

**UNIVERSIDAD DE LEÓN**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Dpto. Medicina, Cirugía y Anatomía  
Veterinaria



**INGENIERÍA DEL TEJIDO  
CARTILAGINOSO**

**APLICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES  
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO Y  
MÉDULA ÓSEA PARA SU UTILIZACIÓN EN  
REGENERACIÓN DE TEJIDO CARTILAGINOSO**

María Luisa González Fernández

León, Junio de 2014





## **AGRADECIMIENTOS**

Esta Tesis Doctoral es el fruto del esfuerzo de muchas personas a las que quiero agradecer su aportación, que ha sido vital para llevar a cabo este trabajo.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis la Dra. Vega Villar Suárez y el Dr. Bruno Jorge Antunes Colaço sin la ayuda de los cuales nada de esto habría sido posible.

Mi agradecimiento especial a la Dra. Vega Villar Suárez, no sólo por su optimismo sin límites y su paciencia infinita ante las numerosas adversidades surgidas en el largo proceso que supuso este trabajo, también por su apoyo incondicional en todo momento. Por el eterno volver a empezar de cero sin perder la sonrisa, por su esencial sentido común, por su capacidad de trabajo extrema, por el desvelo que muestra por cada persona que se acerca a ella con un problema. Y siempre, siempre con una sonrisa que nos ayuda a superar los innumerables contratiempos que han surgido a lo largo de los años. Por ser un ser excepcional millones de gracias.

Gracias a Jose M<sup>a</sup> Maniega, Elisa López y Saúl Pérez, por hacer del día a día una fiesta, por conseguir hacerme venir a trabajar con una sonrisa en la cara, por ayudar en todo y a todos. Por hacerme reír de mis errores y a seguir en la brecha. Sin su inestimable ayuda, esta tesis no habría sido acabada nunca.

Gracias a Victoria García Mediavilla, a Sonia Martínez, a Antonio, por su aportación a este trabajo, tanto en ideas como en su saber hacer y paciencia con la ignorancia ajena.

**A MI FAMILIA**

## RESUMEN

Las patologías cartilaginosas han tenido una elevada incidencia en la población mundial, causando graves problemas clínicos y económicos.

Dentro de las enfermedades que afectan al cartílago nos encontramos desde patologías congénitas, traumáticas, de origen reumatoide, neoplasias pero las más frecuentes y gravosas, son las que conllevan una degeneración del cartílago como la osteoartritis, artrosis y otras patologías relacionadas con la edad. De todas ellas, se estima que sólo la osteoartritis es la responsable del 50% de las patologías crónicas en una población envejecida.

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*. El cartílago una vez lesionado tiene poca capacidad de reparación espontánea debido a la naturaleza avascular y alinfática de este tejido. En este contexto, la ingeniería del tejido cartilaginoso, pretende ser una solución para este problema intentando alcanzar un sustituto funcional. 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.

Dentro de las múltiples células que se pueden utilizar en ingeniería de tejido cartilaginoso, hemos seleccionado trabajar con células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AT-MSCs) de rata y caballo y derivadas de médula ósea (BM-MSCs) de caballo.

Constatamos que tanto las AT-MSCs como las BM-MSCs demostraron ser una alternativa viable y prometedora para su

utilización en ingeniería de tejido cartilaginoso. Conseguimos obtener un número de células suficiente tras sucesivos subcultivos y observamos que se tornan en una población más homogénea y estable. Las células eran positivas al CD29, CD73, CD90 y CD105 aumentando la positividad a estos marcadores con los sucesivos pases, y no alterándose ésta significativamente, con la criopreservación. Estas células tienen capacidad de multipotencia, pudiendo diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos.

Los dos tipos celulares estudiados, demostraron ser capaces de producir cartílago *in vitro*, con expresión de los marcadores de cartílago. Las AT-MSCs parecen ser una alternativa muy interesante a las BM-MSCs como fuente celular, por su elevada capacidad de proliferación y facilidad de obtención, lo que permitirá producir mayores cantidades de tejido *in vitro*. También demostraron tener capacidad de proliferación y capacidad de adhesión a diferentes biomateriales como el Hidrogel, Matrigel<sup>®</sup>, OPLA<sup>®</sup> y Zimmer<sup>®</sup>.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la capacidad de regeneración del tejido cartilaginoso, en concreto del menisco, mediante el uso de una construcción formada por un biomaterial (Zimmer<sup>®</sup>) y nuestras células; utilizamos el caballo como animal de experimentación, por su posibilidad de extrapolar los resultados a la clínica humana debido a la similitud entre las articulaciones femoro-tibiales de ambas especies. Se demostró tanto macroscópica- como microscópicamente la regeneración del menisco *in vivo*, tras un lapso de tiempo de 12 meses tras la implantación.

Todo ello nos lleva a pensar que en un futuro la regeneración del tejido cartilaginoso será posible, perfeccionando estas técnicas aplicables a numerosos casos clínicos tanto en medicina veterinaria, como en medicina humana.

## SUMMARY

Cartilaginous pathologies have had a high incidence regarding world population, causing severe clinic and economic problems.

Among the diseases that affect cartilage, we can find from congenital pathologies, traumatic which have rheumatism origin, neoplasia, etc.; but the most frequent and serious are those that result in a cartilage degeneration, such as osteoarthritis, arthritis and other pathologies related to age. Regarding all of them, it is estimated that only osteoarthritis is the responsible for 50% chronic pathologies among aged population.

Tissue engineering is an emerging multidisciplinary science that is considered as a new area in the field of medicine and could be defined as "The art of tissue reconstruction, whether be structural or functional". Once cartilage is injured, it has low capacity for natural repair due to avascular nature of the said tissue. In this context, cartilaginous tissue engineering intends to be a solution to that problem trying to reach a functional substitute. This new science field is based on cells combination use, biomaterials and bioactive factors that allow generating and replacing cartilage biological functions which have been damaged or degenerated.

Regarding multiples cells that can be used for cartilaginous tissue engineering, we have decided to use mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue (AT-MSCs) of rats and horses, and cells obtained from horse bone marrow (BM-MSCs).

We observed that both, AT-MSCs and BM-MSCs turned to be a viable and promising alternative for its use in cartilaginous tissue engineering. We obtained a sufficient number of cells after several cultures and we observed that they became into a more homogenous and stable population. Cells were positive to CD29, CD73, CD90 and CD105, they increased their positive values to these markers after



cryopreservation. These cells have multipotent capacity; they could differentiate in adipocytes, chondrocytes and osteocytes.

Those two types of cells that have been studied, demonstrated to be capable of producing cartilage *in vitro* expressed by cartilage indicators. AT-MSCs turned to be a very interesting alternative to BM-MSCs as cell source, due to its proliferation high capacity and obtaining simplicity. They also demonstrate having a good proliferation and adhesion capacity to different biomaterials such as Hydrogel, Matrigel<sup>®</sup>, OPLA<sup>®</sup> and Zimmer<sup>®</sup>.

With the objective of going deeper in our study regarding cartilaginous tissue regeneration capacity, in concrete the meniscus, using a construction formed by a biomaterial (Zimmer<sup>®</sup>) and our mesenchymal stem cells; we used horses as animal model, due to its comparing capacity results to human clinic and its similarity between femoro-tibials articulations of both species. *In vitro* meniscus regeneration was demonstrated both macroscopic and microscopic, after 12 months.

These results lead us to think that in the near future; cartilaginous tissue regeneration would be possible, improving these applicable techniques to a large number of clinic cases related to either veterinary or human medicine.

# ÍNDICE

---



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
<b>1.- CARTÍLAGO ARTICULAR</b>	<b>24</b>
<b>2.- MENISCO</b>	<b>27</b>
<b>3.- INGENIERÍA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO</b>	<b>28</b>
<b>3.1.- Células utilizadas en ingeniería del tejido cartilaginoso</b>	<b>31</b>
3.1.1.- Condrocitos	32
3.1.2.- Células troncales	32
<b>3.2.- Criopreservación celular</b>	<b>51</b>
<b>3.3.- Matrices utilizadas en ingeniería del tejido cartilaginoso</b>	<b>54</b>
3.3.1.- Hidrogeles	58
3.3.2.- Ácido poliláctico	59
3.3.3.- Matrigel®	60
3.3.4.- Colágeno	61
<b>OBJETIVOS</b>	<b>63</b>
<b>1.- GENERALES</b>	<b>65</b>
<b>2.- ESPECÍFICOS</b>	<b>65</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>67</b>
<b>1.- MATERIALES</b>	<b>69</b>
Animales	69
Biomateriales	69
<b>2.- OBTENCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO Y MÉDULA ÓSEA EN RATA Y CABALLO</b>	<b>70</b>
2.1.- Obtención de tejido adiposo de rata	70
2.2.- Obtención de médula ósea de caballo	71
2.3.- Obtención de tejido adiposo de caballo	72
<b>3.- AISLAMIENTO DE MSCs</b>	<b>72</b>
3.1.- Aislamiento de BM-MSCs	72
3.2.- Aislamiento de AT-MSCs	73
<b>4.- TÉCNICAS DE CULTIVO Y EXPANSIÓN DE BM-MSCs Y AT-MSCs</b>	<b>74</b>
4.1.- Cultivo en monocapa	74
4.2.- Cultivo sobre biomateriales	75
4.3.- Cultivo en pellet	76
4.4.- Cultivo en micromasa	76

<b>5.- CRIOPRESERVACIÓN CELULAR</b>	<b>77</b>
5.1.- Protocolos utilizados en la criopreservación de AT-MSCs de rata	78
<b>6.- CITOMETRÍA DE FLUJO</b>	<b>78</b>
<b>6.1.- Determinación de la viabilidad celular</b>	<b>78</b>
<b>6.2.- Caracterización de AT-MSCs de rata mediante marcadores de superficie</b>	<b>79</b>
<b>6.3.- Caracterización de las AT-MSCs y BM-MSCs de caballo mediante marcadores de superficie</b>	<b>81</b>
<b>7.- TÉCNICAS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR</b>	<b>82</b>
<b>7.1.- Inducción de la condrogénesis</b>	<b>82</b>
7.1.1.- Tinción Azul Alcian	83
<b>7.2.- Inducción de la adipogénesis</b>	<b>84</b>
7.2.1.- Tinción Oil Red O	84
<b>7.3.- Inducción de la osteogénesis</b>	<b>85</b>
7.3.1.- Tinción de Rojo Alizarin	86
7.3.2.- Tinción de von Kossa	87
<b>8.- TÉCNICAS DE HISTOQUÍMICA</b>	<b>88</b>
<b>8.1.- Inmunofluorescencia indirecta</b>	<b>88</b>
8.1.1.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: marcadores de superficie de MSCs de caballo	88
8.1.2.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: marcadores de superficie de AT-MSCs de rata	90
8.1.3.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: distribución celular en biomateriales	90
8.1.4.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: adhesión celular en biomateriales	91
8.1.5.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: determinación expresión colágeno tipo II en las AT-MSCs de rata	92
8.1.6.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: determinación expresión de agrecano en MSCs de caballo	93
<b>8.2.- Inmunofluorescencia directa</b>	<b>95</b>
8.2.1.- Inmunofluorescencia directa confocal marcadores de superficie AT-MSCs de rata	95
<b>9.- CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LOS BIOMATERIALES</b>	<b>95</b>
<b>9.1.- Cuantificación del DNA total</b>	<b>96</b>
9.1.1.- Degradación de los biomateriales	96
9.1.2.- Extracción de DNA con fenol-cloroformo-isoamilo	98
9.1.3.- Precipitación del DNA	98

<b>9.2.- Cuantificación de la viabilidad y proliferación celular con Alamar Blue®</b>	<b>99</b>
<b>9.3.- Cuantificación de la diferenciación condrogénica</b>	<b>100</b>
9.3.1.- Extracción de RNA	100
9.3.2.- Tratamiento con DNAsa	101
9.3.3.- Síntesis de cDNA (RT-PCR)	102
9.3.4.- RT-PCR	102
<b>10.- TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</b>	<b>102</b>
<b>10.1.- Protocolo de microscopía electrónica de barrido (SEM) en cultivo monocapa</b>	<b>102</b>
<b>10.2.- Protocolo de microscopía electrónica de barrido (SEM) en biomateriales</b>	<b>103</b>
<b>10.3.- Protocolo de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AT-MSCs y BM-MSCs de caballo</b>	<b>105</b>
<b>11.- MODELO DE REGENERACIÓN DE MENISCO DE CABALLO</b>	<b>107</b>
<b>11.1.- Técnica quirúrgica y artroscopias</b>	<b>108</b>
<b>11.2.- Técnicas de microscopía óptica para valorar la regeneración meniscal</b>	<b>111</b>
11.2.1.- Fijación	112
11.2.2.- Inclusión en parafina	112
11.2.3.- Histoquímica	114
<b>11.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>115</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>117</b>
<b>1.1.- Obtención y cultivo de las AT-MSCs de rata</b>	<b>119</b>
<b>1.2.- Caracterización de las AT-MSCs de rata</b>	<b>123</b>
<b>1.3.- Pruebas de multipotencia de las AT-MSCs de rata</b>	<b>125</b>
<b>2.- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs DE CABALLO</b>	<b>128</b>
<b>2.1.- Obtención y cultivo de las MSCs de caballo</b>	<b>128</b>
<b>2.2.- Caracterización de las MSCs de caballo</b>	<b>131</b>
<b>2.3.- Pruebas de multipotencia de las MSCs de caballo</b>	<b>133</b>
<b>2.4.- Caracterización morfológica de las MSCs de caballo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)</b>	<b>137</b>
<b>3.- OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE MSCs</b>	<b>140</b>

---

3.1.- Determinación de la viabilidad celular de las AT-MSCs de rata criopreservadas. _____	140
3.2.- Caracterización de las AT-MSCs de rata criopreservadas _____	143
3.3.- Evaluación de la influencia de la criopreservación en la multipotencialidad de las MSCs de rata y caballo. _____	145
4.- CULTIVO CELULAR SOBRE LOS BIOMATERIALES _____	149
4.1.- Evaluación de la morfología celular sobre los biomateriales _____	149
4.2.- Evaluación de la distribución celular sobre los biomateriales _____	152
4.3.- Evaluación de la adhesión celular sobre los biomateriales _____	153
4.4.- Evaluación de la proliferación celular sobre los biomateriales _____	154
4.4.1.- Extracción de DNA con fenol-cloroformo-isoamílico _____	154
4.4.2.- Cuantificación del DNA mediante Alamar Blue® _____	156
5.1.- Cuantificación del DNA mediante Alamar Blue® _____	157
5.2.- Implantación local de MSCs como promotoras de la regeneración de menisco _____	158
DISCUSIÓN _____	163
1.1.- OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MSCs _____	166
1.2.- EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs _____	168
2.- OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE MSCs _____	173
3.- CULTIVO DE MSCs SOBRE BIOMATERIALES _____	175
4.- VALORACIÓN DEL EFECTO REGENERADOR DE LAS MSCs DE CABALLO SOBRE MOLDES TRIDIMENSIONALES EN UN ESTUDIO IN VIVO _____	177
CONCLUSIONES _____	181
BIBLIOGRAFÍA _____	185

# **FIGURAS Y TABLAS**

---





## **INTRODUCCIÓN:**

**Figura 1:** Esquema de ingeniería de tejidos.

**Tabla 1:** Resumen de la clasificación de las células troncales.

**Tabla 2:** Factores utilizados experimentalmente para inducir la diferenciación de las células troncales del tejido adiposo. Adaptado de Schäffler y Büchler, 2007.

**Tabla 3:** Métodos de recogida utilizados en la obtención de las células troncales del tejido adiposo.

**Tabla 4:** Tipos de matrices utilizadas en ingeniería de tejidos de cartilago. Adaptado de Vinatier, 2007.

## **MATERIALES Y MÉTODOS:**

**Tabla 5:** Medios de criopreservación utilizados en el estudio.

**Tabla 6:** Inclusión en parafina en el caso de las muestras de menisco.

**Figura 2:** Procedimiento quirúrgico.

## **RESULTADOS:**

**Figura 3:** Cultivo de células adherentes de tejido adiposo de rata. Microscopía óptica.

**Figura 4:** Proliferación de las AT-MSCs de rata.

**Figura 5:** Expresión de CD29 en AT-MSCs de rata .Inmunofluorescencia directa.

**Figura 6:** Expresión de CD73 y CD 90 en AT-MSCs de rata. Microscopía confocal

**Figura 7:** Análisis de los marcadores específicos CD90 y CD73 en AT-MSCs de rata. Citometría de Flujo y Microscopía Confocal.

**Figura 8:** Estudio de la diferenciación condrogénica de las AT-MSCs de rata.

**Figura 9:** Microscopía confocal para colágeno tipo II en diferenciación condrogénica en AT-MSCs de rata.

**Figura 10:** Diferenciación adipogénica y osteogénica de las AT-MSCs de rata.

**Figura 11:** Cultivo de la Fracción Estromal Vascular.

**Figura 12:** Morfología de las células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo de rata y caballo.

**Figura 13:** Morfología de MSCs de caballo. Microscopía óptica. Medición de la proliferación de MSCs de caballo.

**Figura 14:** Análisis de los marcadores específicos CD73, CD90 y CD105 en AT-MSCs y BM-MSCs de caballo.

**Figura 15:** Estudio de la diferenciación condrogénica de las MSCs de caballo.

**Figura 16:** Estudio de la diferenciación adipogénica y osteogénica de MSCs de caballo.

**Figura 17:** TEM AT-MSCs de caballo.

**Figura 18:** TEM BM-MSCs de caballo.

**Figura 19:** Datos representativos del porcentaje de células vivas después de la criopreservación.

**Figura 20:** Datos representativos del porcentaje de células apoptóticas después de la criopreservación.

**Figura 21:** Expresión del CD 29 y CD73 en células frescas y congeladas AT-MSCs de rata.

**Figura 22:** Nódulos de AT-MSCs de rata en diferenciación condrogénica.

**Figura 23:** Estudio de la diferenciación condrogénica, adipogénica y osteogénica de las MSCs de caballo criopreservadas y frescas.

**Figura 24:** Curvas de crecimiento celular de MSCs de rata y caballo frescas y criopreservadas.

**Figura 25 :** SEM de MSCs de caballo sembradas sobre hidrogel y Zimmer®.

**Figura 26:** SEM sobre Matrigel® y OPLA® sembrados con MSCs de caballo.

**Figura 27:** Distribución celular en los distintos biomateriales. Microscopía confocal.

**Figura 28:** Adhesión celular sobre diversos biomateriales. Microscopía confocal.

**Figura 29:** Cuantificación de la proliferación celular con extracción de DNA con fenol-cloroformo de las MSCs de caballo.

**Figura 30:** Cuantificación de la proliferación celular con Alamar Blue®.

**Figura 31:** **A.** SEM sobre Zimmer® sembrado con MSCs de caballo **B.** Evaluación de la proliferación celular de MSCs sobre soportes ZIMMER® determinando el contenido total de DNA mediante el método Alamar Blue®.

**Figura 32:** Morfología macroscópica de los meniscos.

**Figura 33:** Análisis histológico de las áreas intervenidas.

**Figura 34:** Gráfica de la cuantificación de la tinción con Safranina O de los proteoglicanos en cada sección de menisco.

