (1998) The role of tenascin- C and related glycoproteins in early chondrogenesis. *Microscopy Research and Technique.* 43: 102-110
- Madsen, K.; von der Mark, K.; van Menzel, M.; Friberg, U.** (1984) Analysis of collagen types synthesized by rabbit ear cartilage chondrocytes *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* 221:189-196
- MacRae, J.W.; Tholpady, S.S.; Ogle, R.C.; Morgan, R.F.**(2004) Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation. *Ann Plast Surg.* 52(3):281-2
- Maeda, H.; Hotta, T.; Yamada, H.** (1986) Enhanced colony formation of human hemopoietic stem cells in reduced oxygen tension. *Exp. Hematol.* 14:930-934
- Malda, J.; van Blitterswijk, C.A.; van Geffen, M.; Martens, D.E.; Tramper, J.; Riesle, J.**(2004) Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 12(4):306-13
- Malda, J.; Woodfield, T.B.F.; van der Vloodt, F.; Wilson, C.; Martens, D.E.; Tramper, J.; van Blitterswijk, C.A.; Riesle, J.** (2005) The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage. *Biomaterials.* 26:63-72
- Maissen, O.; Eckhardt, C.; Gogolewski, S.; Glatt, M.; Arvinte, T.; Steiner, A.; Rah, B.; Schlegel, U.**(2006) Mechanical and radiological assessment of the influence of rhTGFbeta-3 on bone regeneration in a segmental defect in the ovine tibia: pilot study. *J Orthop Res.* 24(8):1670-8

**Malouf, N.N.; Coleman, W.B.; Grisham, J.W.; Lininger, R.A.; Madden, V.J.; Sproul, M.; Anderson, P.A.** (2001) Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart *in vivo*. *Am J Pathol.* 158(6):1929-35

**Mancilla, E.E.; de Luca, F.; Uyeda, J.A.; Czerwiec, F.S.; Baron, J.** (1998) Effects of fibroblast growth factor -2 on longitudinal bone growth. *Endocrinology.* 139(6):2900-2904

**Mandl, E.W.; van der Veen, S.W.; Verhaar, J.A.N.;van Osch, G.J.V.M.** (2002) Serum-free medium supplemented with high-concentration FGF-2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity. *Tissue Engineering.* 8(4):573-580

**Mann, B.K.; Gobin, A.S.; Tsai, A.T.; Schmedlen, R.H; West, J.L.**(2001) Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials.* 22(22):3045-51

**Marcacci, M.; Berruto, M.; Brocchetta, D.; Delcogliano, A.; Ghinelli, D.; Gobbi, A.; Kon, E.; Pederzini, L.; Rosa, D.; Sacchetti, G.L.; Stefani, G.; Zanasi, S.** (2005) Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res.* (435):96-105

**Marler, J.J.; Upton, J.; Langer, R.; Vacanti, J.P.**(1998) Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 33:165-182

**Mark, S. y Baldwin, S.P.** (1998) Materials for protein delivery in tissue engineering. *Adv Drug Delivl Rev.* 33(1-2):71-86

**Marijnissen, W.J.C.M.; van Osch, G.J.V.M.; Aigner, J.; Verwoerd-Verhoef H.L.; Verhaar, J.A.N.** (2000)Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined *in vivo* with a synthetic (E210) or biological biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials.* 21:571-580

**Martin, I.; Padera, R.F.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G.; Freed, L.E.** (1998) *In vitro* differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells in cartilaginous and bone-like tissues. *Journal of Orthopaedic Research.* 16:181-189

**Martin, I.; Vunjak-Novakovic, G.; Yang, J.; Langer, R., Freed, L.E.** (1999) Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue. *Experimental Cell Research.* 253:681-688

**Martin, I; Wendt, D.; Heberer, M.** (2004) The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology.* 22(2):80-86

**Martin, J.A. y Buckwalter, J.A.**(2000) The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology.* 37(1-2):129-40

**Martinek, V.; Ueblacker, P.; Imhoff, A.B.** (2003) Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg.* 85(6):782-788

**Märtson, M.; Viljanto, J.; Hurme, T.; Saukko, P. (1998)** Biocompatibility of cellulose sponge with bone. *Eur Surg Res.* 30(6):426-32

**Marx, J.** (2003) Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science.* 301: 1308-10

**Mason, R.M.** (1981) Recent advances in the biochemistry of hyaluronic acid in cartilage. *Connective Tissue Research: Chemistry, Biology, and Physiology*. Alan R. Liss, Inc., New York. 87-112

**Masuda, K; Sah, R.L.; Hejna, M.J.; Thonar, E.J.M.A.** (2003) A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *Journal of Orthopaedic Research*. 21:139-148

**Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Quarto, R.** (2001) Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 9:36-40

**Mathews, C. K. y van Hold, K. E.** (1996) The three-dimensional structure of proteins. In: *Biochemistry*, 2<sup>a</sup> Edition, Benjamin/Cummings Publishing Company. 178-180

**Mauck, R.L.; Soltz, M.A.; Wang, C.C.B.; Wong, D.D.; Chao, P.H.G.; Valhmu, W.B.; Hung, C.T.; Ateshian, G.A.** (2000) Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*. 122:252-260

**McCoy, J.P.; Schade, W.J.; Siegle, R.J.; Waldinger, T.P.; Vanderveen, E.E.; Swanson, N.A.** (1985) Characterization of the humoral immune response to bovine collagen implants. *Arch Dermatol*. 121(8):990-4

**McDevitt, C.A. y Webber, R.J.** (1990) The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop*. 252:8-18

**McGlashan, SR; Haycraft, CJ; Jensen, CG; Yoder, B.K.; Poole, C.A.** (2007) Articular cartilage and growth plate defects are associated with chondrocyte cytoskeletal abnormalities in Tg737orpk mice lacking the primary cilia protein polaris. *Matrix Biol*. 26(4):234-46

**McGlashan, S.R.; Jensen, C.G.; Poole, C.A.** (2006) Localization of extracellular matrix receptors on the chondrocyte primary cilium. *J Histochem Cytochem*. 54(9):1005-14

**McIntosh, K.; Zvonic, S.; Garrett, S.; Mitchell, J.B.; Floyd, Z.E.; Hammill, L.; Kloster, A.; Di Halvorsen, Y.; Ting, J.P.; Storms, R.W.; Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X.; Gimble, J.M.** (2006) The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 24(5):1246-53.

**Mcqueeny, K. y Dealy, C.N.** (2001) Roles of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding protein-2 (IGFBP2) and -5(IGFBP5) in developing chick limbs. *Growth Hormone & IGF Research*. 11:346-363

**McQuillan, D.J.; Handley, C.J., Campbell, M.A.; Bolis, S.; Milway, V.E.; Herington, A.C.** (1986) Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem J*. 240(2):423-30

**Meachim, G. y Stockwell, R.A.** (1979) The matrix. In: *Adult Articular Cartilage*, 2<sup>nd</sup> (ed. Freeman MAR), Tunbridge Wells: Pitman Medical. 1-67

**Mehlhorn, A.T.; Niemeyer, P.; Kaiser, S.; Finkenzeller, G.; Stark, G.B.; Südkamp, N.P.; Schmal, H.** (2006) Differential Expression Pattern of Extracellular Matrix Molecules During Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue. *Tissue Engineering*. 12(10):2853-2862

**Mesa, J. M.; Zaporozhan, V.; Weinand, C.; Johnson, T.S.; Bonassar, L.; Randolph, M.A.; Yaremchuk, M.J.; Butler, P.E.** (2006) Tissue engineering cartilage with aged articular chondrocytes in vivo. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 118: 41–49

**Messner, K.** (1993) Hydroxylapatite supported Dacron plugs for repair of isolated full-thickness osteochondral defects of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluations from 6-48 weeks. *J. Biomed Mater Res*. 27:1527-1532

**Messner, K.** (1994) The concept of a permanent synthetic meniscus prosthesis: a critical discussion after 5 years of experimental investigations using Dacron and Teflon implants. *Biomaterials*.15:243-250

**Messner, K. y Gillquist, J.** (1993) Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: a biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. *Biomaterials*.14:513-521