# **ABREVIATURAS**

---



**1,25(OH)2D3**- 1,25-dihydroxy-cholecalciferol.

**ADN**- Ácido desoxirribonucleico.

**AH**- Ácido hialurónico.

**AT-MSCs**- Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

**ARN**- Ácido ribonucleico.

**ARNm**- Ácido ribonucleico mensajero.

**bFGF**- Basic fibroblast growth factor (factor básico de crecimiento fibroblástico).

**BMP**- Bone morphogenetic protein (proteína morfogenética ósea).

**BSA**- Bovine serum albumin (albumina sérica bovina).

**CDNA**- DNA complementario.

**CFU-F**- Unidades formadoras de colonias fibroblásticas.

**CO2**- Dióxido de carbono.

**DMEM**- Dulbecco modified eagle medium.

**DMEMc**- Dulbecco modified eagle medium Medio de cultivo completo.

**DMSO**- Dimetilsulfóxido.

**DO**- Densidad óptica.

**EDTA**- Ácido etilendiaminotetraacético.

**EGF**- Factor de crecimiento epidérmico.

**ELRs**- Elastin-like recombinamers.

**ESCs**- Células troncales embionarias.

**FACS**- Fluorescence-Activated Cell Sorter.

**FAK**- Fosfatasa de adhesión kinasa.

**FEV**- Fracción estromal vascular.

**FGF**- Fibroblast growth factor (factor de crecimiento de los fibroblastos).

**FN**- Fibronectina.

**FSC-** Dispersión frontal de la luz.

**GADPH-** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

**GAGs-** Glicosaminoglicanos.

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

**HGF-** Factor de crecimiento del hepatocito.

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

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

**IL-** Interleucina.

**IP-** Ioduro de propidio.

**iPSCs-** Células troncales pluripotentes inducidas.

**ITS-** Insulina transferrina y selenio.

**KS-** Queratan sulfato.

**LPA-** Lipoaspirado procesado.

**MCI-** Masa celular interna.

**MEC-** Matriz extracelular.

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

**MSCs-** Células troncales mesenquimales.

**NGS-** Suero normal de cabra.

**OSM-** Oncostatina.

**PBS-** Phosphate buffered saline.

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

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

**PG-** Proteoglicano.

**PGA-** Ácido poliglicólico.

**PLA-** Ácido poliláctico.

**PLLA-** Ácido poli-L-láctico.

**PM-** Peso molecular.

**PS-** Fosfatidilserina.

**RNA-** Ácido desoxirribonucleico.

**RPM-** Revoluciones por minuto.

**RT-Q-PCR-** Retro Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction.

**SEM-** Microscopía electrónica de barrido.

**SDS-** Dodecil sulfato sódico.

**SFB-** Suero fetal bovino.

**SCF-** Factor de célula troncal.

**SFV-** Fracción estromal vascular.

**SOX-** SRY box.

**SSC-** Dispersión lateral de la luz.

**TBE-** Tampón tris-borato-EDTA.

**TE-** Tampón tris-EDTA.

**TEM-** Microscopía electrónica de transmisión.

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

**TM-** Tricrómica de Masson.

**UI-** Unidades Internacionales.

**WB-** Wash buffer.





# MARCO TEÓRICO

---



## INTRODUCCIÓN

El envejecimiento de la población en la sociedad actual conlleva un aumento considerable de numerosas enfermedades articulares degenerativas. Las patologías cartilaginosas existentes, tienen una elevada incidencia en la población mundial e implican cambios degenerativos en las articulaciones provocando la pérdida de función, dolor y una discapacidad significativa, causando diariamente enormes pérdidas económicas<sup>1</sup>.

De todas las patologías articulares existentes, la artrosis es la enfermedad osteoarticular más prevalente y debilitante, afectando tanto a humanos<sup>2</sup> como a caballos<sup>3</sup>.

Según la OMS, afecta a un 9,6% de los hombres y al 18% de las mujeres con edades superiores a los 60 años. En España se estima que la padece el 17% de la población.

Según los datos del estudio epidemiológico EPISER dirigido por la Sociedad Española de Reumatología, la artrosis de rodilla tiene una prevalencia del 10,2% y la de manos afecta a un 6,2% de la población. En los próximos años se espera, por el aumento de la esperanza de vida y, por tanto, del envejecimiento de la población, que la artrosis sea la cuarta causa principal de discapacidad en el año 2020.

Las similitudes existentes entre las enfermedades articulares de humanos y caballos, han permitido extrapolar los resultados de la investigación del caballo<sup>4</sup> a los humanos. Más específicamente, los modelos de lesiones en el cartílago desarrollados en caballo, han permitido llevar a cabo intervenciones terapéuticas con gran relevancia clínica para pacientes humanos y equinos<sup>5,6</sup>.

La artrosis es una enfermedad de las articulaciones diartrodiales, y las más afectadas por esta patología son las articulaciones de las

falanges de manos, rodilla y cadera. De todas ellas, la artrosis de rodilla es la más estudiada en los ensayos clínicos.

La artrosis se produce por un desequilibrio entre los mecanismos de regeneración y degeneración del cartílago que conllevan unas determinadas manifestaciones clínicas que van desde dolor de tipo mecánico, rigidez, crujidos, al bloqueo de las articulaciones, y la inflamación local<sup>7</sup>.

El tratamiento de la artrosis ha estado centrado sistemáticamente en sus manifestaciones clínicas y, en menor grado, en su prevención dada la complicación que esto conlleva. La posibilidad de efectuar un tratamiento etiológico empieza, actualmente, a tener bases reales.

Cuando los procedimientos médicos convencionales fracasan, una posible solución al problema es el transplante de tejido cartilaginoso, pero incluso ésta, resulta imperfecta ya que requiere un donante previo, el material biológico disponible es siempre escaso y se puede producir una reacción de rechazo en el paciente transplantado.

## **1.- CARTÍLAGO ARTICULAR**

El cartílago es un tejido muy abundante en los vertebrados y es un componente fundamental del esqueleto, realizando funciones básicas en el organismo. Se caracteriza por ser un tejido conjuntivo, avascular, alinfático y sin inervación, compuesto en un 65-80% de agua y por una serie de tipos celulares, en una proporción del 1-2% del volumen total (condroblastos, condrocitos, condroclastos y fibrocondrocitos) incluidos en una matriz, que representa entre el 70-80% del peso total<sup>8</sup>.

Esta matriz es sintetizada por los condroblastos y condrocitos, y está constituida por un 60-80% de agua y electrolitos disueltos y un elevado número de proteínas, que se dividen en colágeno (10-30%),

proteoglicanos (PG) (3-10%) y proteínas no colágenas como las fibras elásticas, fibronectina, tenascina, trombospondinas y la proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa, que le confieren una gran capacidad para soportar cargas<sup>9</sup>.

El colágeno puede representar entre el 50-60 % del peso seco de la matriz extracelular (MEC) del cartílago; las matrices cartilaginosas están constituidas, principalmente, por colágeno del tipo II, siendo por tanto éste y el agregano, los principales constituyentes de la matriz extracelular<sup>10,11</sup>.

Los proteoglicanos (PGs) representan entre el 30-35% del peso seco del cartílago y están constituidos por un conjunto de glicosaminoglicanos (GAGs), que son unidades de disacáridos. Existen cinco tipos distintos de GAGs, siendo cuatro de ellos sulfatados: sulfato de dermatano, sulfato de condroitina, sulfato de heparano y queratosulfato y uno, no sulfatado: el ácido hialurónico<sup>12,13</sup>.

El ácido hialurónico (AH) posee características hidrodinámicas remarcables. Ésto 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. Debido a sus propiedades lubricantes, se utiliza en inyecciones intra-articulares, en el tratamiento del dolor asociado a artrosis<sup>14</sup>.

Los proteoglicanos de la matriz extracelular cartilaginosa, contribuyen a aportar al cartílago sus propiedades mecánicas y elásticas. Gracias a la propiedad de retención de agua, los proteoglicanos permiten que el cartílago articular se estire cuando se encuentra sometido a fuerzas mecánicas. Así se constituye una superficie fuerte y elástica como soporte de la carga, y de esta característica depende la integridad de la red de colágeno y la retención dentro de ésta de una elevada concentración de agregano rico en condroitín sulfato, los cuales aumentan la viscosidad relativa

de la matriz<sup>15</sup>. Como parte del agregado, el condroitín sulfato es el componente mayoritario del cartílago.

En las enfermedades articulares degenerativas, tales como la artrosis, se produce un deterioro y una pérdida del cartílago articular. Una fase clave en el proceso degenerativo artrósico es la pérdida de proteoglicano (formado por condroitín sulfato) del cartílago y por lo tanto, esto lleva a un mal funcionamiento mecánico del mismo<sup>16</sup>.

Al no poseer vascularización propia, el aporte de nutrientes celulares y el oxígeno proceden del líquido sinovial, y consiguen llegar a las células mediante gradiente de difusión<sup>13,17,18</sup>. De ahí que el cartílago posea una capacidad limitada de reparación, ya que es un tejido que una vez lesionado, tiene escasas posibilidades de regeneración espontánea.

Los tejidos cartilagosos están localizados en diferentes lugares anatómicos, tienen diferentes necesidades fisiológicas y están sujetos a fuerzas mecánicas específicas.

En base a ello, Bargmann subdivide al cartílago en: hialino (hyalus=cristal), fibrocartílago (muy rico en colágeno) y cartílago elástico (con una red adicional de elastina)<sup>19</sup>.

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, en el cartílago nasal, en los cartílagos costales, entre 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 a la compresión.

El cartílago articular no se osifica en condiciones normales porque no tiene condrocitos hipertróficos y 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<sup>20</sup>.

## **2.- MENISCO**

El menisco es un tejido fibrocartilaginoso con forma semilunar que se encuentra localizado entre los cóndilos femorales y la meseta tibial, en la articulación de la rodilla y participa en la compleja biomecánica de dicha articulación<sup>21</sup>.

Juegan un papel fundamental en diversas funciones como: transmitir y soportar las cargas, absorción de golpes, conferir estabilidad, lubricación, nutrición y proporcionar protección al cartílago articular<sup>22</sup>.

Es un tejido ampliamente vascularizado desde la etapa prenatal hasta los primeros años de vida, perdiendo posteriormente esta particularidad y convirtiéndose en un tejido prácticamente avascular en el adulto.

La MEC del menisco está compuesta principalmente por colágeno (75% del peso en seco) de los cuales el colágeno tipo I es el 90%, seguido de los GAGs, proteínas de adhesión y elastina en mucha menor proporción<sup>2324</sup>.

El menisco se divide en dos zonas, una externa que se corresponde con 1/3 del tejido total y está vascularizada e inervada y más rica en colágeno tipo I, mientras que la interna que son 2/3 del tejido, es avascular y carece de inervación y contiene colágeno tipo I y II en un ratio de 2:3<sup>25</sup>.

Las lesiones en el menisco presentan poca capacidad de curación debido a la naturaleza avascular del tejido fibrocartilaginoso. La



pérdida y/o daño del mismo lleva a una degeneración del cartílago y finalmente a una osteoartritis<sup>26</sup>.

La restauración quirúrgica del menisco dañado supone un gran avance debido a su escasa capacidad de regeneración. Por ello, en los últimos años, la regeneración del menisco utilizando ingeniería de tejidos es la técnica que más se está probando<sup>25,27-33</sup>, por delante de la menistectomía parcial o total ya que éstas llevan invariablemente a provocar una osteoartritis.

Los soportes cultivados con MSCs están siendo investigados como principales promotores de la regeneración, ya que es el método tridimensional que más se asemeja el ambiente *in vivo* del tejido natural.

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

La ausencia de tratamientos eficaces para defectos condrales y enfermedades articulares, ha dado lugar al desarrollo de la ingeniería de tejidos combinada con la medicina regenerativa y la terapia celular. En este contexto la ingeniería del tejido cartilaginosa, pretende ser una solución para este problema intentando alcanzar un sustituto funcional para los tejidos lesionados<sup>34</sup>.

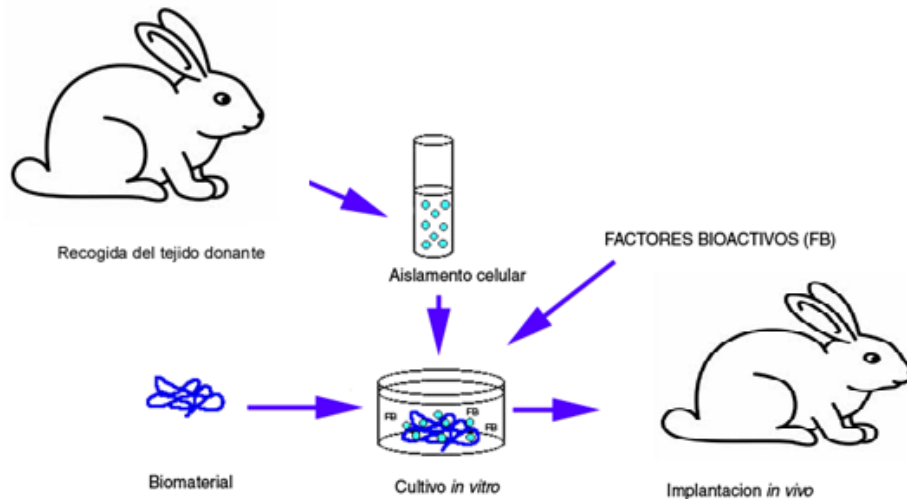
La ingeniería de tejidos surge al considerar las terapias celulares, una solución insuficiente para los problemas de regeneración de tejidos lesionados. En casos de amplias fibrosis y tejidos cicatrizales, las terapias celulares pueden fallar debido a la escasez de aporte sanguíneo y/o a la falta de receptores microambientales y mediadores biológicos, imprescindibles para sostener la diferenciación, la proliferación y función celular.

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

los 70, cuando intentó implantar condrocitos en la rodilla de un conejo. En este caso, los condrocitos crecen en un ambiente *ex vivo* y pueden ser transplantados sobre un defecto cartilaginoso. Con este estudio, se concluyó que con el uso de un biomaterial de calidad sería posible generar un nuevo tejido cartilaginoso implantable<sup>35,36</sup>.

La capacidad de regeneración está limitada sólo a unos determinados tipos de tejidos. Entendemos por **regeneración** cuando la restauración de dicho tejido posee propiedades indistinguibles del tejido original. Se entiende por **reparación** de un tejido biológico a la restauración de dicho tejido sin que éste conserve su arquitectura original, ni tampoco su función. Al no recuperar su estado original, sus propiedades mecánicas y físicas son inferiores; esta transformación ocurre espontáneamente y el resultado final es la cicatrización.

Teniendo en cuenta estas dos distinciones, lo que nos interesa es potenciar la regeneración sobre la reparación, a pesar de que los dos procesos actúan simultáneamente ante cualquier lesión de tejido blando. Las circunstancias por las que un tejido cicatriza en vez de regenerarse, dependerán del contenido de células y señales estimuladoras necesarias para dicha regeneración. Por lo tanto, uno de los objetivos de la terapia regenerativa es facilitar el ambiente externo adecuado y estimular la proliferación celular desde el momento inicial de la lesión.



**Figura 1:** Esquema de ingeniería de tejidos.

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 tejidos, tanto estructural, como funcionalmente<sup>37</sup>.

Su objetivo final es desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un determinado tejido u órgano dañado o ausente<sup>38</sup>. Tiene como base el uso de células, sustratos tridimensionales biocompatibles o sustancias inductoras de la formación de tejidos, sólo o en combinación, con el fin de restaurar la estructura y función del tejido dañado o degenerado<sup>1,39</sup>. Se trataría de utilizar como implantes, células o tejidos reconstruidos en el laboratorio, que limitando la necesidad de donantes, y aumentando la disponibilidad de material biológico y, si las células proceden del propio paciente, evitarían el rechazo, facilitando la recuperación de la funcionalidad perdida.

Con ello, esta tecnología busca nuevas terapias, en muchos casos todavía potenciales, con las cuales tejidos u órganos perdidos o con lesiones localizadas podrían ser reemplazados por tejidos reconstruidos artificialmente *in vivo* o *in vitro*, de los que

naturalmente, se espera que actúen como sustitutos funcionales de los tejidos originales.

Conseguir sustituir articulaciones al completo con todas sus estructuras mediante la ingeniería de tejidos sería un escenario ideal. Pero este es un reto muy difícil de conseguir, por el momento, debido a la gran cantidad de dificultades y barreras existentes por el conocimiento incompleto que se tiene actualmente sobre la biología del desarrollo de tejidos como el óseo, cartilaginoso u otros tejidos blandos. Sin embargo, conseguir la regeneración, o al menos mejorar el proceso de cicatrización de lesiones focales como las del cartílago articular o los meniscos, ya es una realidad.

### **3.1.- 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<sup>1</sup>.

La edad del donante, el origen y el estado de diferenciación de las células son factores fundamentales, que pueden hacer variar los resultados obtenidos en los estudios realizados hasta la fecha<sup>40-42</sup>.

El tipo celular utilizado en la ingeniería del cartílago es uno de los puntos decisivos en el desarrollo de esta disciplina. Se han investigado diferentes poblaciones celulares en estudios experimentales como las de condrocitos maduros y células troncales<sup>43</sup>.

A continuación pasamos a detallar los diferentes tipos celulares con capacidad condroprogenitora, con sus ventajas e inconvenientes, que pueden ser utilizados en ingeniería del tejido cartilaginoso.

### 3.1.1.- Condrocitos

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<sup>44</sup>.

Los condrocitos se aíslan fácilmente, pero es complicado obtener un número apropiado de células con capacidad para regenerar el cartílago completo<sup>41</sup>. Es posible expandir *in vitro* las poblaciones celulares usando técnicas de cultivos celulares, sin embargo, se observó que en monocapa, los condrocitos se desdiferencian, tomando una apariencia fibroblástica y secretan una matriz fibrosa<sup>45</sup>. Se ha demostrado que el cultivo de células en un medio tridimensional, como una matriz tridimensional porosa puede ayudar a mantener el fenotipo condrocítico<sup>44</sup>.

La dificultad de obtener una población estable de condrocitos, ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de células que se adapten mejor a las necesidades para conseguir una óptima regeneración del cartílago.

### 3.1.2.- Células troncales

Hoy en día, las terapias con células troncales están emergiendo con fuerza en el mundo de la medicina regenerativa, revelándose como una posible solución a diferentes patologías degenerativas, y teniendo ya aplicaciones terapéuticas utilizadas, a día de hoy, en la clínica.

El término de célula madre o troncal debería reservarse para aquellas que muestren una larga supervivencia *in vivo*, con capacidad de autorrenovación y regeneración de uno o más tipos celulares diferenciados<sup>46</sup>. Estas células poseen la capacidad de autorrenovarse, es decir, de formar células idénticas a las células de origen mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para

la que están programadas y por tanto, producir células de uno o más tejidos adultos, funcionales y plenamente diferenciados, en función de su grado de multipotencialidad. El término multipotencialidad se refiere a la capacidad de una célula para dar origen a distintos tipos celulares dentro de un mismo tejido o capa embrionaria.

La mayoría de los tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células troncales, que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce un daño tisular.

El uso de células madre, en adelante llamadas células troncales, para la regeneración de tejidos es una de las muchas partes que integran la ingeniería de tejidos. Su uso, supone una novedad de gran impacto a nivel científico, que comienza a imponerse como una excelente alternativa terapéutica, no sólo por la efectividad que puede presentar en este campo sino por las expectativas que ha creado en torno a sus posibles usos terapéuticos.

Una de las muchas razones que justifican esta atención, es su potencial para reparar tejidos sin generar tejido de granulación, el cual se asocia a procesos de cicatrización.

Existen diferentes tipos de células troncales que, en función de su origen y potencial de diferenciación, podemos clasificar como: células troncales embrionarias (ESCs)<sup>47</sup>, células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)<sup>48</sup> y células troncales adultas postnatales o somáticas<sup>47</sup>.

Origen	Plasticidad		Localización
Embrionarias	Totipotentes	Potencial de transformarse en cualquier tipo de células del cuerpo adulto y de las membranas extraembrionarias.	Cigoto y las 4 primeras blastómeras.
	Pluripotentes	Potencial de transformarse en cualquier célula diferenciada del organismo, excepto las membranas extraembrionarias.	Todas las otras células embrionarias del disco embrionario del blastocisto.
Adultas	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
	iPSCs	Potencial de transformarse en cualquier célula diferenciada del organismo, excepto las membranas extraembrionarias	Piel, hígado, próstata, tracto urinario, estómago

**Tabla 1:** Resumen de la clasificación de las células troncales.

### 3.1.2.1.- Células troncales embrionarias (ESCs)

Las únicas células totipotentes que existen son el cigoto o embrión unicelular y las cuatro primeras blastómeras, pues son las únicas con capacidad en sí mismas de dar origen a todas las estructuras que constituyen al individuo completo, incluso a las estructuras extraembrionarias, como puede ser la placenta. Esta es la particularidad clave que posee el cigoto frente a cualquier otro tipo de célula, por lo que decimos que es totipotente. Pero debido a la dificultad de 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<sup>49,50</sup>.

Las células troncales pluripotentes de procedencia embrionaria son aquellas que forman parte de la masa celular interna de un embrión de cuatro-cinco días de edad; en esta etapa, el cigoto se llama blastocisto y posee en uno de sus polos una agrupación celular que recibe el nombre de masa celular interna o embrioblasto que forma una prominencia dentro del blastocelo<sup>51</sup>.

Las células que la integran dan origen a todos los tipos celulares, sistemas, tejidos y órganos del individuo en formación, es decir, poseen la capacidad de dar origen a todos los tipos celulares de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) exceptuando las estructuras extraembrionarias (placenta y trofoblasto), son por ello células pluripotentes<sup>52</sup>.

Históricamente, el término de célula troncal embrionaria se introdujo en 1981 para distinguir las células embrionarias procedentes de la masa celular interna, de aquellas derivadas de teratocarcinomas, que también poseen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares<sup>53</sup>.

La ventaja del uso de células troncales embrionarias frente a las células troncales somáticas para regenerar el cartílago, es el hecho de que las células troncales embrionarias son inmortales y pueden, "teóricamente", proporcionar una fuente ilimitada de células, en nuestro caso, condrocitos diferenciados.

La parte negativa del uso terapéutico de células troncales embrionarias, es que puede dar lugar a la formación de teratomas o teratocarcinomas. Además, su procedencia alogénica es en la actualidad un gran limitante, establecida por las conocidas diferencias en el sistema del complejo mayor de histocompatibilidad. Finalmente, cuando estas células proceden de un embrión humano vivo, desde el



primer momento su manipulación y destino se ha encontrado con una fuerte oposición, basada principalmente en aspectos éticos, religiosos y políticos, debido al uso de embriones excedentarios. Los críticos defienden que estos embriones podrían dar 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 intenta dirigir, por tanto, hacia el desarrollo de métodos que eviten estos problemas éticos.