**Messner, K.; Lohmander, L.S.; Gillquist, J.** (1993) Neocartilage after artificial cartilage repair in the rabbit: histology and proteoglycan fragments in joint fluid. *J. Biomed. Mater Res*. 27:949-954

**Metzler, D. E.** (2001) Chapter 8- Lipids, membranes and cell coats. In- *Biochemistry- The chemical reactions of living cells*. Second edition- Volume 1, Academic Press/Harcourt. 432-440

**Middleton, J.C. y Tipton, A.J.**( 2000) Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 21(23):2335-46

**Midwood, K.S. y Salter, D.M.** (2001) NG2/HMPG modulation of human articular chondrocyte adhesion to type VI collagen is lost in osteoarthritis. *J Pathol*.195(5):631-5

**Milasincic, D.J.; Calera, M.R.; Farmer, S.R.; Pilch, P.F.** (1996) Stimulation of C2C12 myoblast growth by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Mol Cell Biol*.16(11):5964-73

**Minguell, J.J.; Erices, A.; Conget. P.** (2001) Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med*. 226(6):507-20

**Minina, E.; Kreschel, C.; Naski, M.C.; Ornitz, D.M.; Vortkamp, A.** (2002) Interaction of FGF, Ihh/PTHrP, and BMP signaling integrate chondrocyte proliferation and hipertrophic differentiation. *Dev. Cell*.3(3):439-449

**Miot, S.; Woodfield, T.; Daniels, A.U.; Suetterlin, R.; Peterschmitt, I.; Heberer, M.; van Blitterswijk, C.A.; Riesle, J.; Martin, I.** (2005) Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials*. 26: 2479–2489

**Miranville, A.; Heeschen, C.; Sengenès, C.; Curat, C.A.; Busse, R.; Bouloumié, A.** (2004) Improvement of Postnatal Neovascularization by Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Circulation*.10:349-355

**Miralles, G.; Baudoin, R.; Dumas, D.; Baptiste, D.; Hubert, P.; Stoltz, J.F.; Dellacherie, E.; Mainard, D.; Netter, P.; Payan, E.** (2001) Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: *in vitro* engineering of cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research*. 57:268-278

- Mitchell, J.B.; McIntosh, K.; Zvonic, S.; Garrett, S.; Floyd, Z.E.; Kloster, A.; Halvorsen, Y.I.; Storms, R.W., Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X.; Gimble, J.M.** (2006) Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells*. 24:376-385
- Miura, T. y Shiota, K.** (2000) TGFbeta2 acts as an "activator" molecule in reaction-diffusion model and is involved in cell sorting phenomenon in mouse limb micromass culture. *Dev Dyn*. 217(3):241-9
- Miura, M.; Gronthos, S.; Zhao, M.; Lu, B.; Fisher, L.W.; Robey, P.G.; Shi, S.** (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(10):5807-12
- Mizuno, S.; Allemann, F.; Glowacki, J.** (2001) Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges. *J Biomed Mater Res*. 56(3):368-75
- Mizuno, H.; Zuk, P.A.; Zhu, M.; Lorenz, H.P.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H.** (2002) Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg*. 109:199-209
- Miosge, N.; Flachsart, K.; Goetz, W.; Schultz, W.; Kresse, H.; Herken, R.** (1994) Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *Histochemical Journal*. 26:939-945
- Mobasheri, A.; Carter, S.D.; Martin-Vasallo, P.; Shakibaei, M.** (2002) Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int*. 26:1-18
- Mongiat, M.; Otto, J.; Oldershaw, R.; Ferrer, F.; Sato, J.D.; Iozzo, R.V.** (2001) Fibroblast growth factor-binding protein is a novel partner for perlecan protein core. *J Biol Chem*. 276(13):10263-71
- Montembault, A.; Tahiri, K.; Korwin-Zmijowska, C.; Chevalier, X.; Corvol, M.T.; Domard, A.** (2006) A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie*. 88(5): 551-64
- Moore, E.E.; Bendele, A.M.; Thompson, D.L.; Littau, A.; Waggle, K.S.; Reardon, B.; Ellsworth, J.L.** (2005) Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model for injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 13: 623-631
- Mootha, V.K.; Lindgren, C.M.; Eriksson, K.F.; Subramanian, A.; Sihag, S.; Lehar, J.; Puigserver, P.; Carlsson, E.; Ridderstrale, M.; Laurila, E.; et al.** (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 34(3):267-273
- Moreland, L.W.** (2003) Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther*. 5(2):54-67
- Morris, N.P.; Oxford, J.T.; Davies, G.B.; Smoody, B.F.; Keene, D.R.** (2000) Developmentally regulated alternative splicing of the alpha1(XI) collagen chain: spatial and temporal segregation of isoforms in the cartilage of fetal rat long bones. *J Histochem Cytochem*. 48(6):725-41
- Moskalewski, S.** (1976) Elastic fiber formation in monolayer and organ cultures of chondrocytes isolated from auricular cartilage. *Am J Anat*. 146(4):443-8

**Mueller, S.M.; Shortkroff, S.; Schneider, T.O.; Breinan, H.A.; Yannas, I.V.; Spector, M.** (1999) Meniscus cells seeded into type I and type II collagen-GAG matrices in vitro. *Biomaterials*. 20:701-709

**Müller, F.A.; Müller, L.; Hofmann, I.; Greil, P.; Wenzel, M.M.; Staudenmaier, R.** (2006) Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*.27(21):3955-63

**Murphy, C.L. y Sambanis A.** (2001) Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng*. 7:791-803

**Nakahara, H.; Bruder, S.P.; Haynesworth, S.E.; Holecek, J.J.; Baber, M.A., Goldberg, V.M.; Caplan, A.I.** (1990) Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*. 11(3):181-8

**Naumann, A.; Dennis, J.E.; Awadallah, A.; Carrino, D.A.; Mansour, J.M., Kastenbauer, E.; Caplan, A.I.** (2002) Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*. 50(8):1049-58

**Naumann, A.; Aigner, J.; Staudenmaier, R.; Seemann, M.; Bruening, R.; Englmeier, K.H.; Kadedge, G.; Pavesio, A.; Kastenbauer, E.; Berghaus, A.**(2003) Clinical aspects and strategy for biomaterial engineering of an auricle based on three-dimensional stereolithography. *Eur Arch Otorhinolaryngol*.260(10):568-75

**Nehrer, S.; Breinan, H.A.; Ramappa, A.; Hsu, H.P.; Minas, T.; Shortkroff, S.; Sledge, C.B.; Yanas, I.V.; Spector, M.** (1998) Chondrocyte seeded collagen matrices implanted in chondral defect in a canine model. *Biomaterials*. 19:2313-2328

**Neuhuber, B.; Gallo, G.; Howard, L.; Kostura, L.; Mackay, A.; Fischer, I.** (2004) Reevaluation of *in vitro* differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res*. 77:192-204

**Neves, A.A.; Medcalf, N.; Brindle, K.M.**(2005) Influence of stirring-induced mixing on cell proliferation and extracellular matrix deposition in meniscal cartilage constructs based on polyethylene terephthalate scaffolds. *Biomaterials*.26(23):4828-36

**Nicoll, S.B.; Wedrychowska, A.; Smith, N.R.; Bhatnagar, R.S.** (2001) Modulation of proteoglycan and collagen profiles in human dermal fibroblasts by high density micromass culture and treatment with lactic acid suggests change to a chondrogenic phenotype. *Connect Tissue Res*. 42:59-69

**Nielsen, E.H.** (1976) The elastic cartilage in the normal rat epiglottis. I. Fine structure. *Cell Tissue Res*. 173(2):179-91

**Nielson, E.H. y Bytzer P.** (1979) High resolution scanning electron microscopy of elastic cartilage.129(4):823-831

**Nimni, M.E.** (1997) Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*.18(18):1201-25

**Ning, H.; Lin, G.; Fandel, T; Banie, L.; Lue, T.F.; Lin, C-S** (2007) Insulin growth factor signaling mediates neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Differentiation*.En prensa



- Nishiyama, A.; Dahlin, K.J.; Prince, J.T.; Johnstone, S.R.; Stallcup, W.B.** (1991) The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *J Cell Biol.* 114(2):359-71
- Nordahl, J; Andersson, G; Reinholt, FP** (1998) Chondroclasts and osteoclasts in bones of young rats: comparison of ultrastructural and functional features. *Calcif Tissue Int.* 63(5): 401-408
- Noho, T.; Ishikawa, T.; Saito, T.; Hosokawa, K.; Noji, S.; Wolsing, D.H.; Rosenbaum, J.S.** (1995) Identification of human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *The Journal of Biological Chemistry.* 270(38):22522-22526
- Noth, U.; Osyczka, A.M.; Tuli, R.; Hickok, N.J.; Danielson, K.G.; Tuan, R.S.** (2002) Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res.* 20(5):1060-9
- Noden, D.M. y Delahunta, A.** (1990) Organización de los embriones de los vertebrados/Desarrollo das extremidades In: *Embriología de los animales domésticos.* Editorial Acribia, S.A., 1ª edición española. Zaragoza. 11-21 y 213 a 215
- Ochi, M.; Uchio, Y.; Kawasaki, K.; Wakitani, S.; Iwasa, J.**(2002) Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br.*84(4):571-8
- O'Driscoll, S. W.; Saris, D. B.; Ito, Y;** (2001) The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res.* 19(1): 95-103
- Oedayrajsingh-Varma, M.J.; van Ham, S.M., Knippenberg, M.; Helder, M.N.; Klein-Nulend, J.; Schouten, T.E.; Ritt, M.J.; van Milligen, F.J.** (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy.* 8(2):166-77
- Oh, S.H.; Park, I.K.; Kim, J.M.; Lee, J.H.**(2007) In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials.* 28(9):1664-71
- Ohya, Y. y Watanabe, K.** (1994) Control of growth and differentiation of chondrogenesis of chondrogenic fibroblasts of soft agar culture: role of basic fibroblast growth factor and transforming growth- $\beta$ . *Zool. Sci.*11:261-267
- Oliveira, J.T.; Crawford, A.; Mundy, J.M.; Moreira, A.R.; Gomes, M.E.; Hatton, P.V.; Reis, R.L.**(2007) A cartilage tissue engineering approach combining starch-polycaprolactone fibre mesh scaffolds with bovine articular chondrocytes. *J Mater Sci Mater Med.* 18(2):295-302
- Ornitz, D.M.** (2005) FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:205-213
- O'Shea, K. S. y Dixit, V. M.** (1988) Unique distribution of the extracellular matrix component thrombospondin in the developing mouse embryo. *J. Cell. Biol.* 107: 2737-2748
- Oshina, H.; Sotome, S.; Yoshii, T.; Torigoe, I.; Sugata, Y.; Maehara, H.; Marukawa, E.; Omura, K.; Shinomiya, K.** (2007) Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Bone.* 41:575-583

- Ostergaard, K.; Salter, D.M.; Peterson, J.; Bendtzen, K.; Hvolris, J.; Andersen, C.B.** (1998) Expression of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the integrin superfamily in articular cartilage from macroscopically normal and osteoarthritic human femoral heads. *Ann.Rheum.Dis.*57:303-308
- Otte, P.** (1991) Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol.* 50: 304–312
- Pacifi, M.; Koyama, E.; Iwamoto, M.** (2005) Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 75:237-248
- Prabaharan, M.; Rodriguez-Perez, M.A.; de Saja, J.A.; Mano, J.F.**(2007) Preparation and characterization of poly(L-lactic acid)-chitosan hybrid scaffolds with drug release capability.*J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*81(2):427-34
- Panossian, A.; Ashiku, S.; Kirchhoff, C.H.; Randolph, M.A.; Yaremchuk, M.J.** (2001) Effects of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue engineering. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 108:392–402
- Paratore, C. y Sommer, L.** (2006) Chapter 1. Stem cells.*Cell Signaling and Growth Factors in Development.* Edited by K. Unsicker and K. Kriegstein Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 3-37
- Parsch, D.; Fellenberg, J.; Brummendorf, T.H.; Eschlbeck, A.M.; Richter, W.** (2004). Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J. Mol. Med.* 82:49–55
- Park, S.S. y Ward, M.J.** (1995) Tissue-engineered cartilage for implantation and grafting. *Facial Plast Surg.*11:278-83
- Park, H.; Temenoff, J.S.; Holland, T.A.; Tabata, Y.; Mikos, A.G.**(2005a) Delivery of TGF- $\beta$ 1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications.*Biomaterials.* 26(34):7095-103
- Park, Y.; Sugimoto, M.; Watrin, A.; Chiquet, M.; Hunziker, E. B.**(2005b) BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *OsteoArthritis and Cartilage.* 13: 527-536
- Parks, W.C.; Roby, J.D.; Wu, L.C.; Grosso, L.E.** (1992) Cellular expression of tropoelastin mRNA splice variants. *Matrix.* 12(2):156-162
- Patwari, P.; Cook, M.N.; DiMicco, M.A.; Blake, S.M.; James, I.E.; Kumar, S.; Cole, A.A.; Lark, M.W.; Grodzinsky, A.J.**(2003) Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines.*Arthritis Rheum.*48(5):1292-301
- Perbal, B.** (2004) CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet.* 363:62-64
- Pfander, D.; Cramer, T; Deuerling, D.; Weseloh,G.; Swoboda, B.** (2000) Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis.* 59:448–454

- Pfander, D.; Heinz, N.; Rothe, P.; Carl, H-D.; Swoboda, B.** (2004) Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1b: a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*.63: 240-244
- Phornphutkul, C.; Wu, K.Y.; Gruppuso, P.A.** (2006) The role of insulin in chondrogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 249(1-2):107-15
- Pittinger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, D.W.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R.** (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147
- Planat-Benard, V.; Silvestre, J.S.; Cousin, B.; André, M.; Nibbelink, M.; Tamarat, R.; Clergue, M.; Manneville, C.; Saillan-Barreau, C.; Duriez, M.; Tedgui, A.; Levy B.; Pénicaud, L.; Casteilla, L.** (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 109(5):656-63
- Poliard, A.; Nifuji, A.; Lamblin, D.; Plee, E.; Forest, C.; Kellermann, O.** (1995) Controlled conversion of an immortalized mesodermal progenitor cell towards osteogenic, chondrogenic, or adipogenic pathways. *J Cell Biol*. 130:1461-1472
- Podskubka, A.; Povýsil, C.; Kubes, R.; Sprindrich, J.; Sedláček, R.** (2006) Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation on a hyaluronic Acid ester scaffolds (Hyalograft C). *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 73(4):251-63
- Ponticiello, M.S.; Schinagl, R.M.; Kadiyala, S.; Barry, F.P.** (2000) Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res*. 52:246-255
- Poole, C.A.** (1992) Chondrons: The chondrocyte and its pericellular microenvironment. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis* Editeres: Kuettner K.E., Schleyerbach, R., Peyron, J.G.; Hascall, V.C., New York, London: Academic Press
- Poole, C.A.** (1997) Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*. 191(1):1-13
- Poole, C.A.; Flintand, M. H.; Beaumont, B.W.** (1984) Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J. Anat.* (1):113-138
- Poole, C.A.; Flint, M.H.; Beaumont, B.W.** (1988) Chondrons extracted from canine tibial cartilage: Preliminary report on their isolation and structure. *J. Orthop. Res*. 6:408-19
- Poole, C.A.; Gilbert, R.T.; Herbage, D.; Hartmann, D.J.** (1997) Immunolocalization of type IX collagen in normal and spontaneously osteoarthritic canine tibial cartilage and isolated chondrons. *Osteoarthritis Cartilage*.5(3):191-204
- Poole, C.A.; Zhang, Z.; Ross, J.** (2001) The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha-tubulin in microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J. Anat*. 199:393-405
- Praul, C.A.; Ford, B.C.; Leach, R.M.** (2002) Effect of fibroblast growth factors 1, 2,4,5, 6,7,8,9, and 10 on avian chondrocyte proliferation. *J Cell Biochem*. 84:359-366