Todo ello y la dificultad de obtención de las mismas, ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de origen de células troncales.

### **3.1.2.2.- Células troncales adultas**

El término de células troncales adultas o somáticas es utilizado para definir todo tipo de célula troncal derivada de un animal en su estado postnatal. Se refiere, generalmente, a células o linaje troncales multipotentes, es decir, que sólo pueden generar gran variedad de tipos celulares, pero de su misma capa de origen embrionario.

En condiciones fisiológicas, la mayoría de los tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células troncales, que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce un daño tisular; su función principal es la de mantener la homeostasis del tejido tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

La primera evidencia de la existencia de células troncales adultas progenitoras fue descrita en el sistema hematopoyético, gracias al desarrollo de trasplantes de médula ósea realizados en ratones y cobayas, fue en los años 50, y descubrieron una población de células adherentes que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. Dichas células fueron denominadas unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU–

F). Esto permitió describir por primera vez la existencia de células troncales hematopoyéticas en la médula ósea adulta<sup>54</sup>.

Varios estudios han sugerido que la potencialidad de algunos tipos de células troncales adultas es mayor de lo esperado, pues han mostrado, en determinadas condiciones, capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes, lo que las acerca a la potencialidad de las células embrionarias<sup>55-57</sup>. Todo esto ha creado nuevas perspectivas para el tratamiento de diferentes enfermedades con células troncales adultas, lo que inicialmente se pensaba que sólo podía hacerse con las embrionarias.

Las ventajas en el uso de este grupo celular se basan en que por naturaleza resultan inmunocompatibles, mientras que por otro lado, evitan los problemas éticos relacionados con su uso. Todo ello las hace idóneas para ser utilizadas en futuras aplicaciones terapéuticas. Recientemente, este tipo celular ha centrado la atención de numerosos estudios porque son fáciles de obtener (a veces se obtienen incluso de materiales de desecho como puede ser la placenta o sangre del cordón umbilical), aislar y expandir *in vitro*<sup>58</sup>.

Las células troncales adultas son menos tumorigénicas que sus homólogas embrionarias. En cambio, la renovación y capacidad de proliferación de las adultas disminuye con la edad<sup>59</sup>. Esto, obviamente, limita el uso y el trasplante de células autólogas en el tratamiento de enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, como la osteoartritis.

### **Células Troncales Adultas Mesenquimales (MSCs)**

En las últimas décadas, varios grupos han investigado el potencial de las Células Troncales Mesenquimales o Mesenchymal Stem Cells (MSCs) en la reparación y regeneración de tejidos debido, sobre todo, a sus propiedades de multipotencialidad y a su actividad

inmunomoduladora<sup>60-62</sup>. Entre sus acciones inmunomoduladoras, las MSCs suprimen la proliferación de células T sobre estimulación mitogénica y alogénica<sup>63</sup>, inhiben la diferenciación y maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos<sup>64</sup>, inhiben la proliferación de células B<sup>65</sup> y células natural killers<sup>66</sup>.

Las MSCs pueden ser cultivadas y expandidas *in vitro* hasta 20-50 veces su población inicial en aproximadamente 10 semanas<sup>67</sup>.

El concepto de células troncales mesenquimales fue propuesto por Maureen Owen y sus compañeros basándose, en parte, en el trabajo de Alexander Friedenstein. El término fue popularizado por Arnold Caplan a finales de los ochenta y a lo largo de los 90. Su propuesta de células troncales mesenquimales fue la de unas células fibroblásticas adherentes, procedentes del mesodermo embrionario.

En la década pasada, en este campo ha habido una explosión de trabajos, centrados en las células troncales mesenquimales. Tras ellos, la célula de Caplan ya no es universalmente aceptada como célula troncal mesenquimal.

La sociedad internacional para terapia celular define las MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS (MSCs): como la denominación correcta para las células adherentes al plástico aisladas de médula ósea y otros órganos y tejidos que normalmente se denominaban mesenchymal stem cells. Fueron descritas, por primera vez, por Friedenstein<sup>68</sup>, y se aislaron inicialmente, de la médula ósea, pero recientemente y con similares características a las MSCs derivadas de médula ósea<sup>69,70</sup>, han sido aisladas de diferentes fuentes tisulares como el tejido adiposo<sup>67</sup>, líquido sinovial<sup>71</sup>, sangre de cordón umbilical<sup>72</sup>, líquido amniótico<sup>73</sup>, tejido hematopoyético<sup>74</sup>, neural<sup>75</sup>, músculo esquelético<sup>76,77</sup>, epidermis<sup>78</sup>, músculo cardíaco<sup>79</sup>, páncreas<sup>80</sup>, intestino<sup>81</sup>, hígado<sup>82</sup>, córnea<sup>83</sup> o placenta<sup>84</sup>, entre otros tipos de tejidos.

Esta amplia variedad de tejidos poseedores de células troncales, nos lleva a pensar que este tipo de células colaboran en la renovación natural de los tejidos ante patologías adquiridas o frente al envejecimiento de los mismos.

Otra de las ventajas que muestran estas células es que resultan ser no inmunogénicas, lo que las habilita para su uso como MSCs alogénicas en pacientes inmunocompetentes.

Dichas células pueden ser cultivadas *in vitro*, mostrando una proliferación ilimitada, con un envejecimiento limitado y la capacidad de diferenciarse a cualquier otro tipo de célula mesodérmica<sup>85</sup>. Además, pueden obtenerse sin ocasionar un daño irreversible y son "fenotípicamente estables" después de su almacenamiento en nitrógeno líquido, como demuestran un gran número de marcadores moleculares.

Las MSCs en primer lugar, deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar, pero hay que tener en cuenta que en un cultivo primario se adhieren otros tipos celulares como pueden ser fibroblastos, macrófagos, células reticulares, células endoteliales y células sanguíneas entre otras<sup>86</sup>. Por ello, es fundamental la caracterización final de las MSCs.

Morfológicamente, las MSCs tienen forma fusiforme con un núcleo central y son bastante heterogéneas, en los cultivos de MSCs se han descubierto hasta tres tipos de células diferentes: unas pequeñas, fusiformes y agranulares (RS-1), otras pequeñas y granulares (RS-2) y las últimas que serían grandes y granulares que son las denominadas maduras<sup>87,88</sup>.

La identificación fenotípica de las MSCs no es única, ya que comparte características con múltiples líneas celulares, incluidas mesenquimales, hematopoyéticas, epiteliales, endoteliales y musculares<sup>89,90</sup>. Por lo que es importante señalar que existen

antígenos que se expresan de manera preferente, aunque no de manera exclusiva, en las células troncales mesenquimales.

Para caracterizar a las MSCs actualmente se utiliza una batería de anticuerpos monoclonales y diferentes tipos de tinciones. Por ello, consideramos que el 95% o más de la población de MSCs debe expresar CD105, CD73 y CD90 medidos mediante citometría de flujo. Adicionalmente, estas células no deben expresar antígenos de células hematopoyéticas (igual o menor del 2%) como: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD31, CD 43, CD 56, CD 68, CD133 o CD19<sup>91-94</sup>.

Y finalmente, estas células deben ser capaces de diferenciarse en al menos tres de los linajes mesodérmicos como pueden ser: osteocitos, adipocitos y condrocitos, bajo condiciones de diferenciación *in vitro* estándar, utilizando medios de cultivo inductores de diferenciación en combinación con factores de crecimiento y citoquinas en cultivos en monocapa (2D)<sup>95,96</sup> y determinadas posteriormente mediante tinciones histológicas, inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia.

Su aislamiento y caracterización fenotípica ha sido demostrada en numerosas especies de vertebrados como en porcino<sup>97</sup>, equino<sup>98</sup>, bovino<sup>99</sup>, murino<sup>100</sup>, canino<sup>101</sup>, ovino<sup>102</sup>, e incluso humanos<sup>103</sup>.

Estudios recientes sugieren que las MSCs pueden diferenciarse, no solamente en células del mesodermo, sino también pueden adoptar un destino endodermal o ectodermal, lo que se ha denominado como plasticidad celular. La plasticidad celular se define como la capacidad de una célula para diferenciarse en células maduras distintas a las de su tejido de origen<sup>104</sup>. Se han realizado recientemente estudios que han dejado patente la capacidad intrínseca de diferenciación de estas células, a lo largo de varias rutas definidas *in vitro* (incluso de tejidos de origen no mesodérmico) como son la de los adipocitos<sup>105</sup>, células endoteliales<sup>106</sup>, células

hematopoyéticas<sup>107</sup>, células neuronales<sup>108</sup>, células musculares<sup>109</sup>, células cardíacas<sup>110</sup>, osteoblastos<sup>110</sup> y también condrocitos<sup>111,112</sup>. Por ello, se utiliza de manera indiferente el término multipotente y pluripotente para describir la capacidad de diferenciación de las MSCs en un amplio rango de tejidos de mamíferos<sup>103</sup>.

Numerosas revisiones en la literatura indican que las MSCs obtenidas de médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical no muestran diferencias en su morfología fibroblástica, fenotipo inmunológico, exitoso ratio de aislamiento de MSCs, y capacidad de diferenciación<sup>113,114</sup>.

Con el fin de uniformar una definición de las MSCs, Gimble *et al.* han sugerido que las células troncales empleadas en medicina regenerativa deberían reunir los siguientes criterios<sup>115</sup>:

1. Puedan encontrarse en grandes cantidades (del orden de millones-billones de células).
2. Puedan obtenerse por procedimientos mínimamente invasivos.
3. Puedan diferenciarse en múltiples líneas celulares de manera regulable y reproducible.
4. Puedan ser trasplantadas a un hospedador autólogo o alogénico en condiciones de seguridad y efectividad.
5. Puedan ser obtenidas de acuerdo con las Guías de Buenas Prácticas de Manufacturación.

Como posible desventaja del uso médico de estas células nos encontramos con que las células troncales mesenquimales 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 toda la vida del

individuo. Aún así, siguen siendo una buena alternativa de células troncales con finalidades terapéuticas.

### **Células Troncales Adultas Mesenquimales Derivadas de Médula ósea (BM-MSCs)**

Las MSCs residen principalmente en la médula ósea adulta<sup>116</sup> entre otros numerosos tipos de tejidos, pero a pesar de ello, hoy en día en lo que respecta a la terapia celular, las células troncales mesenquimales mejor caracterizadas y más utilizadas en la regeneración de tejidos, son las células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo debido a su elevada facilidad de extracción y aislamiento<sup>114,117</sup>.

A pesar de que las BM-MSCs fueron descubiertas por Friedenstein *et al.* con anterioridad, realmente fueron caracterizadas por Pittenger a finales de los 90 y siguen siendo las más utilizadas en ingeniería de tejido cartilaginoso<sup>89,118-120</sup>.

Las MSCs presentes en la médula ósea son células de tipo fibroblástico y adherentes que se involucran en el mantenimiento de los tejidos mesenquimales. Tienen una gran capacidad de proliferación *in vitro* y mantienen su potencial de diferenciación en líneas mesenquimales<sup>121</sup>. No presentan los problemas éticos de las ESCs y mantienen su actividad inmunosupresora<sup>122</sup>.

Estas células se extraen principalmente de la cresta ilíaca y se aíslan por un gradiente de densidad por centrifugación del que un 0,01% de la población inicial se consideran BM-MSCs<sup>123</sup>; este bajo porcentaje hace necesario expandirlas *in vitro* hasta conseguir una población suficiente para poder emplearlas en terapias posteriores<sup>124</sup>.

Recientemente, Mareschi *et al* compararon los dos métodos más utilizados para aislar BM-MSCs mediante gradiente de densidad, el Ficoll y Percoll y no descubrieron diferencias significativas en términos

de morfología, potencial de diferenciación o inmunofenotípicas entre ambos métodos<sup>125</sup>. Dado que estos métodos de separación mejoran el número de CFU-F obtenidas y mejoran el crecimiento celular, además de tener un bajo coste y facilidad de uso, se han convertido en la mejor elección como método de aislamiento de las BM-MSCs frente a otros métodos como el sorting<sup>126</sup>.

Sus principales inconvenientes se centran en que su obtención es mediante un método invasivo y doloroso, se obtiene una menor cantidad de células en cada extracción y con menor capacidad de proliferación que las ESCs<sup>127</sup>.

### **Células Troncales Adultas Mesenquimales Derivadas de Tejido Adiposo (AT-MSCs)**

A pesar de que las células de la médula ósea han sido las más estudiadas y mejor conocidas, las células obtenidas de otras localizaciones y tejidos 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<sup>113,114,128,129</sup> están siendo muy utilizadas en los últimos años.

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 célula troncal mesenquimal, a la posible infección de la herida y las complicaciones potenciales de sepsis<sup>130</sup>.

El tejido adiposo se presenta como una fuente alternativa de células troncales mesenquimales adultas con fines terapéuticos



aplicable a numerosas terapias médicas. Este tejido deriva de la capa mesodérmica embrionaria y contiene un estroma rico en células adherentes.

Las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AT-MSCs) exhiben un potencial de diferenciación *in vitro* hacia grasa<sup>131</sup>, cartílago<sup>111,132-134</sup>, músculo esquelético y cardíaco<sup>109,110,135,136</sup>, hueso<sup>137-140</sup>, células nerviosas<sup>141</sup> y vasos sanguíneos<sup>142,143</sup>, cuando son cultivadas con diferentes medios de diferenciación específicos.

Tipo de Diferenciación	Factores de diferenciación
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

**Tabla 2:** Factores utilizados experimentalmente para inducir la diferenciación de las células troncales del tejido adiposo. Adaptado de Schäffler y Büchler, 2007.

Actualmente la mayoría de los trabajos publicados se basan en células embrionarias o adultas humanas<sup>144</sup>, pero hay muy poca información acerca de la caracterización de AT-MSCs de diferentes fuentes animales. De este modo, la literatura arroja datos sobre AT-MSCs de tejido adiposo subcutáneo de ratón<sup>145</sup> o equino<sup>146,147</sup>.

Las AT-MSCs contribuyen en el campo de la bioingeniería y transplante de tejidos, tanto por su acción como células precursoras de un tipo de tejido específico, como por el refuerzo en la vascularización de la zona lesionada, ya que también pueden diferenciarse en células endoteliales vasculares, de manera paracrina, en un ambiente isquémico<sup>148</sup>.

Entre las ventajas que posee la obtención de células troncales a partir de este tejido, está que los depósitos subcutáneos de tejido adiposo son accesibles, abundantes y pueden ser repuestos, proporcionando, de esta forma, un potencial reservorio para cada individuo<sup>149,150</sup>.

Las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AT-MSCs) además de ser más fáciles de obtener y de cultivar, poseen una alta tasa de proliferación *in vitro*; en trabajos recientes han demostrado tener una baja inmunogenicidad y ser capaces de evitar la respuesta inmune<sup>85,151-153</sup>. Ésto sugiere que las AT-MSCs son tan inmuno-privilegiadas, como las células alogénicas que se utilizan en ingeniería de tejidos<sup>154</sup>.

Con el aumento de la incidencia de la obesidad en la sociedad actual, el tejido adiposo subcutáneo resulta ser un tejido muy abundante y de fácil acceso. Obtener tejido adiposo por liposucción o lipoaspirado, es menos invasivo que la obtención de médula ósea mediante aspiración de la cresta ilíaca o esternón, y además permite hacerse en una intervención ambulatoria y con anestesia local en un breve periodo de tiempo. En general, las operaciones de cirugía plástica están familiarizadas con los procedimientos de liposucción y la técnica provoca en los pacientes menores molestias y morbilidad en el lugar de donación.

Con cada aspirado se obtienen pequeñas cantidades de tejido adiposo (100-200ml) bajo anestesia local y debemos tener en cuenta que 1 gr. de tejido graso contiene aproximadamente 5.000 células troncales<sup>155</sup>. Con lo que se pueden obtener 500 veces más que el número de MSCs en 1 gr. de médula ósea<sup>130</sup>. Pueden ser aisladas rápidamente (en un período de una hora). De este modo, se puede considerar al tejido adiposo como una fuente óptima y rica en células troncales<sup>156</sup>.

Se ha demostrado previamente, que entre las células obtenidas de liposucciones de aspirados de grasa humana, contienen MSCs a las cuales, en función de su origen, se les denominan células troncales humanas derivadas de tejido adiposo (hMSCs)<sup>150,156</sup>. Además, existen numerosos y exitosos estudios realizados acerca de la regeneración de tejidos *in vivo*, y de reparación primaria de heridas utilizando este tipo de células<sup>157-161</sup>.

Se observa en la literatura que existe una enorme diversidad de métodos de obtención de este tejido, en relación con la especie animal, el procedimiento quirúrgico y con el lugar de obtención del tejido adiposo (Tabla 3).

ESPECIE DE RECOGIDA	LOCALIZACIÓN	FORMA DE RECOGIDA	AUTOR
<b>Humano</b>	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	Oedayrajsingh-Varma <i>et al.</i> , 2006
	Grasa infrapatelar	Recesión quirúrgica	Liu <i>et al.</i> , 2006
<b>Conejo</b>	Tejido Adiposo Cervical	Recesión quirúrgica	Wei <i>et al.</i> , 2006
	Tejido adiposo paraescapular	Recesión quirúrgica	Dragoo <i>et al.</i> , 2007
<b>Rata</b>	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
<b>Ratón</b>	Grasa inguinal	Recesión quirúrgica	Xu <i>et al.</i> , 2007
<b>Caballo</b>	Grasa glútea	Recesión quirúrgica	Carvalho <i>et al.</i> , 2009

**Tabla 3:** Métodos de recogida utilizados en la obtención de las células troncales del tejido adiposo.

La gran capacidad de estas AT-MSCs para diferenciarse en células miogénicas, condrogénicas, endoteliales y otras líneas celulares, las presenta como una herramienta con un enorme potencial en terapia regenerativa, para la reparación de defectos tisulares de líneas mesenquimales. En concreto, su capacidad para diferenciarse en condrocitos y producir una matriz extracelular característica de cartílago, frente a las limitaciones de los condrocitos adultos, representan un enfoque atractivo y prometedor para la terapia regenerativa de cartílago.

La diferenciación condrogénica de las AT-MSCs es un punto crítico en el éxito de la ingeniería de tejido cartilaginoso. La condrogénesis tiene tres estadios fundamentales: condensación, proliferación y diferenciación, todos ellos regulados por una red multifactorial de rutas metabólicas en la que se incluyen citoquinas, hormonas, y factores de crecimiento, con un papel fundamental en el desarrollo del tejido a implantar<sup>162,163</sup>.

Como la condrogénesis y la osteogénesis son procesos interconectados, están involucrados en la diferenciación osteogénica numerosas citoquinas y factores de crecimiento que inducen la diferenciación a cartílago<sup>164</sup>.

En estudios recientes, se han desarrollado protocolos de diferenciación condrogénica de AT-MSCs *in vitro*, en los cuales se incluyen miembros de la superfamilia de factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), los cuales favorecen la producción de colágeno tipo II<sup>112</sup>. También se ha demostrado que las AT-MSCs transfectadas con TGF- $\beta$ 2 conducen a líneas condrogénicas<sup>165</sup>.

En estudios recientes, se ha demostrado que las AT-MSCs, que provienen de animales de mayor edad, muestran cambios y disminución de la proliferación y diferenciación celular<sup>166</sup>. Ésto se convertiría en un factor limitante y abriría la puerta a la obtención

adecuada de AT-MSCs jóvenes como fuente de células troncales de tejido adiposo.

### **Células Troncales Pluripotentes Somáticas inducidas (iPSCs)**

Varios artículos publicados en los últimos años han puesto de manifiesto una nueva vía de obtención de células troncales: la obtención de células troncales pluripotentes a partir de células de la piel de individuos adultos totalmente diferenciadas. Las células troncales así obtenidas se denominan células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs).

Shinya Yamanaka en agosto de 2006, introdujo una nueva técnica, la cual, mediante transfección en fibroblastos embrionarios de ratón, obtenía la expresión simultánea de un reducido grupo de genes: Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc que permitían inducir células con características de células troncales pluripotentes embrionarias, pero a partir de células somáticas, es decir, se producía una reprogramación celular<sup>162</sup>.

Las primeras informaciones de iPSCs en humana surgieron a finales de año 2007<sup>167</sup>.

Los investigadores han utilizado diferentes técnicas para inducir la expresión de los factores de pluripotencia en varios tipos de células adultas. El método más común es la transducción génica utilizando retrovirus y más recientemente lentivirus portadores, de forma individual o combinada, de las secuencias génicas de los 4 genes<sup>168</sup>. En los estudios animales, los virus utilizados para la transducción génica, en algunos casos han dado lugar a oncogenes, por lo que se está intentando buscar estrategias no virales.

Las iPSCs han sido obtenidas de células adultas de diferentes localizaciones como piel, estómago, hígado, células prostáticas y del tracto urinario<sup>169</sup>.