- Prentice, DA.** (2004) The president's council on bioethics: adult stem cells. *HEC Forum*.18 (2)99-107
- Prichard HL, Reichert WM, Klitzman B.**(2007) Adult adipose-derived stem cell attachment to biomaterials. *Biomaterials*. 28(6):936-46
- Puelacher, W.C., Kim, S.W., Vacanti, J.P., Schloo, B., Mooney, D., Vacanti, C.A.** (1994) Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 23:49-53
- Puissant,B.; Barreau,C.;Bourin,P.; Clavel,C.; Corre,J.; Bousquet, C.; Taureau, C.; Cousin, B.; Abbal, M.; Laharrague, P.; Penicaud, L.; Casteilla, L.; Blancher, A.**(2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 129 (1):118-129
- Pulai, J.I.; del Carlo, M.; Loeser, R.F.** (2002) The  $\alpha 5\beta 1$  Integrin Provides Matrix Survival Signals for Normal and Osteoarthritic Human Articular Chondrocytes In Vitro. *Arthritis & Rheumatism*. 46(6):1528-535
- Rada, T.; Gomes, M.E.; Reis R.L.** (2007) Novel Adipose Stem Cells (ASC) Isolation Methods, *TERMIS NA 2007 Conference and Exhibition on Tissue Engineering and Regenerative Medicine* , Toronto, Canada
- Raghunath, J.; Salacinski, H.J.; Sales, K.M.; Butler, P.E.; Seifalian, A.M.** (2005) Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Current Opinion in Biotechnology*. 16:503–509
- Raghunath, J.; Rollo, J.; Sales, K.M.; Butler, P.E.; Seifalian, A.M.** (2007) Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol Appl Biochem*.46(2):73-84
- Rahfoth, B.; Weisser, J.; Sternkopf, F.; Aigner, T.; von der Mark, K.; Bräuer R.**(1998) Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 6(1):50-65
- Rajpurohit, R.; Koch, C.J.; Tao, Z.; Teixeira, C.M.; Shapiro, I.M.**(1996) Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J Cell Physiol*. 168(2):424-32
- Rangappa, S.; Fen, C.; Lee, E.H.; Bongso, A.; Sim, E.K.** (2003) Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 75(3):775-9
- Raposio, E.; Guida, C.; Baldelli, I.; Benvenuto, F.; Curto, M.; Paleari, L.; Filippi, F.; Fiocca, R.; Robello, G.; Santi, P.L.** (2006) Characterization and induction of human pre-adipocytes. *Toxicology in Vitro*.21(2):330-4
- Ratcliffe, A. y Mow, V.C.** (1996) Articular cartilage. In extracellular Matrix. Vol.1 *Tissue Function* (ed. Comper W.D.), The Netherlands: Harwood Academic Publishers. 234-302
- Reginster, J.Y.** (2002) The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 41 (1):3-6
- Reid, D.L.; Aydelotte, M.B.; Mollenhauer, J.** (2000) Cell attachment, collagen binding, and receptor analysis on bovine articular chondrocytes. *J. Orthop. Res*. 18(3):364-73

- Reinholz, G.G.; Lu, L.; Saris, D.B.; Yaszemski, M.J., O'Driscoll, S.W.**(2004) Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials*. 25(9):1511-21
- Rempel, D. y Abrahamsson, S.O.** (2001) The effects of reduced oxygen tension on cell proliferation and matrix synthesis in synovium and tendon explants from the rabbit carpal tunnel: An experimental study in vitro. *J Orthop Res*. 19:143-148
- Rencic, A.; Gehris, A.L.; Lewis, S.D.; Hume, E.L.; Bennett, V.D.** (1995) Splicing patterns of fibronectin mRNA from normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 3(3):187-96
- Reubinoff, B.E.; Pera, M.F.; Vajta, G.; Trounson, A.O.** (2001) Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod*. 16:2187-2194
- Richmon, J.D.; Sage, A.B.; Shelton, E.; Schumacher, B.L.; Sah, R.L.; Watson, D.** (2005) Effect of growth factors on cell proliferation, matrix deposition, and morphology of human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer. *Laryngoscope*. 115:1553-1560
- Risbud, M.V. y Sittinger M.** (2002) Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation. *Trends in Biotechnology*. 20(8):351-156
- Rhee, D.K.; Marcelino, J.; Baker, M.; Gong, Y.; Smits, P.; Lefebvre, V.; Jay, G.D.; Stewart, M.; Wang, H.; Warman, M.L.; Carpten, J.D.**(2005) The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*. 115(3):622-31
- Robdell, M.** (1964) Metabolism of isolated fat cells- Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *The Journal of Biological Chemistry*.239(2):375-380
- Rock, M. J.; Cain, S. A.; Freeman, L. J.; Morgan, A.; Mellody, K.; Marson, A.; Shuttleworth, C. A.; Weiss, A. S.; Kielty, C. M.** (2004) Molecular basis of elastic fiber formation: critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-Link. *J. Biol. Chem*. 279(22): 23748-23758
- Roche, S.; Ronzière, M.C.; Herbage, D.; Freyria, A.M.** (2001)Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 22:9-18
- Rodriguez, A.M.; Elabd, C.; Amri E.Z.; Ailhaud, G.; Dani, C.** (2005a) The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 87:125-128
- Rodriguez, A.M.; Pisani, D.; Dechesne, C.A.; Turc-Carel, C.; Kurzenne, J.Y.; Wdziekonski, B.; Villageois, A.; Bagnis, C.; Breittmayer, J.P.; Groux, H.; Ailhaud, G.; Dani C.** (2005) Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med*. 201:1397-1405
- Ross, J.M.; Sherwin, A.F.; Poole, C.A.** (2006) In vitro culture of enzymatically isolated chondrons: a possible model for the initiation of osteoarthritis. *J Anat*. 209(6):793-806
- Rubio, D.; Garcia-Castro, J.; Martín, M.C.; Fuente, R.; Cigudosa, J.C.; Lloyd, A.C.; Bernad, A.**(2005) Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res*. 3035-3039

- Rudert, M.; Hirschmann, F.; Schulze, M.; Wirth, C.J.** (2000) Bioartificial cartilage. *Cells Tissues Organs*.167:95-105
- Saas, J.; Haag, J.; Rueger, D.; Chubinskaya, S.; Sohler, F.; Zimmer, R.; Bartnik, E.; Aigner, T.** (2006) IL-1 beta, but not BMP-7 leads to a dramatic change in the gene expression pattern of human adult articular chondrocytes-portraying the gene expression pattern in two donors. *Cytokine*.36:90-99
- Sah, R.L.; Yang, A.S.; Chen, A.C.; Hant, J.J.; Halili, R.B.; Yoshioka, M.; Amiel, D.; Coutts, R.D.** (1997) Physical properties of rabbit articular cartilage after transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop. Res*.15(2):197-203
- Safford, K. M.; Hicok, K.C.; Safford, S. D. ; Halvorsen, Y-D C., Wilkison, W. O.; Gimble, J. M.; Rice, H. E.** (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 294:371-379
- Safford, K.M.; Safford, S.D.; Gimble, J.M.; Shetty, A.K; Rice,H.E.**(2004) Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Experimental Neurology*. 187:319- 328
- Sakaguchi, Y; Sekiya, I; Yagishita, K.; Takeshi, M.** (2005) Comparison of Human Stem Cells Derived From Various Mesenchymal Tissues. *Arthritis y Rheumatism*. 52(8): 2521-2529
- Salgado, A.J.; Oliveira, J.T.; Pedro, A.J.; Reis, R.L.**(2006) Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 1(3): 345-64
- Salter, D.M.; Hughes, D.E.; Simpson, R.; Gardner, D.L.** (1992) Integrin expression by human articular chondrocytes. *British Journal of Rheumatology*. 31:231-234
- Salter, D.M.; Godolphin, J.L.; Gourlay, M.S.** (1995) Chondrocyte Heterogeneity: Immunohistologically Defined Variation of Integrin Expression at Different Sites in Human Fetal Knees. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 43(4):447-457
- Saim, A.B.; Cao, Y; Weng, Y; Chang, C.N.; Vacanti, M.A.; Vacanti, C.A.;Eavey, R.D.** (2000) Engineering autogenous cartilage in the shape of an helice using an ijectable hidrogel scaffold. *Laryngoscope*.110:1694-7
- Saris, D.B.; Mukherjee, N.; Berglund, L.J.; Schultz, F.M.; An, K.N.; O'Driscoll, S.W.** (2000) Dynamic pressure transmission through agarose gels. *Tissue Eng*. 6(5):531-7
- Sato, T.; Chen, G.; Ushida, T.; Ishii, T.; Ochiai, N.; Tateishi, T.** (2001) Tissue-engineered cartilage by *in vivo* culturing of chondrocytes in PLGA-collagen hybrid sponge. *Materials Science and Engineering C*. 17:83-89
- Schaffer, J.** (1930) Das Stützgewebe. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.Bd.II/2 (Ed.W.v. Mollendorff). Springer Verlag, Berlin, 1-374
- Schäffler, A. y Büchler, C.** (2007) Concise review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells- Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells*. 25:818-827
- Schaefer, D.; Martin, I.; Shastri, P.; Padera, R.F.; Langer, R.; Freed, L.E.; Vunjak-Novakovic, G.**(2000) In vitro generation of osteochondral composites.*Biomaterials*. 21(24):2599-606

- Schnabel, M.; Marlovits, S; Eckhoff, G.; Fichtel, I.; Gotzen, L.; Vécsei, V.; Schlegel, J.**(2002) Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 10(1):62-70
- Schulz, R.M. y Bader, A.** (2007) Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J*.36: 539–568
- Schulze-Tanzil, G.; de Souza, P.; Castrejon, H.V.; John, T.; Merker, H.-J.; Scheid, A.; Shakibaei** (2002) Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*.308:371-379
- Schmid, T.M., Popp R.G., Linsenmayer, T.F.** (1990) Hypertrophic cartilage matrix. Type X collagen, supramolecular assembly and calcification. *Ann N Y Acad Sci*. 580:64–73
- Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Ostapowicz, D.; Kandziora, F; Stange, R.; Haas, N.P.; Raschke, M.** (2004) Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF-beta 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J Orthop Res*. 22(3):514-9
- Schuman, L.; Buma, P.; Versleyen, D.; Man, B.; Peter, M.; van der Kraan, F.; Wim, B.; van den Berg, T.; Homminga, G.N.**(1995) Chondrocyte behaviour within different types of collagen gel *in vitro*. *Biomaterials*. 16:809-814
- Scott, J.E.** (1996) Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry*. 35(27):8795-9
- Scott, P.G.; Dodd, C.M.; Pringle, G.A.** (1993) Mapping the locations of the epitopes of five monoclonal antibodies to the core protein of dermatan sulfate proteoglycan II (decorin). *J Biol Chem*. 268(16):11558-64
- Scott-Burden,T.; Bosley, J.P.; Rosenstrauch, D.; Henderson, K.D.; Clubb, F.J.; Eischstaedt, H.C.; Eya, K.; Gregoric, I.; Myers, T.J.; Radovancevic,B.; Frazier, O.H.** (2002) Use of autologous auricular chondrocytes for lining artificial surfaces: a feasibility study. *Ann Thorac Surg*. 73(5):1528-33
- Semevolos, S.A.; Nixon, A.J.; Fortier, L.A.; Strassheim, M.L.; Haupt, J.** (2006) Age-Related Expression of Molecular Regulators of Hypertrophy and Maturation in Articular Cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. 24(8):1773-81
- Sengenès, C.; Lolmède, K.; Zararkoff-Girard, A.; Busse, R.; Bouloumié,A.** (2005) Preadipocytes in the Human Subcutaneous Adipose Tissue Display Distinct Features From the Adult Mesenchymal and Hematopoietic Stem Cells. *J. Cell Physiol*. 205:114-122
- Seo, M.J.; Suh, S.Y.; Bae, Y.C.; Jung, J.S.** (2005) Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 328(1):258-64
- Setton, L.A.; Mow,V.C.; Müller, FJ; Howell, D.S.** (1993) Altered structure-function relationships for articular cartilage in human osteoarthritis and an experimental canine model. In Berg WvD, ed.: *Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis*. Basel, Birkhauser Verlag. 27-48

- Simmons, C.A.; Alsberg, E.; Hsiong, S.; Kim, W.J.; Mooney, D.J.**(2004) Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone*.35(2):562-9
- Shakibaei, M.** (1998) Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody *in vitro*. *Exp Cell Res*. 240:95-106
- Shakibaei, M.; Schröter-Kermani, C.; Merker, H.J.** (1993) Matrix changes during long-term cultivation of cartilage (organoid or high density cultures). *Hist Histopathol*.8:463-470
- Shakibaei, M.; Zimmermann, B.; Merker, H.J.** (1995) Changes in integrin expression during chondrogenesis *in vitro*: an immunomorphological study. *J. Histochem Cytochem*. 43(10):1061-1069
- Shakibaei, M.; de Souza, P.; Merker, H.J.** (1997) Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biol. Int*. 21:115-125
- Shakibaei, M.; John, T.; De Souza, P.; Rahmanzadeh, R.; Merker, H.J.** (1999) Signal transduction by  $\beta$ 1-integrin receptors in human chondrocytes *in vitro*: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem. J*. 342:615-623
- Shalhoub, V.; Conlon, D.; Tassinari, M.; Quinn, C.; Partridge, N.; Stein, G.S.; Lian, J.B.** (1992). Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem*. 50:425-440
- Shapiro, I.; Tokuka, T.; Silverton, S.** (1991) In: Hall B, Newman S, editors. Cartilage: Molecular aspects. Boca Raton: CRC Press. 97-130
- Shea, C.M.; Edgar, C.M.; Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C.**(2003) BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem*. 90(6):1112-27
- Sheldon, H.** (1964) Cartilage. In: Kurtz, S.M. (ed) Electron microscopic Anatomy. New York. Academic Press. 295-313
- Sherwood, J.K.; Riley, S.L.; Palazzolo, R.; Brown, S.C.; Monkhouse, D.C.; Coates, M.; Griffith, L.G.; Landeen, L.K.; Ratcliffe, A.** (2002) A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials*. 23(24):4739-51
- Shieh, S.J.; Terada, S.; Vacanti, J.P.** (2004) Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*. 25(9):1545-57
- Shim, H.; Gutierrez-Adan, A.; Chen, L.R.; BonDurant, R.H.; Behboodi, E.; Anderson, G.B.** (1997) Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod*. 57:1089-1095
- Sims, C.D.; Butler, P.E.; Cao, Y.L.; Casanova, R.; Randolph, M.A.; Black, A.; Vacanti, C.A.; Yaremchuk, M.J.** (1998) Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg*.101(6):1580-5



- Sohier, J.; Vlugt, T.J.H.; Cabrol, N.; van Blitterswijk, C.; de Groot, K.; Bezemer, J.M.** (2006) Dual release of proteins from porous polymeric scaffolds. *Journal of Controlled Release*. 111(1-2):95-106
- Sohier, J.; Hamann, D.; Koenders, M.; Cucchiaroni, M.; Madry, H.; van Blitterswijk, C.; de Groot, K.; Bezemer, J.M.** (2007) Tailored release of TGF-beta1 from porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Int J Pharm*. 332(1-2):80-9
- Solursh, M.** (1991) Formation of cartilage tissue in vitro. *J Cell Biochem*. 45(3):258-60
- Sottile, V.; Halleux, C.; Bassilana, F.; Keller, H.; Seuwen, K.** (2002) Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone*. 30(5):699-704
- Spencer, C.A.; Palmer, T.N.; Mason, R.M.** (1990) Intermediary metabolism in the Swarm rat chondrosarcoma chondrocyte. *Biochem J*. 265:911-914
- Spiller, K.L.; Laurencin, S.J.; Charlton, D.; Maher, S.A.; Lowman, A.M.** (2008) Superporous hydrogels for cartilage repair: Evaluation of the morphological and mechanical properties. *Acta Biomater*. 4(1):17-25
- Spiteri, C. G.; Young, E. W.K.; Simmons, C.A.; Kandel, R. A.; Pilliar, R.M.** (2008) Substrate architecture and fluid-induced shear stress during chondrocyte seeding: Role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin. *Biomaterials*. 29:2477-2489
- Sporn, M.B.; Roberts, A.B.; Wakefield, L.M.; de Crombrughe, B.** (1987) Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-Beta. *The Journal of Cell Biology*. 105:1039-1045
- Springer, I.N.; Fleiner, B.; Jepsen, S.; Açil, Y.** (2001) Culture of cells gained from temporomandibular joint cartilage on non-absorbable scaffolds. *Biomaterials*. 22(18):2569-77
- Stiff, P.J.; Koester, A.R.; Weidner, M.K.; Dvorak, K.; Risher, R.I** (1987) Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch with out controlled-rate freezing. *Blood*. 70:974-978
- Steele-Perkins, G.; Turner, J.; Edman, J.C.; Hari, J.; Pierce, S.B.; Stover, C.; Rutter, W.J.; Roth, R.A.** (1988) Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem*. 263(23):11486-92
- Stevens, R.L.; Nissley, P.; Kimura, J.H.; Rechler, M.M.; Caplan, A.I.; Hascall, V.C.** (1981) Effects of Insulin and Multiplication-stimulating Activity on Proteoglycan Biosynthesis in Chondrocytes from the Swarm Rat Chondrosarcoma. *The Journal of Biological Chemistry*. 256(4):2045-2052
- Stevens, R.L.; Austen, K.F.; Nissley, S. P.** (1983) Insulin-induced Increase in Insulin Binding to Cultured Chondrosarcoma Chondrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*. 5:2940-2944
- Storm, E.E. y Kingsley, D.M.** (1999) GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol*. 209(1):11-27
- Strem, B.M. y Hedrick, M.H.** (2005) The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends in Biotechnology*. 23(2):64-66
- Strem, B.M.; Hickok, K.C.; Zhu, M.; Wulur, I.; Alfonso, Z.; Schreiber, R.E.; Frazer, J.K.; Hedrick, M.H.** (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 54(3):132-41