La inducción de pluripotencialidad en células somáticas maduras mediante tratamiento con factores definidos, ha creado nuevos cauces dentro de la investigación básica, modelos de enfermedades y medicina regenerativa<sup>167</sup>.

Pero a pesar de que esta técnica se presenta como la gran alternativa en terapia celular, también tiene grandes inconvenientes para su aplicación clínica; uno de ellos, es la ineficacia de su obtención a partir de células de la piel, ya que puede variar entre el 0,001 y el 0,1 %, dependiendo del sistema utilizado; además, a pesar de ser células autólogas están demostrando problemas de histocompatibilidad que, hasta el momento, no se han podido solventar<sup>170</sup>.

Aunque, el potencial terapéutico de las ESCs y de las iPSCs es enorme debido a su capacidad de reproducción y pluripotencia, hay aún algunas limitaciones a su uso práctico, que incluyen desde la regulación celular, a consideraciones éticas y de manipulación genética<sup>168,171,172</sup>. Por ello, es necesario tener otra fuente de células troncales con posibilidades reales de usos clínicos.

### **3.2.- Criopreservación celular**

Sin embargo, existe un importante condicionante que impide la aplicación generalizada de estas terapias celulares y es que, en la práctica, nos encontramos con un lapso de tiempo, más o menos largo, entre la extracción del tejido y la utilización celular, por lo que adquiere una especial relevancia mejorar la conservación y almacenamiento de este tipo celular.

Uno de los métodos que se pueden emplear para solucionar este problema, es la llamada criopreservación.

La criopreservación confiere numerosas ventajas para los profesionales que utilicen terapias celulares, entre ellas el facilitar el



transporte de las células troncales, obtener un grupo de células suficiente para alcanzar la dosis necesaria y ganar tiempo para conseguir los test de calidad y seguridad requeridos antes de su uso clínico.

La criopreservación se presenta como un método factible para la conservación de las células en suspensión, en nitrógeno líquido, en congelación, a muy bajas temperaturas (-196°C), durante largos períodos de tiempo, de manera que mantengan la estructura, viabilidad y multipotencialidad de las células<sup>173</sup>.

A esas temperaturas, las células no tienen demandas metabólicas y están protegidas de las infecciones y de las variaciones biológicas debidas a la deriva genética durante años<sup>174</sup>.

Pero a pesar de todas estas ventajas, nos encontramos con un grave inconveniente y es que la congelación en sí, resulta letal para las células debido a dos efectos principales, por un lado, la formación de cristales de hielo que daña de manera mecánica la estructura de la célula, destruyendo la membrana celular y la membrana de los orgánulos celulares, y por otro lado, la desnaturalización de las proteínas celulares<sup>175</sup>; todo ello hace imprescindible el uso de sustancias crioprotectoras que reduzcan la cantidad de hielo formado y aumenten la concentración de solutos en la fase líquida de la célula.

Una vez definido el procedimiento, hay que determinar cuál es el método de criopreservación más adecuado para mantener la capacidad de diferenciación de las MSCs tras un ciclo de congelación y bajo condiciones de almacenamiento y posterior descongelación. Se persigue mantener las características morfológicas y funcionales de estas células, lo cual resulta esencial en la investigación clínica y preclínica para asegurar la efectividad del producto<sup>176,177</sup>.

Cada tipo de célula exhibe un comportamiento individual durante los procesos de congelación-descongelación, por lo que cada tipo

celular requiere un protocolo específico de criopreservación<sup>178</sup>. Por ello, para maximizar el potencial de los aspirados adiposos o de médula ósea como fuente de células troncales, es muy importante optimizar los protocolos para su preservación<sup>179</sup>.

Existen numerosos parámetros a tener en cuenta en los diferentes protocolos de congelación siendo los más importantes la velocidad de enfriamiento (°C/min) y el uso de compuestos que tienen propiedades crioprotectoras como el dimetilsulfóxido, propanodiol, glicerol...<sup>180</sup>, que protegen a las células durante el proceso de criopreservación.

Estos compuestos actúan a dos niveles, por un lado estabilizando la membrana celular y por otro minimizando los efectos osmóticos que destruyen las células.

En un principio, han sido criopreservadas células troncales embrionarias incluyendo ratón<sup>181</sup>, cerdo<sup>182</sup>, humanos y primates<sup>183</sup>, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como principal crioprotector. El DMSO suele utilizarse a concentraciones de 10% y con frecuencia combinado con suero fetal bovino a diferentes concentraciones. El principal inconveniente del DMSO es su toxicidad a temperaturas superiores a 4°C, por lo que conviene eliminarlo previo a la reconstitución de las células.

En un estudio posterior, se desarrolló un método óptimo de criopreservación de células troncales hematopoyéticas progenitoras y, con el fin de eliminar las características tóxicas de las elevadas concentraciones de DMSO, se añadieron bajas concentraciones de trealosa<sup>184</sup>.

La trealosa contribuye a la protección de los organismos frente al estrés por frío inducido. Su modo de protección, consiste en aumentar la viscosidad citoplasmática y así disminuir la posibilidad de

formación de cristales intracelulares, lo cual suele ser fatal para la célula<sup>185</sup>.

Otros métodos incluyen medios de congelación libres de suero<sup>140,141,177,186</sup>, han sido utilizados para conservar la fracción estromal vascular (FEV) de tejido adiposo y demuestra que se mantiene la viabilidad celular post-congelación y la capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, incluso en ausencia total de suero y DMSO, pero con un 10% de polivinilpirolidona en medio de cultivo estándar.

En la misma línea de investigación Liu *et al*, demostraron que las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo criopreservadas, podían ser utilizadas como fuente celular con fines terapéuticos en ingeniería de tejidos<sup>154</sup>.

Todo ello nos ha hecho enfocar una parte de nuestro trabajo a determinar cuál es el método más idóneo para preservar las células troncales mesenquimales, de manera que se mantengan sus características multipotentes y diferenciadoras tras un proceso de congelación-descongelación, comparándolas con unos controles previos de células no criopreservadas.

### **3.3.- Matrices utilizadas en ingeniería del tejido cartilaginoso**

Para conseguir la reparación de tejidos, resulta imprescindible que las células persistan en la zona lesionada o en el tejido a reparar, el mayor lapso de tiempo posible, por ello se busca la manera de vehicular las células hacia la zona lesionada mediante soportes que sirvan como andamio para el tejido neoformado.

En contraposición con los sistemas de cultivo celular convencionales en 2D, los moldes tridimensionales proporcionan un sustrato de adhesión celular que no sólo sirve como un soporte físico

para las células cultivadas *in vitro*<sup>187,188</sup>, sino también para la regeneración tisular *in vivo*<sup>148</sup>.

El diseño de matrices artificiales, que simulen el microambiente tisular *in vivo* y que regulen una diferenciación adecuada de las células troncales, es una estrategia prometedora para futuras aplicaciones terapéuticas<sup>189</sup>.

En cuanto a los materiales utilizados como soportes celulares, hay que señalar que no todos obtienen buenos resultados, por ello deben cumplir varios requisitos para maximizar las posibilidades de una regeneración exitosa, como la biodegradabilidad para ser eliminados fácilmente por el organismo, además, el soporte debe degradarse de manera que permita un óptimo crecimiento celular y regeneración tisular<sup>96</sup>.

Otro requisito a tener en cuenta es la biocompatibilidad con los fluidos y tejidos circundantes, lo que facilita el crecimiento del tejido funcional deseado<sup>190,191</sup>.

Entre los numerosos parámetros a tener en cuenta para optimizar la correcta formación de un tejido funcional, es sumamente importante que el soporte permita una buena adhesión celular que favorezca la formación tanto de tejido como de matriz extracelular, en el caso del tejido cartilaginoso que nos compete en el presente estudio, además es necesario, partir de un elevado número de células en la siembra inicial, que permita la distribución de las mismas a través del soporte por completo<sup>192</sup> para prevenir la formación de tejido fibroso no deseado<sup>193</sup>.

El biomaterial utilizado debe ser fácilmente procesado en su estructura, forma requerida y que resista los procesos de esterilización<sup>194</sup>. Finalmente, es importante que el biomaterial tenga propiedades mecánicas que permitan una buena implantación y experimentos de carga *in vivo*<sup>195,196</sup>.

También es importante que posea un grado de la porosidad suficiente que facilite la difusión de nutrientes, gases y factores de diferenciación y que, a la vez, permita la migración celular. Además, es necesario que posea la dureza suficiente para mantener la estabilidad del soporte y sus células durante el cultivo *in vitro* o el trasplante *in vivo*<sup>197</sup>.

Por otro lado, se ha visto que ciertos soportes necesitan requerimientos específicos para interactuar fuertemente con la matriz extracelular, como puede ser la utilización de factores de crecimiento y receptores de superficie celular, los cuales están siendo examinados por su capacidad para permitir un fácil trasplante mediante la proliferación, diferenciación y mantenimiento de las células cultivadas *in vitro*<sup>197</sup>.

La implantación del soporte en el defecto debe hacerse de manera mínimamente invasiva, para que pueda adaptarse y fijarse a la forma anatómica del defecto a reparar; como ventaja final destacar que no son excesivamente caros y reducen la morbilidad y el tiempo de recuperación<sup>198</sup>.

La variedad de materiales utilizados en ingeniería de tejidos aumenta de día en día para mejorar la regeneración y recuperación del tejido a reparar. Hay disponible una amplia variedad de biomateriales, que se pueden clasificar en diferentes categorías: polímeros naturales o sintéticos, matrices proteicas o no, que sean biodegradables o no.... En la siguiente tabla exponemos un breve resumen de los innumerables materiales que se pueden utilizar en ingeniería de tejidos.

Tipo de biomaterial		Referencias	
Naturales	Matrices a base de proteínas	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
	Matrices a base de polisacáridos	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
	Sintéticos	Biodegradables	Ácido poliglicólico
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
No Biodegradables		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

**Tabla 4:** Tipos de matrices utilizadas en ingeniería de tejidos de cartilago. Adaptado de Vinatier, 2007.

Cada material ofrece una química única, composición y estructura, perfil de degradación y la posibilidad de modificación. El papel del soporte ha cambiado desde un transportador pasivo a una matriz bioactiva, que puede inducir el comportamiento celular deseado. Es posible diseñar materiales a medida para aplicaciones específicas.

### 3.3.1.- Hidrogeles

Entre los materiales más utilizados se encuentran los hidrogeles tanto biológicos como sintéticos, si bien son éstos últimos los que están ganando campo debido a la dificultad de definir la composición exacta de los hidrogeles biológicos.

Muchas de las actuales estrategias en ingeniería de tejidos se basan en el uso de los hidrogeles, los cuales permiten numerosas aplicaciones como la fijación y expansión celular<sup>199</sup>, liberación de factores solubles<sup>200,201</sup>, y mejora de las propiedades de los sistemas de liberación controlada<sup>202,203</sup>, que contribuyen a la reparación de tejidos.

Proporcionan una serie de ventajas para la ingeniería de tejidos como es la inyección mínimamente invasiva en las construcciones híbridas de hidrogel/células<sup>204</sup>. Varios investigadores han estudiado la capacidad de los hidrogeles de alginato y agarosa para actuar como material de soporte para los condrocitos en la regeneración de tejido cartilaginoso<sup>205-207</sup>. Mientras que muchos de estos estudios demostraron que el alginato y la agarosa favorecen el mantenimiento del fenotipo condrocítico *in vitro*, el éxito de las aplicaciones en ingeniería de tejidos, que utilizan estos hidrogeles, puede verse obstaculizado por sus pobres propiedades biomecánicas y sus características de manipulación. Por otra parte, la capacidad de estos hidrogeles en la diferenciación condrogénica de las células mesenquimales adultas ha sido menos estudiada<sup>111,208</sup>. Otros tipos de

hidrogeles se componen de: elastina, colágeno, ácido hialurónico, incluso polímeros como el polietilen glycol o polivinil alcohol cuya composición resulta estable y conocida y son de fácil manipulación y con mejores propiedades biomecánicas.

La elastina es el componente más importante de las fibras elásticas y el responsable para la elasticidad y resistencia a la deformación en varios órganos (pulmón, piel, ligamentos y grandes vasos sanguíneos). Ha sido considerada como un biomaterial muy atractivo en la ingeniería de tejidos debido a su estabilidad, propiedades inherentes de retroceso elástico y a la capacidad de auto-ensamblaje bajo condiciones fisiológicas<sup>209</sup>.

La elastina es también conocida como una de las proteínas más hidrófobas por ser altamente reticulada (a través de desmosinas e isodesmosinas), lo que la hace claramente insoluble, estable, y resistente a un ataque proteolítico<sup>210,211</sup>.

El proceso de auto-ensamblaje, también conocido como coacervación, tiene lugar cuando las proteínas de elastina adquieren una estructura más ordenada a altas temperaturas y el agua que rodea los dominios hidrofóbicos se libera para compensar la pérdida de entropía<sup>212,213</sup>. Este comportamiento inteligente, que es reversible, se puede aplicar en liberación de fármacos porque envuelve de moléculas de agua a la estructura en forma de andamio.

### **3.3.2.- Ácido poliláctico**

Entre los materiales sintéticos, se han probado una gran variedad de moldes tridimensionales biodegradables como sustitutos artificiales de la matriz extracelular. Entre ellos hemos elegido el OPLA<sup>®</sup> (discos de ácido poliláctico).

El ácido poliláctico es un poliéster alifático que pertenece a un grupo alfa-hidroxi<sup>196</sup>. En la ingeniería de tejidos de cartílago, es



bastante utilizado debido a su eficacia como transportadores de células *in vivo* e *in vitro*<sup>214</sup>.

El OPLA<sup>®</sup> es un material biodegradable, poroso y de uso común en la ingeniería de tejidos<sup>215</sup>, ya que puede ser eliminado del cuerpo por vías metabólicas naturales y es relativamente inofensivo para las células y tejidos<sup>216</sup>.

Este material tiene múltiples propiedades que le hacen ser un buen candidato para ser utilizado en la regeneración del cartílago, entre ellas destacan la lenta biodegradabilidad, su estructurada rígida y la facilidad de adhesión celular, esto hace que se favorezca el crecimiento celular y la formación de matriz extracelular<sup>217</sup>.

### **3.3.3.- Matrigel<sup>®</sup>**

En ingeniería de tejidos ha sido muy utilizada últimamente, una membrana de matriz extracelular (BD Matrigel<sup>®</sup> Basement Membrane Matrix) que ha demostrado una alta eficacia en la adhesión y diferenciación celular. El Matrigel<sup>®</sup>, es una matriz de membrana basal secretada por las células del sarcoma del ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), el cual es rico en proteínas de la matriz extracelular.

La capacidad de Matrigel<sup>®</sup> para estimular el comportamiento de la célula, es una consecuencia de su composición heterogénea. Este material, una vez aislado, se compone de aproximadamente un 60% de laminina un 30% de colágeno IV y un 8% de entactina. La cual actúa de molécula puente con los otros dos componentes contribuyendo a la organización estructural de la matriz extracelular.

También contiene heparin sulfato proteoglican, plasminógeno, TGF- $\beta$ , otros factores de crecimiento, y trazas de metaloproteasas. Todo ello promueve tanto la adhesión, como la proliferación y diferenciación celular.

### 3.3.4.- Colágeno

Dentro de los materiales porosos utilizados en ingeniería de tejidos destacan los contruidos a partir de colágeno tipo I, éste tiene estructuras entrecruzadas en forma de andamios y se ha demostrado que sirven para mejorar las características físicas, proteolíticas, dan estabilidad mecánica, y son compatibles con las células<sup>218</sup>. La introducción de un elemento elástico en estas estructuras, por ejemplo, la elastina, podría proporcionar un componente dérmico y aumentar la flexibilidad y la elasticidad sin afectar a la resistencia de las estructuras de degradación.

El Zimmer Collagen Repair Patch<sup>®</sup> es un implante biológico consistente en un soporte acelular de colágeno tipo I y elastina derivado del tejido dérmico porcino<sup>219</sup>.

Este material mantiene la estructura tridimensional natural del colágeno/elastina de la dermis, en contraste con la débil estructura de las láminas de colágeno elaboradas a partir de colágeno reconstituido. Permite la infiltración celular y se integra perfectamente con los tejidos conectivos circundantes.

Es resistente a la degradación enzimática por colagenasa, tiene una larga vida biológica, es biocompatible, y se adapta fácilmente a las características mecánicas del lugar de implantación debido a que tiene una estructura química reticulada, lo que le confiere su dureza y estabilidad.

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<sup>220</sup>.

Tras los sucesivos lavados que conlleva el proceso, este tipo de soporte pierde los restos celulares, lo cual hace que se minimice la

respuesta celular causante de problemas de histocompatibilidad. Otra característica favorable es la facilidad de sutura y manejo<sup>221</sup>.

Este biomaterial serviría como soporte para dirigir la formación del nuevo tejido, con un aumento de la matriz extracelular, una organización y biomecánica comparables a los del tejido sano.

Con todos los antecedentes descritos, podemos asegurar que la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos se perfilan como herramientas de gran utilidad en este campo, pero no podemos dejar de tener presente que aún existen muchos interrogantes sin resolver, lo cual hace necesario seguir investigando en esta dirección.

## **OBJETIVOS**

---



## HIPÓTESIS

La combinación de un biomaterial y células troncales mesenquimales podrían ser de utilidad para la reparación de defectos osteocondrales. Las células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo, creemos que serían una buena alternativa como fuente celular en la terapia regenerativa, a las células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea.

## OBJETIVOS

Para responder a la hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos.

### 1.- GENERALES

Evaluar de forma comparativa la eficacia de la ingeniería tisular con varios biomateriales y células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo y médula ósea de caballo. Tratamiento de un defecto meniscal en un modelo *in vivo* de caballo, con construcciones híbridas formadas por un biomaterial y células troncales mesenquimales. Para hacer todas las pruebas *in vitro* utilizamos como modelo animal la rata, por la facilidad de manejo de estos animales, la posibilidad de mantenerlos en número elevado y la disponibilidad de reactivos específicos para esta especie en el mercado.

### 2.- ESPECÍFICOS

2.1.- Cultivo y caracterización de las células troncales mesenquimales adultas procedentes tanto de médula ósea como de tejido adiposo de rata y de caballo.

- Identificación de los marcadores de células troncales.
- Demostración de la multipotencialidad de estas células.

2.2.- Definir el mejor protocolo de criopreservación para las células troncales mesenquimales.

- Determinación de la viabilidad pre y post-congelación de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
- Determinación de la curva de crecimiento.
- Determinación de la multipotencialidad de las células troncales tras la congelación.

2.3.- Evaluar la influencia de diferentes biomateriales (colágeno tipo I, ácido poliláctico, hidrogel de elastina, Zimmer<sup>®</sup> y Matrigel<sup>®</sup>) en el comportamiento y viabilidad de las células troncales procedentes del tejido adiposo y médula ósea.

2.4.- Desarrollar un modelo de regeneración de menisco tras realizar un implante autólogo *in vivo* de un biomaterial, sembrado con células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea y de tejido adiposo, cultivadas *in vitro*.

- Evaluar los resultados macroscópicos e histológicos, comparando los meniscos tratados con células troncales mesenquimales y sin ellas.
- Analizar si existen diferencias significativas entre la capacidad regenerativa de las células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo y de médula ósea. Evaluar las diferencias potenciales entre ambos tipos celulares en aplicaciones específicas de regeneración tisular.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---





## 1.- MATERIALES

En el presente trabajo hemos empleado diferentes especies animales y biomateriales que detallamos a continuación.

### Animales

Los protocolos utilizados en todos los estudios, han sido realizados de acuerdo con las Guidelines of the European Union Council (86/609/EU), respetando la legislación española (BOE 67/8509-12,1998) sobre el uso de animales de laboratorio, y fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de León.

Empleamos 10 machos de **rata** (*rattus norvegicus*) de la raza Sprague-Dawley. Estos animales tenían una edad de 9 meses y una media de 550 g de peso, procedentes del Animalario de la Universidad de León, en el cual se observan las normas establecidas en relación con la experimentación animal. De ellas se obtuvieron AT-MSCs.

Hemos empleado 6 **yeguas** (*Equus ferus caballus*) de la raza Hispano-Bretón, con una edad de  $5 \pm 2$  años y con un peso aproximado de 350-400 kg. De ellas se obtuvieron células troncales mesenquimales de médula ósea y tejido adiposo subcutáneo. La obtención de las muestras se realizó siguiendo los protocolos de bienestar animal (SECAL).

### Biomateriales

Para realizar el estudio se utilizaron cuatro tipos diferentes de biomateriales como moldes tridimensionales sobre los que sembrar las células:

**-ZIMMER** (BioMend®): Este biomaterial es una membrana reabsorbible de colágeno tipo I, con un tamaño de poro de 0,004  $\mu\text{m}$  y medidas de 5 cm x 10 cm x 1,5 cm. Es una matriz no

friable, compacta, blanca, fabricada a partir de tendón de Aquiles bovino. Mantiene la estructura natural y tridimensional del colágeno-elastina de la dermis. Es resistente a la degradación enzimática y se almacena a temperatura ambiente. Fácilmente suturable. Permite la infiltración celular y se integra bien en los tejidos conectivos circundantes.