- Strehl, R.; Schumacher, K.; de Vries, U.; Minuth, W.W.** (2002) Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Eng.* 8:37-42
- SundarRaj, N.; Fite, D.; Ledbetter, S.; Chakravarti, S.; Hassell, J.R.**(1995) Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J Cell Sci.* 108 (7):2663-72
- Svensson, A.; Nicklasson, E.; Harrah, T.; Panilaitis, B.; Kaplan, D.L.; Brittberg, M.; Gatenholm, P.**(2005) Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials.* 26(4): 419-31
- Svoboda, K.K.H.** (1998) Chondrocyte-matrix attachment complexes mediate survival and differentiation. *Microscopy Research and Technique.* 43:111-122
- Sweigart, M.A.; AufderHeide, A.C.; Athanasiou, K.A.**(2003) Chapter 1-Fibrochondrocytes and their Use in Tissue Engineering of the Meniscus. *Topics in Tissue Engineering* Eds. N. Ashammakhi & P. Ferretti. 1-19
- Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al.**(2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(43):15545-15550
- Suh, J.K. y Matthew, H.W.** (2000) Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials.*21(24):2589-98
- Sullivan, T.A.; Uschmann, B.; Hough, R.; Leboy, P.S.** (1994) Ascorbate modulation of chondrocyte gene expression is independent of its role in collagen secretion. *J Biol Chem.* 269(36):22500-6
- Sun, J.; Gooch, K.; Svenson, L.W.; Bell, N.R.; Frank, C.** (2007) Estimating osteoarthritis incidence from population-based administrative health care databases. *Ann Epidemiol.* 17(1):51-6.
- Taguchi, T.; Xu, L.; Kobayashi, H.; Taniguchi, A.; Kataoka, K.; Tanaka, J.**(2005) Encapsulation of chondrocytes in injectable alkali-treated collagen gels prepared using poly(ethylene glycol)-based 4-armed star polymer. *Biomaterials.*26(11):1247-52
- Takuma, S.** (1962) Electron microscopy of cartilage resorption by chondroclasts. *J Dent Res.*41:883-9
- Talens-Visconti, R.; Bonora, A.; Jover, R.; Mirabet, V.; Carbonell, F.; Castell, J.V.; Gomez-Lechon, M.J.** (2007) Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro.* 21(2):324-9
- Tamkun, J.W.; DeSimone, D.W.; Fonda, D.; Patel, R.S.; Buck, C.; Horwitz, A.F.; Hynes, R.O.** (1986) Structure of Integrin, a Glycoprotein Involved in the Transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell.* 46:271-282
- Tanaka, H.; Murphy, C.L.; Murphy, C.; Kimura, M.; Kawai, S.; Polak, J.M.** (2004) Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells: Effects of Culture Conditions and Dexamethasone. *J. Cell. Biochem.* 93: 454-462
- Tavella, S.; Bellese, G.; Castagnola, P.; Martin, I.; Piccini, D.; Doliana, R.; Colombatti, A.; Cancedda, R.; Tacchetti, C.** (1997) Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J. Cell. Sci.* 110: 2261-2270

- Tay, A.G.; Farhadi, J.; Suetterlin, R.; Pierer, G.; Hebereer, M.; Martin, I.** (2004) Cell yield, proliferation and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal and rib chondrocytes. *Tissue Engineering*. 10(5/6): 762-770
- Taylor, W.G.; Richter, A.; Evans, V.J.; Sanford, K.K.** (1974) Influence of oxygen and pH on plating efficiency and colony development of WI-38 and Vero cells. *Exp Cell Res* 86:152-156
- Temenoff, J.S. y Mikos, A.G.** (2000a) Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*. 21(5):431-40
- Temenoff, J.S. y Mikos, A.G.** (2000b) Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*. 21(23):2405-12
- ten Djike, P.; Yamashita, H.; Samphath, T.K.; Reddi, A.H.; Estevez, M.; Riddle, D.; Ichijo, H.; Heldin Carl-Henrik; Miyazono, K.**(1994) Identification of type I receptors for Osteogenic Protein-1 and Bone Morphogenetic Protein-4. *The Journal of Biological Chemistry*. 269(25):16985-16988
- Thyberg, J. y Friberg, U.** (1971) Ultrastructure of the epiphyseal plate of the normal guinea pig. *Z.Zellforsch*. 122: 254-272
- Thyberg, J.; Nielsson, S; Friberg, U.**(1973) Eletron microscopic demonstration of proteoglycans in the guinea pig epiphyseal cartilage. *Z. Zellforsch*.146:83-102
- Thirumala,S.; Gimble. J.M.; Devireddy, R.V.** (2005a) Transport Phenomena During Freezing of Adipose Tissue Derived Adult Stem Cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 92(3): 372-383
- Thirumala, S.; Zvonic, S.; Floyd, E.; Gimble, J.M.;Devireddy, R.V.** (2005b) Effect of Various Freezing Parameters on the Immediate Post-Thaw Membrane Integrity of Adipose Tissue Derived Adult Stem Cells. *Biotechnol. Prog.* 21:1511-1524
- Thornton, A.J.; Alsberg, E.; Albertelli, M.; Mooney, D.J.** (2004) Shape-defining scaffolds for minimally invasive tissue engineering. *Transplantation*, 77(12), 1798-1803
- Tholpady, S.S.; Katz, A.J.; Ogle, R.C.**(2003) Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 272(1):398-402
- Tillet, E.; Ruggiero, F.; Nishiyama, A.; Stallcup, W.B.** (1997) The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *J Biol Chem*. 272(16):10769-76
- Tognana, E.; Padera, R.F.; Chen, F., Vunjak-Novakovic, G., Freed, L.E.**(2005) Development and remodeling of engineered cartilage-explant composites in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage*. 13(10):896-905
- Toole, B.P.**(2001) Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*.12(2):79-87
- Toole, B.P.**(2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 4(7):528-39
- Torres, E.S.; Andrade, C.V.; Fonseca, E.C.; Mello, M.A.; Duarte, M.E.L.** (2003) Insulin impairs the maturation of chondrocytes *in vitro*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 36:1185-1192

- Tsai, W.B.; Chen, C.H.; Chen, J.F.; Chang, K.Y.** (2006) The effects of types of degradable polymers on porcine chondrocyte adhesion, proliferation and gene expression. *J Mater Sci Mater Med.*17(4):337-43
- Tucker, R. P.** (1993) The in situ localization of tenascin splice variants and thrombospondin 2 mRNA in the avian embryo. *Development.* 120:347-358
- Tucker, R. P.; Adams, J. C.; Lawler, J.** (1995) Thrombospondin-4 is expressed by early osteogenic tissues in the chick embryo. *Dev. Din.* 203: 477-490
- Tucker, R. P.; Hagios, C.; Chiquet-Ehrismann, R.; Lawler, J.** (1997) In situ localization of thrombospondin-1 and thrombospondin-3 transcripts in the avian embryo. *Dev. Dyn.* 208: 326-337
- Tuckwell, D.S.; Ayad, S.; Grant, M.E.; Takigawa, M.; Humphries, M.J.** (1994) Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support  $\alpha 2\beta 1$  binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel  $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin bridge. *Journal of Cell Science.* 107:993-1005
- Tuli, R.; Tuli, S.; Nandi, S.; Wang, M.L.; Alexander, P.G.; Haleem-Smith, H.; Hozack, W.J.; Manner, P.A.; Danielson, K.G.; Tuan, R.S.** (2003a); Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells.* 21(6): 681-93
- Tuli, R.; Tuli, S.; Nandi, S.; Huang, X.; Manner, P.A.; Hozack, W.J.; Danielson, K.G.; Hall, D.J.; Tuan, R.S.** (2003b) Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem.* 278(42):41227-36
- Uchio, Y.; Ochi, M.; Matsusaki, M.; Kurioka, H.; Katsube, K.** (2000) Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res.* 50(2):138-43
- Ullrich, A. y Schlessinger, J.** (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61(2):203-12
- Unsworth, J.** (2004) Novel porous scaffolds for tissue engineering cartilage. Phd Thesis. School of Pharmacy, University of Nottingham. 1-253
- Ullmann, Y.; Shoshani, O.; Fodor, L.; Ramon, Y.; Carmi, N.; Shupak, A.; Lincoln, R.; Gilhar, A.**(2004) Long-term fat preservation. *J Drugs Dermatol.* 3(3):266-9
- Vacanti, C.A.; Kim, W.S.; Schloo, B.; Upton, J.; Vacanti, JP.** (1994) Joint resurfacing with cartilage grown *in situ* from cell-polymer structures. *The American Journal of Sports Medicine.* 22(4):485-488
- Vacanti, V.; Kong, E.; Suzuki, G.; Sato, K.; Canty, J.M.; Lee, T.** (2005) Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J. Cell Physiol.*205(2):194-201
- Vacanti, C.A.** (2006) The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 10(3):569-76

- van Beuningen, H.M.; Glansbeek, H.L.; van der Kraan, P.M.; van den Berg, W.B.**(1998) Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*.6(5):306-17
- van Beuningen, H.M.; Glansbeek, H.L.; van der Kraan, P.M.; van den Berg, W.B.**(2000) Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections. *Osteoarthritis Cartilage*. 8(1):25-33
- van Harmelen, V.; Skurk, T.; Rohrig, K.; Lee, Y.M.; Halbleib, M.; Aprath-Husmann, I.; Hauner, H.** (2003) Effects of BMI and age on adipose cellularity and differentiation capacity in women. *Int. J. Obesity*. 27:889-95
- van Harmelen, V.; Röhrig, K.; Hauner, H.** (2004) Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*. 53(5):632-7
- van Osch, G.J.V.M.; Marijnissen, W.J.C.M.; van der Veen, S.W.; Verwoerd-Verhoef, H.L.** (2001) The potency of culture-expanded nasal septum chondrocytes for tissue engineering of cartilage. *American Journal of Rhinology*. 15:187-192
- van Osch, G.J.V.M.; Mandl, E.W.; Jahr, H.; Koevet, W.; Nolst-Trenité, G.; Brear, J.A.N.** (2004) Considerations on the use of ear chondrocytes as donor chondrocytes for cartilage tissue engineering. *Biorheology*.1:11
- Van, R.L.R.; Bayliss, C.E.; Roncari, D.A.K.** (1976) Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest*. 58: 699-704
- van Sickle, D.C., Dellman, H. D., Brown, E.M.** (1993) Capitulo 3- Tejido conjuntivo y de sostén. In: *Histología Veterinaria* Editor: Dellman, H.D. 2ª Edición. Editorial Acribia, Zaragoza. Traducida por Pascual Lorenzo.42-57
- van Susante, J.L.; Buma, P.; Schuman, L.; Homminga, G.N.; van den Berg, W.B.; Veth, R.P.** (1999) Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials*. 20(13):1167-75
- van Susante, J.L.C.; Pieper, J.; Buma, P.; van Kuppevelt, T.H.; van Beuningen, H.; van der Kraan, P.M.; Veerkamp, J.H.; van den Berg, W.B.; Veth, R.P.H.** (2001) Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes *in vitro*. *Biomaterials*. 22:2359-2369
- Vats, A.; Tolley, N.S.; Polak, J.M.; Buttery, L.D.** (2002) Stem cells: sources and applications. *Clin. Otolaryngol. Allied. Sci*. 27(4):227-32
- Vaughan-Thomas, A.; Young, R.D.; Phillips, A.C.; Duance, V.C.**(2001) Characterization of type XI collagen-glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem*. 276:5303-5309
- Venter, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G.; Smith, H.O.; Yandell, M.; Evans, C.A.; Holt, R.A.; et al.** (2001) The sequence of the human genome. *Science*. 291(5507):1304-51
- Vidal, M.A.; Kilroy, G.E.; Lopez, M.I.; Johnson, J.R.; Moore, R.M.; Gimble, J.M.** (2007) Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Veterinary Surgery*.36:613-622

- Vinatier, C.; Magne, D.; Moreau, A.; Gauthier, O.; Malard, O.; Vignes-Colombeix, C.; Daculsi, G.; Weiss, P.; Guicheux, J.** (2007) Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 80A: 66–74
- Vinatier, C.; Gauthier, O.; Masson, M.; Malard, O.; Moreau, A.; Fellah, B.H.; Bilban, M.; Spaethe, R.; Daculsi, G.; Guicheux, J.**(2008) Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. En prensa
- Vincent, T.; Hermansson, M.; Bolton, M.; Wait, R.; Saklatvala, J.** (2002) Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury. *PNAS*. 99(12):8259–8264
- Villar-Suárez, V.; Calles-Venal, I.; Bravo, I. G.; Fernández-Álvarez, J.G.; Fernandez-Caso, M.; Villar-Lacilla** (2004) Differential behavior between isolated and aggregated rabbit auricular chondrocytes on plastic surfaces: *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 86-92
- von der Mark, K. y Mollenhauer, J.** (1997) Annexin V interactions with collagen. *Cell Mol Life Sci*. 53(6):539-45
- von der Mark, K.; Gauss, V.; von der Mark, H.; Müller, P.** (1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. 531-532
- Vortkamp, A.; Lee, K.; Lanske, B.; Segre, G.V.; Kronenberg, H.M.; Tabin, C.J.** (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*. 273(5275):613-22
- Vunjak-Novakovic G.** (2003) The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors. In: *Tissue Engineering of Cartilage and Bone (Novartis Foundation Symposium)*. Editors: Bock G and Goode J. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 249: 34-51
- Vunjak-Novakovic, G.; Martin, I.; Obradovic, B.; Treppo, S.; Grodzinsky, A. J.; Langer, R.; Freed, L. E.** (1999) Bioreactor Cultivation Conditions Modulate the Composition and Mechanical Properties of Tissue-Engineered Cartilage. *J Orthop Res*. 17: 130-138
- Wakitani, S.; Kimura, T.; Hirooka, A.; Ochi, T.; Yoneda, M.; Yasui, N.; Owaki, H.; Ono, K.** (1989) Repair Of Rabbit Articular Surfaces With Allograft Chondrocytes Embedded In Collagen Gel. *The Journal Of Bone And Joint Surgery*. 71(1):74-80
- Waldman, S.D.; Grynblas, M.D.; Pilliar, R.M.; Kandel, R.A.** (2003) The use of specific chondrocyte populations to modulate the properties of tissue-engineered cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. 21:132-138
- Wang, D.W.; Fervor, B.; Gimble, J. M.; Awad, H.A.; Guilak, F.** (2005) Influence of Oxygen on the Proliferation and Metabolism of Adipose Derived Adult Stem Cells. *J. Cell. Physiol*. 204:184-191
- Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorg, W.; Ho, A.D.** (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 33(11):1402-16
- Warkentin, P.I.; Jackson, J.D.; Letheby, B.; Kessinger, A.** (1994) Effective cryopreservation of cytokine-mobilized autologous peripheral blood stem cells using non-controlled rate freezing. *Prog. Clin. Biol. Res*. 389:643-647