**-HIDROGEL:** En este estudio se empleó un soporte de proteínas recombinadas llamado "elastin-like recombinamers" (ELRs). Este material es un disco compacto, blanquecino y liofilizado de elastina fabricado por el Instituto de Investigación BIOFORGE (UVA).

Se elaboró mediante técnicas de ingeniería genética y se purificó por precipitación reversible bajo severos ciclos de temperatura, y tras un complejo sistema de elaboración, posteriormente fue dializado con agua milliQ y finalmente fue sometido a una rápida congelación en nitrógeno líquido y liofilizado<sup>222</sup>.

**-OPLA** (BD Bioscience®): Discos compactos formados por un polímero sintético de ácido poliláctico.

**-MATRIGEL** (BD Bioscience®): Gel formado por una mezcla de proteína gelatinosa secretada por Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma de células de ratón. Esta mezcla se compone en su mayor parte por laminina, seguida de colágeno tipo IV, heparán sulfato y entactina.

## **2.- OBTENCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO Y MÉDULA ÓSEA EN RATA Y CABALLO**

### **2.1.- Obtención de tejido adiposo de rata**

Las **ratas** fueron eutanasiadas mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital (Dolethal®) 2ml/animal. Se rasura y limpia la zona abdominal e inguinal. Se realiza un corte longitudinal a

lo largo de la línea alba y se extrae la grasa subcutánea de la región abdominal e inguinal mediante biopsia de una muestra aproximadamente de 2 a 5 gramos.

Una vez obtenidas las biopsias del tejido adiposo, se procedió seguidamente a practicarles una serie de lavados con PBS estéril. Este proceso se realizaba en condiciones estériles en campana de flujo laminar (Telstar®) y manteniendo las muestras en PBS (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 posterior.

## **2.2.- Obtención de médula ósea de caballo**

Se realiza un protocolo de sedación para caballos con una combinación de Romifidina (Sedivet®) a dosis de 0,04 mg/kg iv y Butorfanol (Torbugesic®) a dosis de 0,015 mg/kg iv. Ecográficamente se localizan y se marcan los espacios interesternebrales situados entre las cuatro esterneras más caudales. Las punciones se realizarán a media distancia entre marcas, que es donde se encuentran las esterneras, evitando la punción de la última esternebra por ser más fina y frágil.

A continuación, se rasura y prepara, de forma estéril, una zona de 10 cm de ancho sobre el área ventral del esternón. Se infiltran 5 ml de anestésico local (Lidocaína® 2%), a lo largo de los puntos de aspiración. Se preparan 2 jeringas de 10 ml con 0,5 ml de heparina (5000 UI/ml). Se introduce la aguja de Jamshidi a través de la incisión y se avanza hasta que contacta con la superficie de la esternebra. El trócar central se retira entonces de la aguja. La médula ósea no fluye espontáneamente de la aguja, por lo que es necesario una suave aspiración con una jeringa. La primera jeringa, precargada de heparina, se conecta a la aguja de Jamshedi, aspirando

suavemente 9,5 ml de médula ósea (llegando así a un volumen total de 10 ml). La muestra se agita suavemente en la jeringa para garantizar la mezcla con el anticoagulante, ya que la médula ósea coagula de forma rápida. La aguja de Jamshedi se retira totalmente y se introduce, de la misma forma, en el segundo espacio más caudal al primero. Se rellena la 2º jeringa precargada con 9,5 ml de muestra.

### **2.3.- Obtención de tejido adiposo de caballo**

Se lleva a cabo un protocolo de sedación de los caballos mediante una combinación de Romifidina (Sedivet®) a dosis de 0,04 mg/kg iv y Butorfanol (Torbugesic®) a dosis de 0,015 mg/kg iv.

Se rasura y limpia de forma estéril la región glútea dorsal, y se realiza un bloqueo anestésico en L invertida infiltrando anestésico local (lidocaína® 2%) en el tejido subcutáneo. Se realiza una incisión de 15 cm paralela a la columna vertebral y a 15 cm abaxial a la columna vertebral. Se separan los bordes de la incisión y se recoge el tejido subcutáneo subyacente situado sobre la fascia glútea superficial, hasta completar un volumen total de 15 ml de tejido.

Finalmente la incisión se sutura en dos planos, el subcutáneo con material de sutura reabsorbibles y la piel con material de sutura no reabsorbibles.

## **3.- AISLAMIENTO DE MSCs**

### **3.1.- Aislamiento de BM-MSCs**

El aspirado de médula ósea se fracciona sobre un gradiente de densidad Ficoll mediante centrifugación.

Se colocan en un tubo 5 ml de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare®) y a continuación se añaden 4 ml del aspirado de médula ósea con una micropipeta, de manera que la punta toque la pared del

tubo para depositar el contenido sobre el Ficoll, con cuidado de no alterar la interfase.

Se centrifuga a 1.200 rpm durante 20 minutos, y se observa la formación de 3 capas visibles. La superior está compuesta por el plasma y las plaquetas, la capa intermedia que es donde se ha quedado el Ficoll, y la inferior donde se han depositado los eritrocitos. Nuestro interés se centra en las dos capas superiores, que recogemos con una micropipeta con cuidado para no recoger nada de la capa inferior.

Centrifugamos a 1.000 rpm durante 15 minutos hasta conseguir un pellet que resuspendemos en 8 ml de PBS.

Centrifugamos de nuevo a 1.000 rpm durante 15 minutos, eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en medio de cultivo DMEM con un 10% de SFB y 1% de solución antibiótica-antimicótica y se siembra en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

### **3.2.- Aislamiento de AT-MSCs**

El proceso lleva varios pasos: para el cultivo de células troncales mesenquimales de tejido adiposo, se llevó a cabo la disociación de los fragmentos procedentes de las biopsias de grasa depositándolos en un matraz de vidrio de 50 ml con 25 ml del siguiente medio de disociación:

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma<sup>®</sup>).
- 0,075 % de colagenasa tipo I (Sigma<sup>®</sup>).

Posteriormente se procede a la disociación, en agitación, durante 2 horas a 37°C de las muestras de grasa. Una vez disociadas las células, para bloquear la actividad enzimática, se añade una solución de DMEM con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma<sup>®</sup>). La suspensión celular resultante, fue centrifugada a 1.200 rpm durante

10 minutos con el fin de separar la grasa flotante del pellet celular. Este pellet celular es denominado fracción estromal vascular (FEV)<sup>156</sup> o lipoaspirado procesado (LPA).

Eliminamos la capa superficial del centrifugado con mayor cantidad de residuos.

Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en medio de cultivo DMEM con un 10% de SFB y 1% de solución antibiótica-antimicótica.

Y ya tenemos la suspensión celular lista para la siembra.

## **4.- TÉCNICAS DE CULTIVO Y EXPANSIÓN DE BM-MSCs Y AT-MSCs**

A partir de la suspensión de células obtenidas en los puntos anteriores, tanto de células de médula ósea como de tejido adiposo, realizaremos los siguientes pasos:

### **4.1.- Cultivo en monocapa**

Contaje celular en cámara de Neubauer y determinación de la viabilidad celular mediante tinción de exclusión con Trypan blue 0,02% (Sigma<sup>®</sup>). De esta manera, sembraremos una densidad conocida de células viables.

Las células se siembran en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con el medio de cultivo, incubándose toda la noche a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo DMEMc (medio completo) consta de:

-89% DMEM

-10% SFB

-1% solución antibiótica-antimicótica (Sigma<sup>®</sup>)

Tras 24 horas en cultivo, se realiza un lavado abundante con PBS para eliminar los restos y las células sanguíneas no adherentes. Las

células fueron cultivadas hasta adquirir una monocapa confluyente, en frascos de cultivo (Nunc<sup>®</sup>) de 75 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 una confluencia del 80%, en 3-4 días de cultivo, se llevó a cabo la tripsinización de las monocapas. Para ello se lavaron los frascos con 10 ml de PBS; a continuación se añadieron 6 ml de una solución conteniendo 0,05 g de tripsina 1:250 (DIFCO<sup>®</sup>) y 0,02 g de EDTA (Sigma<sup>®</sup>) en 100 ml de PBS. Se mantuvieron en tripsinización durante 5-10 minutos a 37°C.

Una vez desprendidas las células del sustrato plástico, se neutraliza la tripsina con 6 ml de una solución de medio completo y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos, tras eliminar el sobrenadante se resuspende el pellet en 1 ml de medio completo y se realiza una siembra en frasco de cultivo; se hacen numerosos pases hasta obtener el número de células deseado.

#### **4.2.- Cultivo sobre biomateriales**

Cortamos los biomateriales (Zimmer<sup>®</sup>, OPLA<sup>®</sup>, e Hidrogel) hasta obtener un trozo de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> de tamaño.

Los colocamos en placas de 24 pocillos y sobre ellos añadimos una suspensión celular de  $0,5 \times 10^6$  en 100µl de: 89% DMEM con un 10% de SFB y 1% de solución antibiótica-antimicótica. Lo dejamos en incubación, una hora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>; de esta manera permitimos que las células se fijen al biomaterial al ser absorbidas por el mismo y evitando que se depositen en el fondo del pocillo.

Posteriormente, añadimos 900 µl de medio de cultivo completo y mantenemos el biomaterial en cultivo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 días, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.



La siembra en el Matrigel<sup>®</sup> se realiza con 100  $\mu$ l de Matrigel<sup>®</sup>, previamente licuado a -20°C durante 24 horas; al que se le añaden 0,5 x 10<sup>6</sup> células en 10  $\mu$ l de DMEMc, incubamos una hora a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> para favorecer la fijación celular y posteriormente, añadimos 900  $\mu$ l de medio completo por muestra y mantenemos el biomaterial en cultivo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 días , cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

### **4.3.- Cultivo en pellet**

Tras una siembra en monocapa en un frasco de cultivo de 75cm<sup>2</sup> (Nunc<sup>®</sup>) y una vez alcanzada una confluencia del 80%, se llevó a cabo la tripsinización de las monocapas. Para ello se lavaron los frascos con 10 ml de PBS; a continuación se añadieron 6 ml de una solución conteniendo 0,05 g de tripsina 1:250 (DIFCO<sup>®</sup>) y 0,02 g de EDTA (Sigma<sup>®</sup>) en 100 ml de PBS. Se mantuvieron en tripsinización durante 5-10 minutos a 37°C.

Una vez desprendidas las células del sustrato plástico, pasamos la solución a un tubo de centrifuga de 15 ml (Corning<sup>®</sup>) donde neutralizamos la acción de la tripsina añadiendo 6 ml de una solución de medio de cultivo completo y centrifugamos a 1.200 rpm durante 10 minutos, eliminamos el sobrenadante y le añadimos 1 ml de medio completo manteniéndolo a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua y un 5% de CO<sub>2</sub>. Así se formará un pellet de células que mantendremos en cultivo renovando el medio cada 2-3 días.

### **4.4.- Cultivo en micromasa**

El cultivo en monocapa fue tripsinizado como se explica en el apartado anterior. Las células despegadas se contaron en cámara de Neubauer y el volumen de suspensión se ajustó a 2x10<sup>6</sup> células/ml. La suspensión se agitó con cuidado para homogeneizarla. El cultivo en micromasa se hizo en Chamber Slide<sup>®</sup> (Lab-Tek<sup>®</sup>) de 8 pocillos. En cada Chamber Slide<sup>®</sup> se pusieron 50  $\mu$ l/pocillo de la suspensión

homogeneizada, obteniendo así 100.000 cél/pocillo, se incubó la muestra una hora a 37°C y en atmósfera controlada a 5% de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, se añadieron 400 µl / pocillo de una solución de medio de cultivo 89% DMEM suplementado con un 10% de SFB y un 1% de solución antibiótica-micótica.

Estos cultivos se mantuvieron en la estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para que se adhirieran al plástico. Mantuvimos el cultivo el tiempo necesario cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

## **5.- CRIOPRESERVACIÓN CELULAR**

Las células se congelan con una densidad conocida y se mantienen en nitrógeno líquido a -196°C hasta el momento de su utilización. Tras el conteo celular, procedemos a congelar las células con los distintos protocolos establecidos.

Centrifugamos las células durante 10 minutos a 1.200 rpm y se resuspenden en los medios de congelación adaptados a los diferentes protocolos que detallamos a continuación.

En cada criovial resuspendemos las células en 1 ml con una densidad celular de un  $1 \times 10^6$  células.

## 5.1.- Protocolos utilizados en la criopreservación de AT-MSCs de rata

Las células fueron resuspendidas en 6 variantes de medios de criopreservación (tabla 5).

PROTOCOLO	COMPOSICIÓN
<b>A</b>	10% DMEM, 10% (DMSO), 80 % FBS
<b>B</b>	10% DMSO, 90% SFB
<b>C</b>	80% DMEM, 10% DMSO, 10 % FBS
<b>D</b>	80% trealosa, 10% DMSO, 10% SFB
<b>E</b>	80% glucosa-DMEM, 10%DMSO, 10% SFB
<b>F</b>	10% glucosa-DMEM, 10%DMSO, 80%SFB

**Tabla 5:** Medios de criopreservación utilizados en el estudio.

Antes de introducir los crioviales en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  protegidos con algodón hidrófobo durante 24 horas, con el fin de que el descenso de la temperatura fuese gradual, evitando dañar la estructura celular en la medida de lo posible.

Se mantuvieron almacenados durante 12 semanas.

## 6.- CITOMETRÍA DE FLUJO

### 6.1.- Determinación de la viabilidad celular

Los crioviales se almacenaron en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , durante 12 semanas.

Las muestras se descongelaron en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ ; una vez descongeladas las células, cuantificamos su viabilidad mediante citometría de flujo.

Posteriormente, se realizó el marcaje con ioduro de propidio y anexina V siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello se empleó el kit Vibrant<sup>®</sup> Apoptosis Assay # 2 (Molecular probes<sup>®</sup>) que contiene Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 annexin V / propidium iodide. Este paso nos permitió identificar en cada una de las muestras el número de células vivas, apóptóticas y muertas.

Esta tinción se basa en localizar la fosfatidilserina mediante su unión con Annexin V-PE, la cual se une a células apoptóticas con membranas dañadas en las que se exterioriza esta proteína. Se usa en combinación con el ioduro de propidio, el cual penetra en las células muertas para unirse al ADN.

Se cuantifican las células teñidas por citometría de flujo, midiendo la emisión de fluorescencia a 530-575 nm

Se adquirieron 10.000 células por muestra. Para cada muestra marcada se utilizó una muestra de células sin teñir, que nos va a servir como referencia (cero o fondo), para calcular la autofluorescencia de estas células.

La población se separó en 3 grupos: las células vivas mostraron un bajo nivel de fluorescencia, las apoptóticas mostraron fluorescencia verde y las células muertas mostraban fluorescencia verde y roja.

## **6.2.- Caracterización de AT-MSCs de rata mediante marcadores de superficie**

La determinación de los marcadores de superficie de células troncales CD29, CD73 y CD90 se realizó sobre cultivos en monocapa antes y después de la congelación de las muestras.

Se realizó un conteo en una cámara de conteo celular y se determinó su viabilidad aproximada mediante una tinción de exclusión con azul Trypan (Sigma<sup>®</sup>) y, se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos.

Resuspendimos las células en 1 ml de tampón frío, realizado en PBS (ph=7,4), con 0,2% BSA (Sigma®) y 0,1% azida sódica (Sigma®) y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos.

Resuspendimos el pellet en 50 µl de tampón frío.

Preparamos los tubos marcados con 50 µl de tampón frío y 50 µl de anticuerpo primario: CD29, CD73, y CD90 mouse Anti-Rat (Pharmingen/BD Biosciences®) en una dilución 1:1000 en tampón frío. Salvo el blanco que no llevará el anticuerpo primario.

Añadimos 50 µl de la suspensión celular a los tubos, con una concentración de unas 100.000 células por muestra.

Agitamos suavemente e incubamos durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.

Posteriormente, centrifugamos a unas 1.200 rpm durante 5 minutos y resuspendimos el agregado celular en 100 µl de una solución con un anticuerpo secundario biotinilado rat antimouse IgG1 (Sigma®), en una dilución 1:50 en tampón frío.

Se agita suavemente y se incuba durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

Posteriormente, centrifugamos a 1.200 rpm durante 5 minutos y resuspendimos el agregado celular en 100 µl de una solución con un anticuerpo con streptavidin marcado con Alexa 488 (Invitrogen®) en tampón frío, en una dilución 1:100.

Se agita suavemente y se incuba durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

Lavamos dos veces con 1ml de tampón frío y centrifugamos a 1.200 rpm durante 10 minutos.

Resuspendimos las muestras en 1 ml de tampón frío y las mantuvimos a 4°C en oscuridad hasta su posterior análisis.

Se adquirieron 10.000 células por muestra. Los datos fueron analizados a través del programa CellQuest<sup>®</sup> (Summit 4.3).

### **6.3.- Caracterización de las AT-MSCs y BM-MSCs de caballo mediante marcadores de superficie**

Se realizó un conteo en una cámara de conteo celular y se determinó su viabilidad aproximada mediante una tinción de exclusión con azul Trypan (Sigma<sup>®</sup>) y, se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos.

Resuspendimos las células en 1 ml de tampón frío, y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. Después resuspendimos el pellet en 50 µl de tampón frío.

Preparamos los tubos marcados con 50 µl de tampón frío y 50 µl de anticuerpo primario [CD73, CD90 y CD105 (ABCAM<sup>®</sup>)] en una dilución 1:100. Salvo el blanco que no llevará el anticuerpo primario.

Añadimos 50 µl de la suspensión celular a los tubos, con una concentración de unas 100.000 células por muestra.

Agitamos suavemente e incubamos durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.

Posteriormente, centrifugamos a 1.200 rpm durante 5 minutos y resuspendimos el agregado celular en 100 µl de una solución con un anticuerpo secundario biotinilado antimouse (Invitrogen<sup>®</sup>) en tampón frío, en una dilución 1:100.

Agitamos suavemente e incubamos durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

Posteriormente, centrifugamos a unas 1.200 rpm durante 5 minutos y resuspendimos el agregado celular en 100 µl de una solución con un anticuerpo con streptavidin marcado con alexa [Alexa 647 o 488 (Invitrogen<sup>®</sup>)] en tampón frío, en una dilución 1:100.

Agitamos suavemente e incubar durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

Lavamos dos veces con 1ml de tampón frío y centrifugamos a 1.200 rpm durante 10 minutos.

Resuspendimos las muestras en 1 ml de tampón frío y las mantuvimos a 4°C en oscuridad hasta su posterior análisis.

En el presente trabajo se utilizó un citómetro de flujo modelo Cyan ADP Dako® equipado con 3 láseres. Todos los resultados de citometría de flujo fueron analizados utilizando el programa Win MDI®, versión 2.8.

## **7.- TÉCNICAS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR**

Se realizaron distintas técnicas con el fin de determinar la presencia de mucopolisacáridos, sales de calcio y lípidos y de este modo valorar la diferenciación celular de las MSCs, en las líneas seleccionadas en este estudio para su caracterización. Para ello se utilizaron los protocolos que se detallan a continuación:

### **7.1.- Inducción de la condrogénesis**

Se realiza una siembra en monocapa o en micromasa en Chamber Slide™ (Lab-Tek®) de 8 pocillos, con un medio de cultivo compuesto por un 89 % DMEM + 10 % SFB + 1% solución antibiótica-antimitótica. Se incuba a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua y un 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas y posteriormente se elimina este medio y se añade el medio de diferenciación condrogénica.

Para diferenciar los cultivos se añadió medio condrogénico con la siguiente composición:

- DMEM con una elevada concentración de glucosa (PAA®)

- 10 ng/ml Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Human (TGF $\beta$ 1) (Sigma<sup>®</sup>)
- 6,25  $\mu$ g/ml ITS+ liquid Media Supplemented (100x) (Sigma<sup>®</sup>)
- 50 nM de 2 phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma<sup>®</sup>).
- 1% Solución antibiótica-antimicótica (100x) (Sigma<sup>®</sup>).

Estos cultivos en diferenciación se mantienen hasta conseguir la obtención de agregados celulares.

Estos agregados se mantuvieron creciendo durante 15 días, cambiando el medio de diferenciación cada 2-3 días.

Como medio control se utilizó la siguiente solución: 89% DMEM + 10% SFB + 1% antibiótico-antimitótico.

#### **7.1.1.- Tinción Azul Alcian**

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

##### **Protocolo de tinción**

Lavamos los cultivos con PBS durante 5 minutos.

Fijamos con paraformaldehido (Merck<sup>®</sup>) al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Lavamos con HCL (Paltex<sup>®</sup>) 0,1N durante 5 minutos y posteriormente teñimos con Azul Alcian 8 GX (Sigma<sup>®</sup>) al 1% en HCL 0,1N (ph=1). Se deja toda la noche a temperatura ambiente.