- Webber, R. J.; Harris, M.G.; Hough, A.J. Jr.** (1985) Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res.* 3(1): 36-42
- Weber, F.E.; Eyrich, G.; Grätz, K.W.; Maly, F.E.; Sailer, H.F.**(2002) Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 31(1):60-5
- Wegner, M.** (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Research*, 27(6):1409-1420
- Wei, Y.; Hu, Y.; Li, D.** (2006) Regulation of adipose-derived adult stem cells differentiating into chondrocytes with the use of rhBMP-2. *Cytotherapy.*8(6):570-9
- Wei, Y.; Hu, Y.; Han, Y.; Meng, G.; Zhang, D.; Wu, Z.; Wang, H.** (2007a) A novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells. *J Orthop Res.* 1-7
- Wei, Y.; Sun, X.; Wang, W.** (2007b) Adipose-derived stem cells and chondrogenesis. *Cytotherapy.* 9(8):712-716
- Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W.** (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112(12):1796-808
- Wexler, S.A.; Donaldson, C.; Denning-Kendall, P.; Rice, C.; Bradley, B.; Hows, J.M.** (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* 121(2):368-74
- Wickham, M.Q.; Erickson, G.R.; Gimble, J.M.; Vail, T.P.; Guilak, F.** (2003) Multipotential human adult stem cells derived from infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop.* 412:196-212
- Widelitz, R.B.; Jiang, T.X.; Murria, B.A.; Chuong, C.M.** (1993) Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion mediate precartilaginous mesenchymal condensation and enhance chondrogenesis. *J Cell Physiol.* 156(2):399-411
- Wilke, M.M.; Nydam, D.V.; Nixon, A.J.** (2007) Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res.* 25(7): 913-25
- Wiesmann, A.; Buhning, H.J.; Mentrup, C.; Wiesmann, H.P.**(2006) Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med.* 31:2-8
- Winter, A.; Breit, S.; Parsch, D.; Benz, K.; Steck, E.; Hauner, H.; Weber, R.M.; Ewerbeck, V.; Richter, W.** (2003) Cartilage-Like Gene Expression in Differentiated Human Stem Cell Spheroids. A Comparison of Bone Marrow-Derived and Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Arthritis & Rheumatism.* 48(2): 418-429
- Whitaker, M.J.; Quirk, R.A.; Howdle, SM, Shakesheff KM.** (2001) Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol.* 53(11):1427-37
- Woodbury, D.; Schwarz, E.J.; Prockop, D.J.; Black, I.B.** 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61: 364–370

- Woodfield, T.B.; Bezemer, J.M.; Pieper, J.S.; van Blitterswijk, C.A.; Riesle, J.**(2002) Scaffolds for tissue engineering of cartilage. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*12(3):209-36
- Wong, M.; Kireeva, M. L.; Kolesnikova, T. V.** (1997) Cyr61, Product of a growth factor-inducible immediate-early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Developmental Biology.* 192:492-508
- Woods, V.L.; Schreck, P.J; Gesink, D.S.; Pacheco, H. O.; Amiel, D.; Akeson, W.H.; Lotz, M.** (1994) Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism.* 37:537-544
- Wosnitza, M.; Hemmrich, K.; Groger, A.; Gräber, S.; Pallua, N.** (2007) Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation.* 75(1):12-23
- Wotton, S. F.; Duance, V. C.; Fryer, P. R.** (1988). Type IX collagen: a possible function in articular cartilage. *FEBS Lett.* 234: 79-82
- Wotton, S. F.; Jeacocke, R. E.; Maciewicz, R. A.; Wardale, R. J.; Duance, V. C.** (1991). The application of scanning confocal microscopy in cartilage research. *Histochem. J.* 23:328-335
- Wyre, R.M. y Downes, S.** (2000) An in vitro investigation of the PEMA/THFMA polymer system as a biomaterial for cartilage repair. *Biomaterials.* 21(4):335-43
- Xie, J.; Jung, Y.; Kim, S.H.; Kim, Y.H.; Matsuda, T.** (2006) New technique of seeding chondrocytes into microporous poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) sponge by cyclic compression force-induced suction. *Tissue Eng.* 12(7):1811-20
- Xu, Y.; Malladi, P.; Chiou, M.; Bekerman, E.; Giaccia, A.J.; Longaker, M.T.** (2007) In Vitro Expansion of Adipose- Derived Adult Stromal Cells in Hypoxia Enhances early chondrogenesis. *Tissue Eng.* 13(12):2981-93
- Yamada, K.D.; Pankov, R.; Cukierman, E.** (2003) Dimension and dynamics in integrin function. *Brazilian Journal of Medical Research.* 36:959-966
- Yamaoka, H.; Asato, H.; Ogasawara, T.; Nishizawa, S.; Takahashi, T.; Nakatsuka, T.; Koshima, I.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Chung, U.I.; Takato, T.; Hoshi, K.** (2006) Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A.*78(1):1-11
- Yan, H. y Yu, C.** (2007) Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy.* 23:178-187
- Yanaga, H.; Yanaga, K.; Imai, K.; Koga, M.; Soejima, C.; Ohmori, K.** (2006) Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg.* 117(6):2019-30
- Yang, J. y Hynes. R.** (1996). Fibronectin receptor functions in embryonic cells deficient in alpha 5 beta 1 integrin can be replaced by alpha V integrins. *Mol. Biol. Cell.* 7:1737-1748
- Yang, L.; Clinton, J.M.; Blackburn, M.L.; Zhang, Q.; Zou, J.; Zielinska-Kwiatkowska, A.; Tang, B.L.; Chansky, H.A.** (2008) Rab23 regulates differentiation of ATDC5 chondroprogenitor cells. *J Biol Chem.* En prensa



- Yoo, J.U.; Barthel, T.S.; Nishimura, K.; Solchaga, L.; Caplan, A.I.; Goldberg, V.M.; Jonhstone, B.**(1998) The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 80:1745–57
- Yoshimura, K.; Shigeura, T.; Matsumoto, D.; Sato, Takahiro, S.; Takaki, Y.; Aiba-Kojima, E.; Sato, K.; Inoue, K.; Nagase,T.; Koshima, I.;Gonda, K.** (2006) Characterization of Freshly Isolated and Cultured Cells Derived From the Fatty and Fluid Portions of Liposuction Aspirates. *Journal of Cellular Physiology.*208:64-76
- Yoshimura, H; Muneta, T; Nimura, A; Yokoyama, A; Koga, H; Sekiya, I.** (2007) Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327(3):449-62
- Zarnett, R. y Salter, R.B.** (1989) Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. *Can J Surg.* 32(3):171-4
- Zaucke, F.; Dinser, R.; Maurer, P.; Paulsson, M.** (2001) Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J.* 358(1):17-24
- Zhao, Q.; Ebberspaecher, H.; Lefebvre, V.; Crombrughe, B.** (1997) Parallel expression of Sox9 and col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev. Dyn.* 209:377-386
- Zhou, S.; Eid, K.; Glowacki, J.** (2004) Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.*19(3):463-70
- Zhu, Y.; Oganessian, A.; Keene, D.R.; Sandell, L. J.** (1999) Type IIA Procollagen containing the cystein-rich Amino Propeptide is deposited in the extracelullar Matrix of Prechondrogenic Tissue binds to TGF-B1 and BMP-2. *The Journal of Cell Biology.* 144(5):1069-1080
- Zimmermann, B. y Cristea, R.** (1993). Dexamethasone induces chondrogenesis in organoid culture of cell mixtures from mouse embryos. *Anat Embryol (Berl).*187:67–73
- Zou, H.; Wieser, R.; Massagué, J.; Niswander, L.** (1997) Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* 11(17):2191-203
- Zuk, P.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H.** (2001) Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue engineering.*7(2):211-228
- Zuk P.A.; Zhu M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D.A.; Huang, J.I.; Mizuno H.; Alfonso, Z.C., Frazer, J.K.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H.** (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13(12):4279-95