Lavamos 2 veces con HCL 0,1N durante 5 minutos cada vez y posteriormente lavamos con agua destilada durante otros 5 minutos.

Observamos la muestra al microscopio óptico.



## 7.2.- Inducción de la adipogénesis

Se realiza una siembra en monocapa en Chamber Slide (Lab-Tek®) de 8 pocillos, con un medio de cultivo compuesto por un 89% DMEM + 10% SFB + 1% solución antibiótica-antimitótica.

Se incuba a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua y un 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas y posteriormente se elimina este medio y se añade el medio de diferenciación adipogénica.

Para diferenciar los cultivos se añadió medio adipogénico con la siguiente composición:

- 10% SFB (Lonza®).
- 1% Solución antibiótica-antimicótica (100x) (Sigma®).
- 500 µM IBMX ( isobutil-metil-xantina)(AppliChem®)
- 1 µM Dexametasona (Sigma®).
- 10 µM Insulina (Sigma®).
- 150 µM Indometacina (Sigma®).

Estos cultivos en diferenciación se mantienen hasta conseguir la obtención de agregados celulares.

Estos agregados se mantuvieron creciendo durante 15 días, cambiando el medio de diferenciación cada 2-3 días.

Como medio control se utilizó la siguiente solución: 89% DMEM + 10% SFB + 1% antibiótico-antimitótico.

### 7.2.1.- Tinción Oil Red O

Esta técnica se utiliza para determinar la presencia de lípidos y triglicéridos por ello se usa para determinar la presencia de células de tejido adiposo en los cultivos celulares. Se observan los lípidos de un color rojo.

### **Protocolo de tinción**

Lavamos las placas con PBS.

Fijamos las células cubriéndolas con paraformaldehído (MERCK®) al 4%.

Dejamos las células fijando al menos durante 15 minutos, o toda la noche, a temperatura ambiente.

Preparamos la solución de trabajo de Oil Red O (Sigma®). Para ello diluimos 0,5g de Oil Red O en 100 ml de isopropanol (Sigma®); siempre hay que hacer la solución en el momento que la vamos a emplear porque la solución de trabajo es muy inestable y precipita con facilidad.

Se añaden 6 ml de solución de almacenamiento en 4 ml de agua destilada.

Mezclamos y filtramos a través de un papel de filtro Whatman #1®. Hacemos 5 ml por cada 10 cm de placa a teñir.

Eliminamos el agente fijador y añadimos la solución de trabajo de Oil Red O.

Esperamos por lo menos 1 hora a temperatura ambiente.

Lavamos, varias veces con cuidado, con agua destilada para eliminar el exceso de tinción y algún precipitado que se pueda formar.

Quitamos el agua destilada y permitimos que las placas sequen al aire.

### **7.3.- Inducción de la osteogénesis**

Se realiza una siembra en monocapa en Chamber Slide (Lab-Tek®) de 8 pocillos, con un medio de cultivo compuesto por un 89% DMEM + 10% SFB + 1% solución antibiótica-antimitótica. Se incuba a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua y un 5% de CO<sub>2</sub>,

durante 24 horas y posteriormente se elimina este medio y se añade el medio de diferenciación osteogénica.

Para diferenciar los cultivos se añadió medio osteogénico con la siguiente composición:

- DMEM con una elevada concentración de glucosa (PAA<sup>®</sup>).
- 10 µM 2 phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma<sup>®</sup>).
- 10 mM β glycerolphosphate disodium salt hydrate (Sigma<sup>®</sup>).
- 0,1 µM Dexametasona (Sigma<sup>®</sup>).
- 1% Solución antibiótica-antimicótica (100x) (Sigma<sup>®</sup>).

Estos cultivos celulares se mantuvieron creciendo en diferenciación durante 15 días, cambiando el medio de diferenciación cada 2 -3 días hasta conseguir la obtención de agregados celulares.

Como medio control se utilizó la siguiente solución: 89% DMEM + 10% SFB + 1% antibiótico-antimitótico.

Para evidenciar los depósitos de calcio en el tejido diferenciado se realizó la tinción de von Kossa y con Rojo Alizarin.

### **7.3.1.- Tinción de Rojo Alizarin**

Esta tinción es utilizada para demostrar la presencia de depósitos de calcio en los cultivos celulares previamente diferenciados. La presencia de sales de calcio se detecta con un color rojo-anaranjado.

#### **Protocolo de tinción**

Lavado de las muestras con PBS durante 5 minutos.

Fijación con paraformaldehído (Merck<sup>®</sup>) al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Realizamos varios lavados con agua destilada durante 5 minutos.

Añadimos una solución de Rojo Alizarin S (Sigma Aldrich®) al 2% en agua destilada hasta cubrir las muestras e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Realizamos varios lavados con agua destilada durante 5 minutos.

Observamos las placas al microscopio óptico.

### **7.3.2.- Tinción de von Kossa**

Esta tinción es utilizada para demostrar la presencia de depósitos de fosfato cálcico en los cultivos celulares previamente diferenciados. Éste reacciona con el nitrato de plata formando fosfato de plata, que en presencia de luz se reduce a plata metálica, de color marrón/negro; además obtenemos una tinción del citoplasma celular en rosa y los núcleos en rojo.

#### **Protocolo de tinción**

Hacemos un lavado de las muestras con PBS durante 5 minutos.

Llevamos a cabo una fijación con paraformaldehído (Merck®) al 4% durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Realizamos 2 lavados con agua destilada durante 5 minutos cada uno.

Añadimos una solución de Nitrato de plata (Sigma Aldrich®) al 1% en agua destilada, hasta cubrir las muestras e incubar 30 minutos a temperatura ambiente bajo luz ultravioleta.

Realizamos 3 lavados con agua destilada durante 5 minutos.

Añadimos tiosulfato sódico (Sigma Aldrich®) al 5% en agua destilada y lo dejamos durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Realizamos, de nuevo, 3 lavados con agua destilada durante 5 minutos cada uno.

Contrastamos los núcleos con Nuclear Fast Red al 0,1% en sulfato de aluminio (Merck®) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Realizamos, finalmente, 5 lavados con agua destilada durante 5 minutos cada uno.

Observamos las placas al microscopio óptico.

## **8.- TÉCNICAS DE HISTOQUÍMICA**

### **8.1.- Inmunofluorescencia indirecta**

#### **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 conteo en una cámara de conteo celular y se determinó su viabilidad mediante una tinción de exclusión con Trypan Blue solution 0,4% (Sigma®).

#### **8.1.1.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: marcadores de superficie de MSCs de caballo**

Esta técnica se empleó para determinar la presencia de los marcadores, CD73, CD90 y CD105 en los cultivos en monocapa de AT-MSCs y BM-MSCs de caballo. Para ello se utilizaron como anticuerpos primarios: CD73, CD90 y CD105 (Abcam®). Como anticuerpos secundarios biotinilados antimouse (Invitrogen®) y Streptavidina Alexa 488 y 647(Invitrogen®).

En primer lugar, hicimos 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Fijamos las muestras con paraformaldehído al 2% (Merck®) durante 15 minutos.

Lavamos 3 veces con PBS durante 10 minutos cada vez y posteriormente llevamos a cabo la permeabilización de las muestras con Triton x100 (Sigma<sup>®</sup>) 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Hicimos sucesivos lavados, 3 con PBT de 5 minutos cada uno y posteriormente hicimos 2 lavados de 5 minutos cada uno con WB.

Incubamos con el anticuerpo primario, diluido en 10% de NGS (Sigma<sup>®</sup>) disuelto en WB, durante 24 horas a 4°C en agitación.

Lavamos con PBT 3 veces durante 5 minutos cada una y otros 2 lavados de 5 minutos cada uno con WB.

Incubamos con el anticuerpo secundario biotinilado diluido (1:100) en WB, durante 3 horas a temperatura ambiente.

Lavamos con PBT 5 veces con una duración de 5 minutos cada lavado.

Incubamos con una solución marcadora de Streptavidina-Alexa en una dilución 1:100 en WB, durante 24 horas a 4°C de temperatura ambiente en oscuridad.

Se llevaron a cabo los últimos lavados con PBT, 5 de 5 minutos de duración cada uno.

Finalmente se añadieron 300µl de una solución de DAPI (Invitrogen<sup>®</sup>) en una dilución 1:100 en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Realizamos 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno.

Montamos la muestra en un portaobjetos con una gota de medio de montaje y sellamos con un cubreobjetos.

### **8.1.2.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: marcadores de superficie de AT-MSCs de rata**

Esta técnica se empleó para determinar la presencia de los marcadores de superficie CD73 y CD90 en los cultivos en monocapa de células troncales derivadas de tejido adiposo de rata. Para ello se utilizaron como anticuerpos primarios: CD73 y CD90 (Abcam®). Como anticuerpos secundarios biotinilados antimouse (Invitrogen®) y Streptavidina alexa 488 (Invitrogen®).

Para realizar la inmunofluorescencia seguimos el mismo protocolo descrito anteriormente para las MSCs de caballo.

### **8.1.3.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: distribución celular en biomateriales**

Para ver la distribución de las células sobre los biomateriales realizamos una inmunofluorescencia con Faloidina y teñimos los núcleos con DAPI, para ello utilizamos el siguiente protocolo:

En primer lugar hicimos 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Fijamos las muestras con paraformaldehído al 2% (Merck®) durante 15 minutos.

Llevamos a cabo una deshidratación celular:

- Etanol 30% durante 10 minutos.
- Etanol 50% durante 10 minutos.
- Etanol 70% durante 10 minutos.
- Etanol 90% durante 10 minutos y repetir 3 veces.
- Etanol 100% durante 10 minutos y repetir 3 veces.

Permeabilizamos las muestras con Triton x100 Sigma® 0,1% durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Realizamos 5 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno.

Añadimos la tinción de 50 µg/ml Faloidina-TRICT (Sigma®) en 300 µl de PBS y mantenemos las muestras en ella durante 40 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Realizamos 5 lavados de PBS durante 5 minutos cada uno.

Finalmente añadimos 300 µl de una solución de DAPI (Invitrogen®) en una dilución 1:100 en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Realizamos 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno.

En el presente trabajo se utilizó un microscopio confocal Nikon® D1 equipado con 3 láseres, luz de transmisión y software EZ-C1 3.70, y un microscopio de fluorescencia Nikon® Eclipse E600.

#### **8.1.4.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: adhesión celular en biomateriales**

Observamos la adhesión de las células a los distintos biomateriales mediante inmunofluorescencia indirecta para la proteína Fosfatasa de Adhesión Kinasa (FAK), siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

La fijación, deshidratación y permeabilización de las muestras se realiza siguiendo los mismos protocolos descritos en el apartado 8.1.3.

Continuamos haciendo 3 lavados con PBT de 5 minutos cada uno y posteriormente hacemos 2 lavados de 5 minutos cada uno con WB.

Incubamos con el anticuerpo primario: Fosfatasa de Adhesión Kinasa Rabbit monoclonal [EP 1831] to FAK (Abcam®) en una dilución 1:200 en WB y 10% NGS durante 24 horas a 4°C en agitación.

Lavamos con PBT 3 veces durante 5 minutos cada una y otros 2 lavados de 5 minutos cada uno con WB.



Incubamos con el anticuerpo secundario biotinilado diluido: Biotinylated anti-rabbit IgG (Abcam<sup>®</sup>) en una dilución 1:100 en WB, durante 24 horas a 4°C.

Lavamos con PBT 5 veces con una duración de 5 minutos cada lavado.

Incubamos con una solución marcadora de Streptavidin-Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen<sup>®</sup>) en una dilución 1:100 en WB, durante 24 horas a 4°C de temperatura en oscuridad.

Llevamos a cabo los últimos lavados con PBT, 5 de 5 minutos de duración cada uno.

Finalmente añadimos 300 µl de una solución de DAPI (Invitrogen<sup>®</sup>) en una dilución 1:100 en PBS, durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Realizamos 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno.

#### **8.1.5.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: determinación expresión colágeno tipo II en las AT-MSCs de rata**

Esta técnica se empleó para determinar la presencia del colágeno tipo II en los cultivos en pellet de AT-MSCs de rata. Para ello se utilizaron como anticuerpos primarios: rat anticollagen II (Abcam<sup>®</sup>). Como anticuerpos secundarios biotinilados antirabbit IgG (Abcam<sup>®</sup>) y Streptavidina Alexa 488 (Invitrogen<sup>®</sup>).

En primer lugar hacemos 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Fijamos las muestras con paraformaldehído al 2% (Merck<sup>®</sup>) durante 15 minutos.

Lavamos 3 veces con PBS durante 10 minutos cada vez y posteriormente llevamos a cabo la permeabilización de las muestras

con Triton x100 Sigma<sup>®</sup> 0,1% durante 120 minutos a temperatura ambiente.

Hacemos otros 3 lavados con PBT de 5 minutos cada uno y posteriormente hacemos 2 lavados de 5 minutos cada uno con WB.

Incubamos con el anticuerpo primario colágeno tipo II anti-rat en una dilución 1:100, diluido en 10% de NGS (Sigma<sup>®</sup>) en WB, durante 24 horas a 4°C en agitación.

Lavamos con PBT 3 veces durante 5 minutos cada una y otros 2 lavados de 5 minutos cada uno con WB.

Incubamos con el anticuerpo secundario biotinilado en una dilución 1.100 en WB, durante 24 horas a 4°C en agitación.

Lavamos con PBT 5 veces con una duración de 5 minutos cada lavado.

Incubamos con una solución marcadora de Streptavidina-Alexa 488 en una dilución 1:100 en WB, durante 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad.

Se llevaron a cabo los últimos lavados con PBT, 5 de 5 minutos de duración cada uno.

Finalmente se añaden 300 µl de una solución de DAPI (Invitrogen<sup>®</sup>) en una dilución 1:100 en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Realizamos 3 lavados de PBS de 5 minutos de duración cada uno.

#### **8.1.6.- Inmunofluorescencia indirecta confocal: determinación expresión de agrecano en MSCs de caballo**

Esta técnica se empleó para determinar la presencia de agrecano en los cultivos en pellet de AT-MSCs y BM-MSCs de caballo; cultivados durante 15 días en un medio de cultivo que induce la condrogénesis. Para ello se utilizaron como anticuerpos primarios:

Rabbit Anti-Brevican/ Aggrecan (BIOSS®). Como anticuerpos secundarios biotinilados antirabbit IgG (Abcam®) y Streptavidina Alexa 488 (Invitrogen®).

En primer lugar, hicimos 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Fijamos las muestras con paraformaldehído al 2% (Merck®) durante 15 minutos.

Lavamos 3 veces con PBS durante 10 minutos cada vez y posteriormente, llevamos a cabo la permeabilización de las muestras con Triton x100 Sigma® 0,1% durante 120 minutos a temperatura ambiente.

Hicimos 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y posteriormente hicimos 2 lavados de 5 minutos cada uno con WB.

Incubamos con el anticuerpo primario Rabbit Anti-Brevican/ Aggrecan en una dilución 1:100, diluido en 10% de NGS (Sigma®) diluido en WB, durante 24 horas a 4°C en agitación.

Lavamos con PBT 3 veces durante 5 minutos cada una y otros 2 lavados de 5 minutos cada uno con WB.

Incubamos con el anticuerpo secundario biotinilado en una dilución 1:100 en WB, durante 24 horas a 4°C en agitación.

Lavamos con PBT 5 veces con una duración de 5 minutos cada lavado.

Incubamos con una solución marcadora de Streptavidina-Alexa 488 (Invitrogen®) en una dilución 1:100 en WB, durante 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad.

Se llevaron a cabo los últimos lavados con PBT, 5 de 5 minutos de duración cada uno.

Finalmente se añadieron 300 µl de una solución de DAPI (Invitrogen®) en una dilución 1:100 en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Realizamos 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno.

## **8.2.- Inmunofluorescencia directa**

### **8.2.1.- Inmunofluorescencia directa confocal marcadores de superficie AT-MSCs de rata**

La inmunofluorescencia directa se utilizó para determinar la expresión de CD29 en las células troncales de tejido adiposo de rata. Para ello utilizamos anticuerpo primario de hámster AntiRat CD29 conjugado con FITC (Pharmigen / BD Biosciences®) en una dilución 1:1000.

Los experimentos control fueran llevados a cabo en cartílago normal sin el anticuerpo primario.

Incubamos en 1% de BSA (Sigma®) diluida en PBS con un pH=7,5 durante 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Incubamos con el anticuerpo monoclonal, diluido en 1% BSA y 0,1% de NGS diluido en PBS con un pH=7,5 durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Lavamos 3 veces con PBS a un pH=7,5 durante 10 minutos cada vez.

Para visualizar todas las muestras de inmunofluorescencia utilizamos un microscopio confocal Nikon® D1 equipado con 3 láseres, luz de transmisión y software EZ-C1 3.70, y un microscopio de fluorescencia Nikon® Eclipse E600.

## **9.- CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LOS BIOMATERIALES**

Los biomateriales sembrados con las MSCs en cultivo, se mantuvieron a 37°C y con una atmósfera saturada de CO<sub>2</sub> al 5% durante 5, 8, 12, 15, 18 y 21 días.

La cuantificación de la proliferación celular la realizamos de dos formas diferentes, mediante la cuantificación del DNA total de cada muestra y utilizando Alamar Blue (Molecular Probes®)

## 9.1.- Cuantificación del DNA total

La proliferación celular en los biomateriales se cuantifica midiendo la cantidad de DNA total de las células presentes en él; para ello se mide la densidad óptica a una longitud de onda de 560-580 nm.

### 9.1.1.- Degradación de los biomateriales

Para extraer el DNA es necesario, previamente, degradar el biomaterial, lo que requiere distintos protocolos en función de la diferente composición de cada uno.

- **Zimmer®**: La muestra del biomaterial se trocea en pequeños fragmentos de 1-2 mm<sup>2</sup>. A continuación se lleva a cabo la digestión enzimática con colagenasa tipo I (Sigma®) al 0,075% y 0,5% solución antibiótica-antimicótica. Incubamos en agitación a 37°C hasta que se digiera completamente.

- **Hidrogel**: La muestra del hidrogel se trocea en pequeños fragmentos de 1-2 mm<sup>2</sup>. A continuación se lleva a cabo la disociación enzimática. Este biomaterial es muy resistente y para su degradación hemos probado distintas combinaciones enzimáticas.

- a.- Colagenasa tipo I (Sigma®) al 0,075% y 0,5% solución antibiótica-antimicótica. Incubamos en agitación a 37°C hasta que se digiera completamente.

- b.- Colagenasa tipo I (Sigma®) y 1 ml de tripsina al 0,075% Proteinasas K stock, Proteinase K from *Tritirachium album* 1/30 (Sigma®) e incubamos en agitación a 37°C hasta que se digiera completamente.

- c.- Solución de disociación de Proteinasas K: Proteinasas K 1/300 con tripsina al 0,25% en DMEM hasta 5 ml.

d.- Solución de disociación de Hialuronidasa: 0,0005 mg de Hialuronidase Type IV from Bovine Teste (Sigma<sup>®</sup>) con tripsina al 0,25% en DMEM hasta 5 ml.

e.- Solución de disociación de elastasa: 21 g Elastase from Human Leukocytes (Sigma<sup>®</sup>) se disuelven en 5 ml de acetato sódico a pH=5 y lo dejamos hidratar una semana a 4°C.

En cada muestra de hidrogel añadimos 900 µl de PBS y 100 µl de la solución de hidratación de elastasa, 24 horas en agitación a 37°C.

•**OPLA<sup>®</sup>**: Troceamos el biomaterial en pequeños fragmentos de 1-2 mm<sup>2</sup> y posteriormente añadimos 2 ml de solución de disociación de Proteinasa K (Sigma<sup>®</sup>), 50ml de PBS, 0,5 g de tripsina y 500 µl de solución antibiótica-antimicótica, posteriormente añadimos 7 ml de una solución compuesta de: 89% DMEM con un 10% de SFB y 1% de solución antibiótica-antimicótica y lo mantenemos a 4°C para finalmente disgregarlo, en frío, con el politrón Ultra Turrax<sup>®</sup>.

•**Matrigel<sup>®</sup>**: En primer lugar se realizan 3 lavados con PBS a 4°C, añadimos 100 µl de Dispasa (BD Cell Recovery Solution, BD Bioscience<sup>®</sup>), agitamos por inversión y mantenemos la muestra a 4°C durante 100 minutos; centrifugamos durante 5 minutos a 2.500 rpm a 5-8°C, resuspendemos el pellet con PBS a 0°C y volvemos a centrifugar.

En todos los biomateriales obtuvimos una solución que fue necesario centrifugar a 1.200 rpm durante 10 minutos, eliminamos el sobrenadante y añadimos 5 µl de proteinasa K y 175 µl de buffer de lisis:

-Tris HCl 1 M a pH 8 (Sigma<sup>®</sup>).

-EDTA (Sigma<sup>®</sup>) 0,5 M a pH=8, NaCl 3 M.

-SDS al 10% (Sigma<sup>®</sup>).

-H<sub>2</sub>O<sub>MO</sub> y dejamos toda la noche a 65°C.

### **9.1.2.- Extracción de DNA con fenol-cloroformo-isoamilo**

Una vez degradada la muestra, añadimos 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamilo (25:24:1) al tubo con la muestra. Agitamos mediante volteo durante 3-4 minutos, (este paso es muy importante para conseguir que se mezclen bien las fases y obtener así una mejor pureza de la muestra).

Centrifugamos a 12.000 rpm durante 5 minutos y transferimos la fase acuosa (superior) a un tubo limpio, en este paso es necesario retirar el mayor volumen posible pero sin arrastrar la interfase.

Añadimos 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamilo a cada tubo con muestra y agitamos mediante volteo 3-4 minutos.

Centrifugamos a 12.000 rpm durante 4 minutos. En este paso, al existir menos suciedad en la muestra, se acorta un poco el tiempo de centrifuga.

Transferimos la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo y añadimos 1 volumen de cloroformo.

Agitamos mediante volteo 3-4 minutos.

Centrifugamos a 12.000 rpm durante 4 minutos.

Transferimos la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo.

### **9.1.3.- Precipitación del DNA**

Transferimos la mitad del contenido recuperado a otro tubo limpio, para obtener 2 muestras en las que precipitamos el ADNA.

Añadimos 1/10 de volumen de NaCl 3M.

Añadimos 2,5 volúmenes de etanol absoluto.

Agitamos suavemente mediante volteo para mezclar las dos fases. Pueden ocurrir 2 cosas:

a.- El DNA debería precipitar inmediatamente, siendo visible como un ovillo blanco, entonces se recoge aspirándolo suavemente

con la pipeta, generalmente se queda pegado y continuamos con el siguiente paso.

b.- Si no existe ovillo, centrifugamos 15-20 minutos a 12.000 rpm. Eliminamos el sobrenadante y seguimos con el siguiente paso.

Añadimos 500  $\mu$ l de etanol 70 % para lavar el DNA.

Centrifugamos a 12.000 rpm durante 4 minutos y eliminamos el sobrenadante.

Dejamos secar al aire entre 3-5 minutos dependiendo de los restos de etanol que contenga el tubo.

Resuspendemos suavemente con la pipeta el DNA añadiendo 30-50  $\mu$ l de TE.

Ponemos la muestra toda la noche a 4 °C.

Guardamos la solución de DNA a 4 °C.

Determinamos la concentración de DNA midiendo la densidad óptica (DO) a 260nm con un espectrofotómetro 1 unidad DO=50 $\mu$ g/ml o con el NanoDrop<sup>®</sup> utilizando TE como blanco.

## **9.2.- Cuantificación de la viabilidad y proliferación celular con Alamar Blue<sup>®</sup>**

El Alamar Blue<sup>®</sup> es un indicador de la viabilidad celular. El ingrediente activo del Alamar Blue<sup>®</sup> (resazurina) es un compuesto no tóxico, permeable a las células, de color azul y no fluorescente. Al penetrar en las células, la resazurina se reduce a resorufina, y produce una fluorescencia roja muy brillante. Las células vivas están continuamente convirtiendo la resazurina en resorufina, generando así una medida cuantitativa de viabilidad por citotoxicidad.

Se sembraron  $5 \times 10^5$  AT-MSCs y BM-MSCs en todos los biomateriales depositados previamente en una multiplaca de 24 pocillos.



Estas células fueron cultivadas para medir su proliferación con Alamar Blue<sup>®</sup> y suplementadas con 89% DMEM sin rojo fenol 10% SFB y 1% antibiótico-antimicótico, cambiando el medio cada 2-3 días, durante 21 días.

Para cuantificar la proliferación celular añadimos al biomaterial 300 µl de 89% DMEM sin rojo fenol, 10% SFB y 1% antibiótico-antimicótico y 30 µl de Alamar Blue<sup>®</sup>; esperamos 4 horas a 37°C en oscuridad y medimos la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific<sup>®</sup>).

El número de células viable es correlativo al nivel de tinción reducida y expresada en porcentaje de Alamar Blue<sup>®</sup> reducido, según el protocolo del producto.

Empleamos como control positivo la solución de cultivo sin rojo fenol, con Alamar Blue<sup>®</sup> y sin células.

### **9.3.- Cuantificación de la diferenciación condrogénica**

Para comprobar que se ha producido la diferenciación de las células troncales mesenquimales en tejido cartilaginoso, determinamos la expresión de un marcador molecular característico de este tejido, el colágeno tipo II. La expresión de los genes de interés, la analizamos mediante el uso de la técnica PCR que se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### **9.3.1.- Extracción de RNA**

Partimos de un pellet celular procedente de un cultivo en monocapa previamente tripsinizado, centrifugado a 1.200 rpm, resuspendido en PBS y de nuevo centrifugado a 1.200 rpm y eliminamos el sobrenadante.

Homogeneizamos la muestra mediante pipeteo en TRI REAGENT<sup>®</sup> (1ml por cada  $5 \times 10^6$  células) y se incubó durante 5 minutos a 15-30°C.

Añadimos al homogenizado 0,2 ml de cloroformo por ml de TRI REAGENT<sup>®</sup> utilizado. Cubrimos la muestra y agitamos vigorosamente durante 15 segundos.

Incubamos la muestra a 15-30°C durante 5 minutos y centrifugamos a 12.000 rpm durante 15 min a 2-8°C. Esta centrifugación separará la muestra en tres fases: una fase inferior orgánica de color rosa (contiene proteína), una interfase (contiene DNA), y una fase superior acuosa incolora (contiene RNA).

Transferimos la fase acuosa incolora a un tubo nuevo y añadimos 0,5 ml de isopropanol por ml de TRI REAGENT<sup>®</sup> añadido.

Incubamos durante 10 minutos a 15-30°C y centrifugamos a 12.000 rpm durante 10 minutos a 2-8°C. El RNA precipitará formando un pellet de aspecto gelatinoso.

Eliminamos el sobrenadante y lavamos el agregado con 1ml de etanol al 75% por ml de TRI REAGENT<sup>®</sup> añadido.

Agitamos la muestra por vortex y centrifugamos a 7.500 rpm durante 5 min a 2-8°C.

Eliminamos el sobrenadante y disolvemos las muestras en agua libre de RNAsa y finalmente se congela a -80°C.

La cuantificación de RNA de las muestras obtenidas se midió empleando un espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup>.

### **9.3.2.- Tratamiento con DNAsa**

Con el fin de eliminar los restos de DNA genómico procedentes de la extracción de RNA que pudieran quedar en la muestra, se procedió a tratar ésta con DNAsa (Promega Corporation<sup>®</sup>) antes de su uso, de acuerdo al siguiente protocolo:

RNA disuelto en agua: 1-8 µl.

Free DNase 10X reaction buffer: 1µl.

Free DNase: 1u/µg RNA (si la cantidad es inferior, poner siempre 1u).

Nuclease Free water: hasta 10 µl.

Incubamos a 37°C durante 30 minutos.

### 9.3.3.- Síntesis de cDNA (RT-PCR)

La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit ThermoScrip RT-PCR System (Invitrogen®) siguiendo las indicaciones del fabricante.

El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

### 9.3.4.- RT-PCR

La reacción de PCR se realizó mediante el kit ThermoScrip RT-PCR System (Invitrogen®) de acuerdo al protocolo.

Los genes testados fueron GAPDH y COL2a1, y los primers utilizados (Sigma®) para ello fueron los siguientes:

	<b>FORWARD</b>	<b>REVERSE</b>
<b>GAPDH</b>	CTGAGGACCAGGTTGTCTCC	CCTGTTGTTATGGGGTCTGG
<b>COL2a1</b>	GAGTGGAAGAGCGGAGACTAC	CTCCATGTTGCAGAAGACTTTC

## 10.- TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

### 10.1.- Protocolo de microscopía electrónica de barrido (SEM) en cultivo monocapa

Las muestras 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.

Posteriormente, se llevaron a cabo los procesos de deshidratación y desecación, siguiendo los protocolos habituales.

Las muestras ya desecadas fueron montadas sobre los porta-objetos metálicos del microscopio electrónico de barrido empleando cinta de carbono conductora. Se realizó el recubrimiento metálico o *sputtering* de las muestras mediante un *sputter coater* 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®.

## **10.2.- Protocolo de microscopía electrónica de barrido (SEM) en biomateriales**

Para observar la adhesión y distribución celular en los biomateriales procesamos las muestras para observarlas mediante el microscopio electrónico de barrido.

Cada biomaterial requiere un procesado diferente:

**10.2.1.- Zimmer®:** Lavado con PBS durante 5 minutos, fijación con glutaraldehído al 2,5% durante 2 horas, 3 lavados de PBS de 30 minutos y una deshidratación celular similar a la descrita en el apartado de microscopía confocal.

**10.2.2.- Hidrogel:** Lavado con PBS durante 5 minutos. Añadimos 1ml de solución fijadora compuesta por 25ml de tampón cacodilato sódico (Ácido Cacodílico Sal Sódica 3-hidrato de Panreac®) 0,2M/HCl (pH=7,4), 10ml de paraformaldehído al 25% y H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> hasta 50ml, lo dejamos incubando durante toda la noche a 4°C.

Deshidratación celular:

- Etanol 15% durante 15 minutos.
- Etanol 30% durante 15 minutos.

- Etanol 50% durante 15 minutos.
- Etanol 70% durante 15 minutos.
- Etanol 95% durante 15 minutos.
- Etanol 100% durante 15 minutos.

**10.2.3.- OPLA<sup>®</sup>:** Lavado con PBS durante 5 minutos, fijación con glutaraldehído al 2,5% durante 2 horas a 4°C, y posteriormente realizamos 3 lavados con PBS durante 30 minutos.

Llevamos a cabo una deshidratación celular:

- Etanol 30% durante 10 minutos.
- Etanol 50% durante 10 minutos.
- Etanol 70% durante 10 minutos.
- Etanol 90% durante 10 minutos y repetir 3 veces.
- Etanol 100% durante 10 minutos y repetir 3 veces.

**10.2.4.- Matrigel<sup>®</sup>:** Lavado con PBS durante 5 minutos, fijación con 100 µl de solución fijadora compuesta por 25ml de tampón cacodilato sódico (Ácido Cacodílico Sal Sódica 3-hidratode Panreac<sup>®</sup>) 0,2M/HCl (pH=7,4), durante 1 hora a 4°C.

A continuación realizamos 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Llevamos a cabo una deshidratación celular (repetiendo 2 veces cada paso):

- Etanol 30% durante 2 minutos.
- Etanol 50% durante 2 minutos.
- Etanol 70% durante 2 minutos.
- Etanol 90% durante 2 minutos.
- Etanol 100% durante 2 minutos.

Posteriormente, introducimos todas las muestras de los diferentes biomateriales en la desecadora Critical Point Dryer CPD

030, Baltec<sup>®</sup> donde se realizan de 4 a 6 lavados para sustituir el etanol por acetona.

Se realizó el recubrimiento metálico de la misma forma que hemos descrito anteriormente.

### **10.3.- Protocolo de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AT-MSCs y BM-MSCs de caballo**

Para estudiar la estructura celular y la distribución de los diversos orgánulos que la componen se realizó microscopía electrónica de transmisión. Las células fueron cultivadas en pellets, hasta obtener un nódulo de pequeño tamaño pero consistente, de manera que no se degrade al manipularlo.

Hacemos unos lavados rápidos de las muestras con PBS y fijamos las muestras en una solución de glutaraldehído al 2,5% en PBS 0,1 M durante 2 horas a 4°C.

Hacemos 2 lavados con PBS durante 10 minutos.

Y la post-fijación se lleva a cabo en tetróxido de osmio 1% en PBS durante 3 horas a temperatura ambiente.

Para terminar con 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno.

A continuación, se lleva a cabo la inclusión de las muestras en gelatina al 15% en PBS, posteriormente se dejan enfriar y se recortan hasta obtener un cubo de unos 2 mm.

El siguiente paso es la deshidratación, la cual se realizó en serie creciente de etanol: 30°, 50°, 70° y 90° durante 30 minutos cada uno a temperatura ambiente. Y se finaliza la deshidratación con 3 pases de 30 minutos cada uno de etanol de 96° y etanol absoluto.

Se hacen 3 pases de una hora de duración cada uno en óxido de propileno a temperatura ambiente.

Infiltración en 1:1 óxido de propileno.

Infiltración en resina Epon 812 pura 12-24 horas a temperatura ambiente.

Encapsular en Epon puro y etiquetar las muestras. Polimerización de las muestras a 60°C durante 24 horas.

Se realizaron cortes semifinos sucesivos de 1 µm 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% .

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).

Los cortes ultrafinos fueron contrastados siguiendo el método de doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. 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 portarrejillas quedando listas para su observación al microscopio electrónico. Su examen se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1010 Japan<sup>®</sup>) empleando voltajes de 80 KV.

## **11.- MODELO DE REGENERACIÓN DE MENISCO DE CABALLO**

### **Implantación local del Biomaterial en un defecto meniscal**

Para el desarrollo de este modelo animal se utilizaron 6 caballos de raza Hispano-Bretón de  $5 \pm 2$  años. A los que se les realizó una lesión experimental en la región craneal del menisco medial de ambas articulaciones fémoro-tibio-rotulianas (Día 0). La lesión se realizó mediante artroscopia.

Se dividieron los animales en dos grupos (3 animales por grupo), y en todos ellos se utilizó una extremidad, elegida aleatoriamente como control, en la cual se realizó un defecto articular pero no se aplicó ningún tipo de tratamiento, mientras que en la rodilla contralateral se aplicó el biomaterial sembrado con las células troncales mesenquimales.

Los animales se distribuyen en 2 grupos:



**GRUPO 1:** Biomaterial+ BM-MSCs.

**GRUPO 2:** Biomaterial+ AT-MSCs.

## **11.1.- Técnica quirúrgica y artroscopias**

### **Protocolo anestésico**

Para ambos procedimientos artroscópicos a los que fue sometido cada animal del estudio se empleó el siguiente protocolo anestésico: sedación con Romifidina (Sedivet<sup>®</sup> 0,05 mg/kg iv) y Butorfanol (Torbugesic<sup>®</sup> 0,03 mg/kg iv) e inducción con Ketamina (2,2 mg/kg iv) y Diazepam (0,08 mg/kg), y mantenimiento mediante anestesia general inhalatoria con Isoflorano con un circuito circular semicerrado con ventilación mecánica controlada y administración de un flujo continuo de oxígeno 100%.

### **Protocolo del primer procedimiento artroscópico: creación de la lesión y colocación de las construcciones híbridas en su interior**

Una vez posicionado el animal en decúbito dorsal con la articulación femoro-tibial en un ángulo de 90°, y con la tibia horizontal; se realizó una limpieza estéril del campo quirúrgico en ambas articulaciones y se colocaron paños quirúrgicos estériles.

Se realizó una artroscopia bilateral de la articulación femoro-tibial medial de ambas extremidades posteriores, la cual se hizo axial al ligamento medio patelar y 2 cm proximal a la cresta tibial.

La segunda apertura se hizo medial a la primera, por encima del cóndilo medial femoral<sup>223</sup>.

Posteriormente, se realizó una lesión en el aspecto medial del polo craneal del menisco medial de 5x5 mm y forma piramidal, mediante un resector sinovial motorizado (Stryker TPS<sup>®</sup>) de 6mm. A continuación, en los casos control no se llevó a cabo ningún tratamiento posterior, mientras que en los otros casos, tras la lesión

se insertaron en una de las extremidades en el interior de la lesión el biomaterial Zimmer® sembrados con aproximadamente  $10^6$  células troncales mesenquimales adheridas, y se fijó al menisco mediante sutura de propileno de 2/0 (Propelene®) usando agujas espinales. La lesión realizada fue de 10 mm de longitud y unos 6 mm de profundidad.

Una vez fijado el biomaterial en la lesión, se procedió a cerrar los portales artroscópicos de ambas extremidades posteriores en dos capas, primero la cápsula articular con material de sutura reabsorbible y posteriormente piel y tejido subcutáneo con material de sutura no reabsorbibles.

En el postoperatorio, los animales fueron estabulados durante 6 semanas y paseados durante 10 minutos, dos veces al día durante las 2 semanas siguientes a la intervención.

### **Protocolo del segundo procedimiento artroscópico: control y valoración de la lesión**

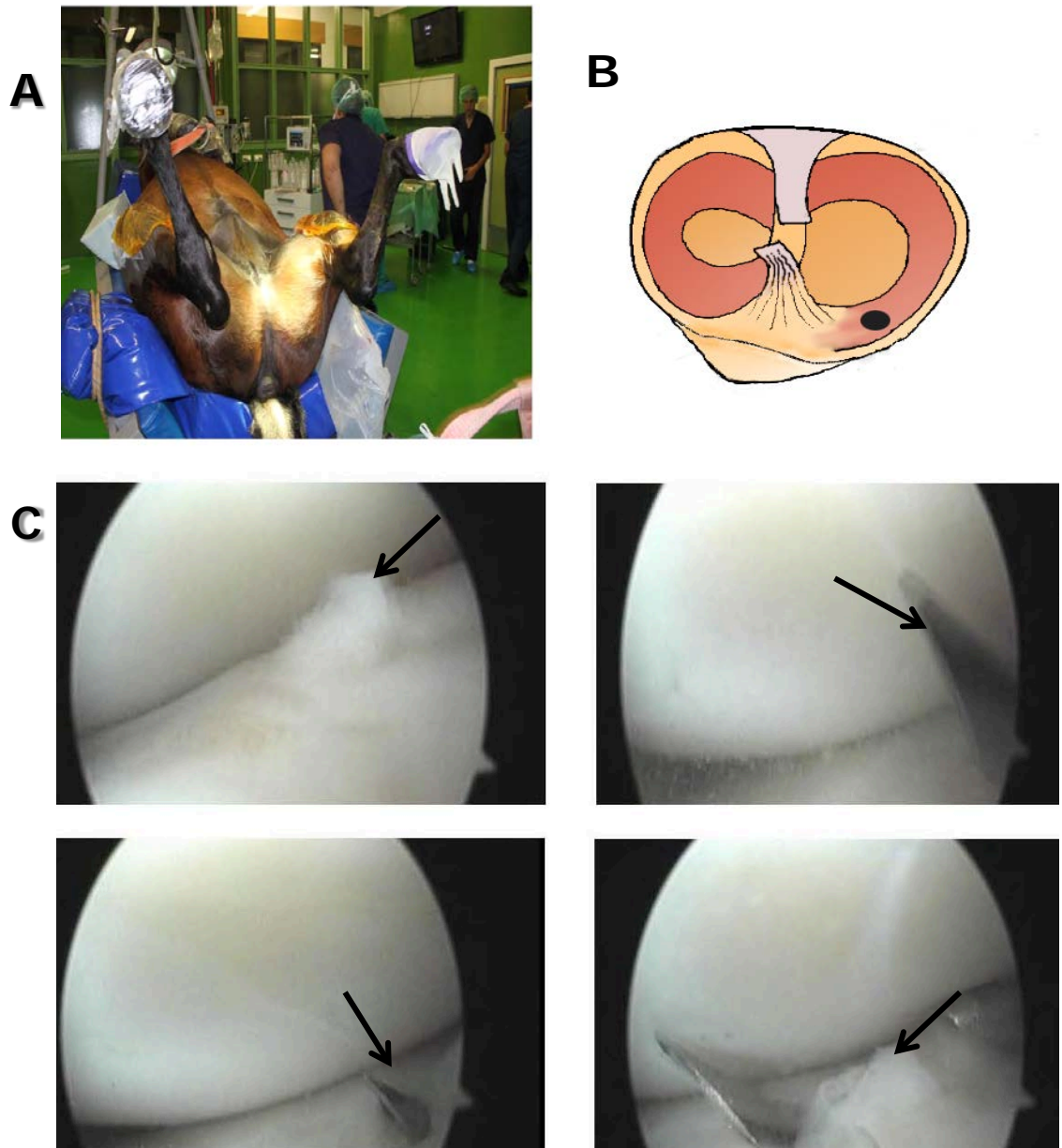
Una vez posicionado el animal en decúbito dorsal, se realizó una limpieza estéril del campo quirúrgico y se colocaron los paños quirúrgicos estériles. Se realizó una artroscopia bilateral de la articulación femoro-tibial medial de ambas extremidades posteriores mediante el abordaje lateral descrito en *Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse 3rd Ed* (McIlwraith, Nixon, Wright, Boening) para acceder al receso craneal de dicha articulación (Figura 2).

Se exploró la articulación femoro-tibial medial de ambas articulaciones, observando tanto los cambios producidos en la lesión así como en el resto de estructuras articulares.

A continuación, se procedió a cerrar los portales artroscópicos de ambas extremidades posteriores en dos capas, primero la cápsula articular con material de sutura reabsorbible y posteriormente la piel y el tejido subcutáneo con material de sutura no reabsorbibles.

Tras la intervención quirúrgica, los caballos fueron estabulados durante 6 semanas y tratados con analgesia y antibioterapia; y paseados 10 minutos diariamente durante las 2 semanas posteriores a la intervención. Permanecieron en el Hospital Veterinario de la Universidad de León hasta que fueron eutanasiados.

A los 12 meses se sacrificaron los animales incluidos en el estudio. Se recogieron los meniscos lesionados y se hizo un estudio histopatológico de las muestras para poder valorar el grado de regeneración del menisco y la calidad del tejido neoformado. Para ello se realizaron cortes histológicos con tinciones específicas, para determinar la presencia de matriz extracelular.



**Figura 2:** Procedimiento quirúrgico. **A.** Artroscopia realizada con el animal en decúbito dorsal y bajo anestesia general. **B** Esquema de la articulación de la rodilla donde se localiza el punto del defecto (círculo negro) en la zona craneal del menisco interno. **C.** Fotografía intraoperativa hecha durante la biopsia meniscal. Defecto de 4-6 mm de diámetro en la parte craneal del menisco (flechas).

## 11.2.- Técnicas de microscopía óptica para valorar la regeneración meniscal

En este caso, se toma la biopsia del menisco y se preparó para su observación al microscopio óptico.

Las piezas del menisco se fijaron en formaldehído tamponado, incluyéndolas en parafina para hacer posteriormente cortes seriados y realizar las tinciones sobre ellos.

### **11.2.1.- Fijación**

Se disolvieron 16 gramos de paraformaldehído (Merck®) en aproximadamente 80 ml de agua destilada agitando y a una temperatura de 70 °C.

Se adicionan algunas gotas de NaOH 1N para despolimerizar el paraformaldehído. Ajustamos el pH a 7,0. Enfriamos a temperatura ambiente y se enrasó a 100 ml.

Filtramos con un filtro Millipore de 0,45 µm y mezclamos con la misma cantidad de tampón 2X. Dividimos en alícuotas adecuadas y almacenamos las muestras a -20°C.

Lavamos las muestras con PBS durante 5 minutos.

Fijamos en 10% paraformaldehído en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Lavamos 3 veces durante 5 minutos cada vez con PBS.

### **11.2.2.- Inclusión en parafina**

Para incluir la muestra en parafina, fijamos el tejido con etanol al 70% a 4°C, durante la noche.

Ponemos el tejido en un procesador de tejidos y lo procesamos con los siguientes tiempos y temperaturas:

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

**Tabla 6:** Inclusión en parafina en el caso de las muestras de menisco.

Los cortes seriados se realizaron 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 albúmina. Los portas se dejan secar en una estufa durante, por lo menos, 24 horas a 37 ° C.

Almacenamos las muestras a temperatura ambiente.

### **11.2.3.- Histoquímica**

Se realizaron distintas técnicas de histoquímica con el fin de observar mejor la morfología del menisco. Para ello se utilizaron los siguientes protocolos:

#### **11.2.3.1.- Tinción de Safranina O/ Fast Green**

Este colorante se ha utilizado en la identificación de procesos degenerativos como la osteoartritis, dado que la safranina O se une a los glicosaminoglicanos (GAGs) de la matriz extracelular del cartílago articular. La tinción Safranina O/Fast Green (Sigma®) da como resultado una muestra teñida con proteoglicanos rojos y colágeno en verde.

##### **Protocolo de tinción**

Desparafinamos las muestras en Xilol sometiéndolas a tres pases de 10 minutos cada uno y las hidratamos posteriormente en una serie decreciente de pases en alcohol de 100%, 90%, y 70% de 10 minutos de duración cada uno. Hacemos un lavado final con agua y procedemos a la tinción.

Sumergimos las muestras en hematoxilina férrica formada por dos soluciones; la primera de ellas por: 1 gr hematoxilina (Panreac®) y 100ml de alcohol de 95% y la segunda, por 4 ml de cloruro de hierro III (Panreac®) al 29%, 95 ml de agua destilada y 1ml de ácido clorhídrico; y lo mantenemos en inmersión durante 10 minutos. De esta manera teñimos los núcleos de negro.

Hacemos un lavado con agua durante 10 minutos.

Sumergimos las muestras en una solución de Fast Green compuesta por 0,01 gr de Fast Green (Sigma®) (0,01gr) y 1.000 ml de agua destilada durante 5 minutos.

Sometemos las muestras a una nueva inmersión en una solución de ácido acético: 1 ml de ácido acético glacial y 99 ml de agua destilada, durante 15 segundos.

Finalmente, metemos las muestras en 0,1 gr de una solución de Safranina O (Sigma<sup>®</sup>) en 100 ml de agua destilada durante 5 minutos.

Deshidratamos la muestra con dos pases de 2 minutos cada uno de alcohol etílico 95% y del 100%, y se aclara con xileno (Scharlau<sup>®</sup>), dos pases de 2 minutos.

Finalmente se evalúan las muestras a la luz de un microscopio (Nikon<sup>®</sup>).

Para cuantificar los proteoglicanos teñidos de rojo en cada sección de menisco teñidos con Safranina-O, hemos utilizado el programa de procesamiento de imagen Image J 1.45.

### **11.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los análisis estadísticos los hemos realizado utilizando el programa IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics versión 21. Cada estudio fue realizado llevando a cabo 3 réplicas experimentales y presentadas como medias con un error estándar. Los grupos experimentales fueron comparados con un análisis de varianza con el método de comparación múltiple de Tukey. Los datos fueron calculados mediante la prueba t de Student. Los resultados con una  $p < 0.05$  han sido considerados significativos.





# RESULTADOS

---



# 1.- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS AT-MSCS DE RATA

## 1.1.- Obtención y cultivo de las AT-MSCs de rata

Tras la obtención mediante biopsia de la muestra de tejido en distintas localizaciones corporales, observamos que dentro del tejido adiposo extraído, la grasa extraída de la zona subcutánea daba mejores resultados en cuanto a cantidad de células capaces de adherirse a la superficie plástica, que el tejido adiposo de la zona intraabdominal.

De la grasa subcutánea se obtenía una media de 300.000 células por cada 3 gramos de grasa, mientras que de la grasa intraperitoneal no se llegaban a 100.000 células por cada 3 gramos de grasa.

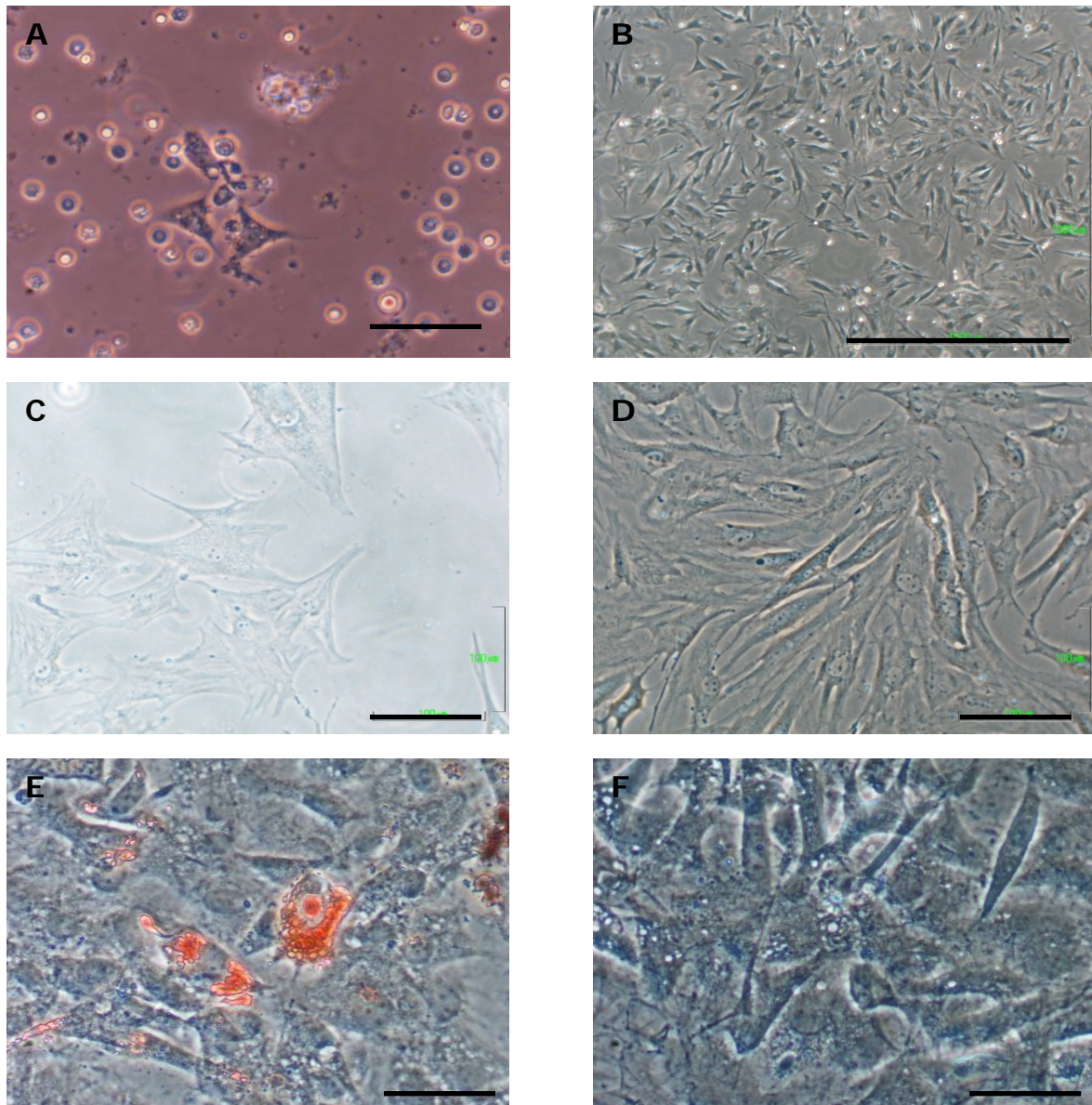
Tras su extracción y posterior digestión con colagenasa tipo I, se cultivan las células en un frasco de cultivo de superficie adherente y al microscopio óptico observamos que la fracción estromal vascular, es una población heterogénea y que se distinguen claramente, los eritrocitos del resto de células nucleadas (Fig. 3A).

Cultivamos la fracción estromal vascular y constatamos que la mayor parte de las células de esta fracción no se adhieren al plástico. Únicamente, las células de mayor tamaño y nucleadas son las que se adhieren a las superficies plásticas, mientras que los eritrocitos se mantienen en suspensión en la superficie del medio.

Tras 24 horas en cultivo, las células empiezan a adherirse y adoptan distintas morfologías, presentando fundamentalmente dos formas: unas 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 (Fig. 3A-3D).

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), y observamos una baja tasa de células positivas por pocillo en el pase inicial, que pasa a ser negativa al aumentar el número de pases (Fig. 3E).

Se realizó también la tinción de Azul de Alcian (para poner de manifiesto la presencia o ausencia de proteoglicanos), la cual dio negativa en todos los pases (Fig. 3F).

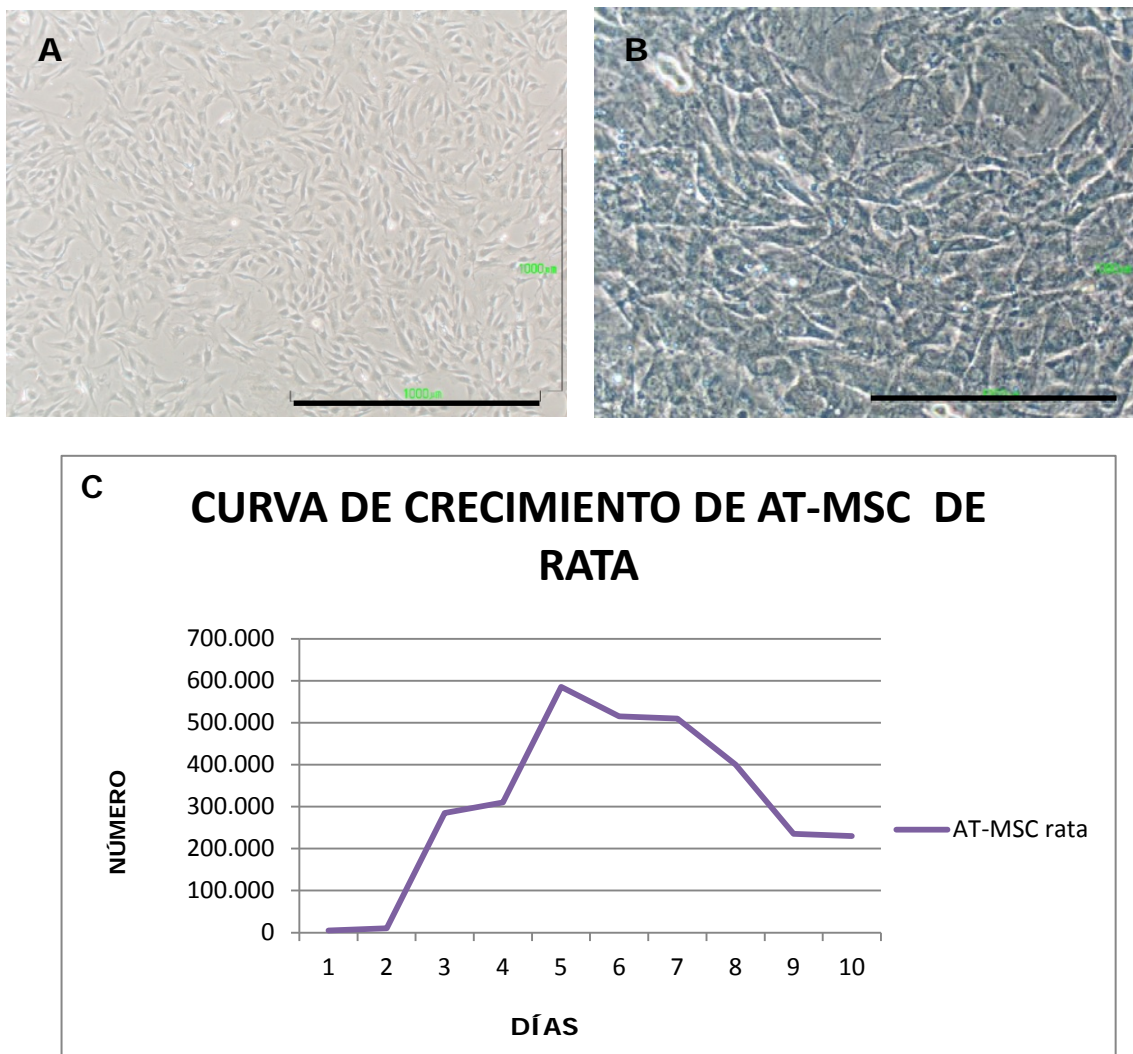


**Figura 3:** Cultivo de las células adherentes de tejido adiposo de rata. **A y B.** Células de aspecto triangular, se puede observar en suspensión los eritrocitos, y otros tipos celulares (Escala. 100 y 1.000 $\mu$ m); **C.** Células en cultivo durante 24 horas (Escala: 100  $\mu$ m); **D.** Células después de alcanzar la confluencia (Escala: 100  $\mu$ m); **E.** Adipocito en una monocapa confluyente (Escala: 100  $\mu$ m); **F.** Tinción negativa al azul de Alcian (Escala: 100  $\mu$ m).

A medida que aumentamos el número de pases, las células adoptaban una morfología muy similar, transformándose en una población mucho más homogénea.

Se observó que las células, en los primeros pases, presentaban un aspecto fibroblástico característico y que al aumentar el número de pases, había un incremento en el número de prolongaciones celulares

Posteriormente, pasamos a valorar la proliferación celular a lo largo del tiempo y observamos que, en la gráfica que representa la curva de crecimiento de las AT-MSCs de rata, en los primeros días de cultivo presentan una elevada tasa de proliferación hasta el 5º día en el que se alcanza el punto máximo de la curva y por lo tanto la confluencia de la monocapa. La multiplicación celular se produce a un ritmo elevado duplicando la población en aproximadamente 50 horas (Fig. 4).



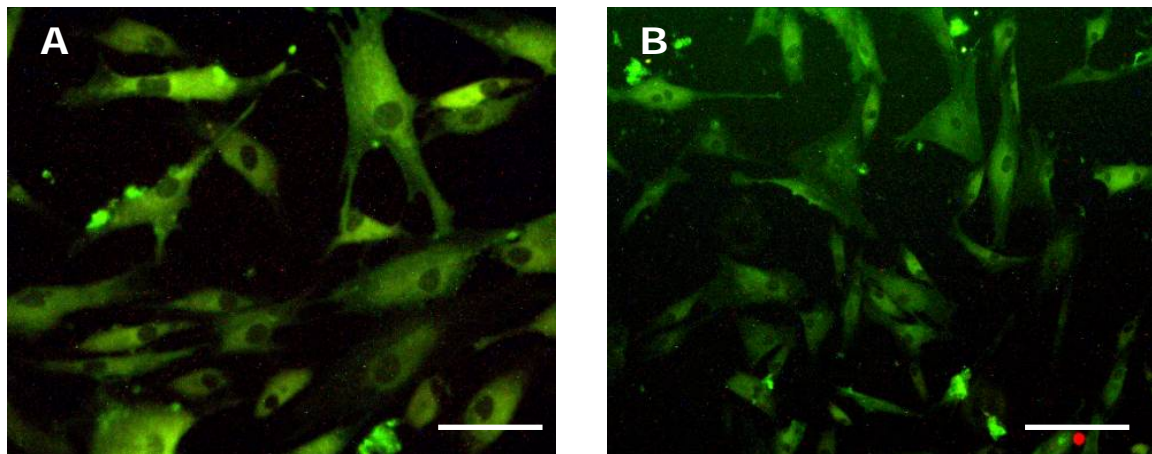
**Figura 4:** Proliferación de las AT-MSCs de rata. **A.** Células adherentes después de 36 horas en cultivo (Escala:1.000 µm).; **B.** Células adherentes después de 5 días en cultivo (Escala:1.000 µm). Se observa cómo cambia la morfología de las células y se obtiene una población celular muy uniforme; **C.** Curva de crecimiento.

## 1.2.- Caracterización de las AT-MSCs de rata

La expresión de los marcadores de superficie de las AT-MSCs CD29, CD73 y CD90 fue determinada en cultivos celulares en monocapa.

La caracterización inmunofenotípica de estas células se llevó a cabo mediante microscopía confocal, usando anticuerpos frente a los marcadores de superficie de células multipotentes CD29, CD73 y CD90.

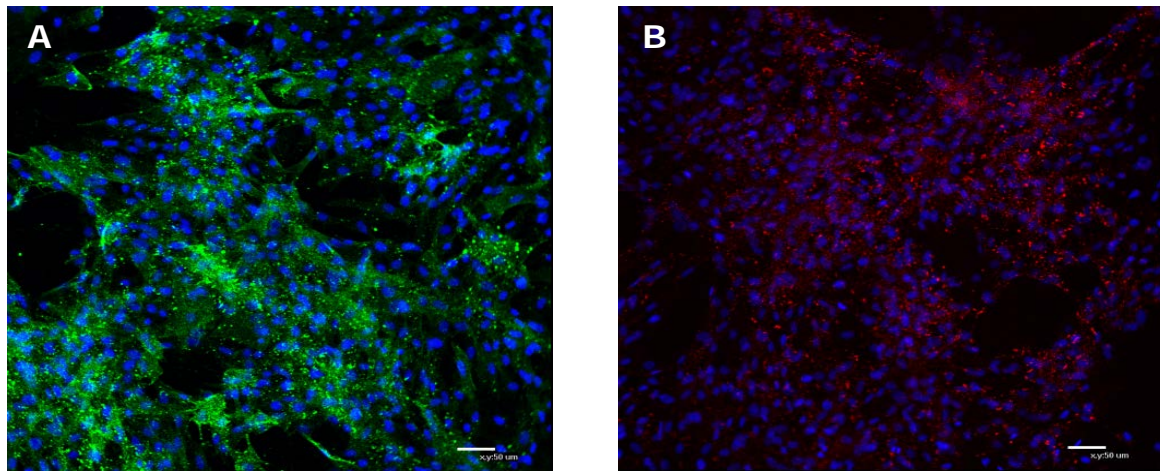
Observamos por inmunofluorescencia directa la expresión positiva para el marcador CD29 en células troncales de grasa, cuando eran cultivadas durante 4 pases (Fig. 5).



**Figura 5:** Expresión de CD29 en AT-MSCs de rata (Escala: 100  $\mu$ m). Inmunofluorescencia directa.

También observamos por microscopía confocal la expresión positiva para el marcador CD73 y CD90 en células troncales mesenquimales de tejido adiposo (Fig. 6), y vimos que nuestras células eran positivas a ambos marcadores.



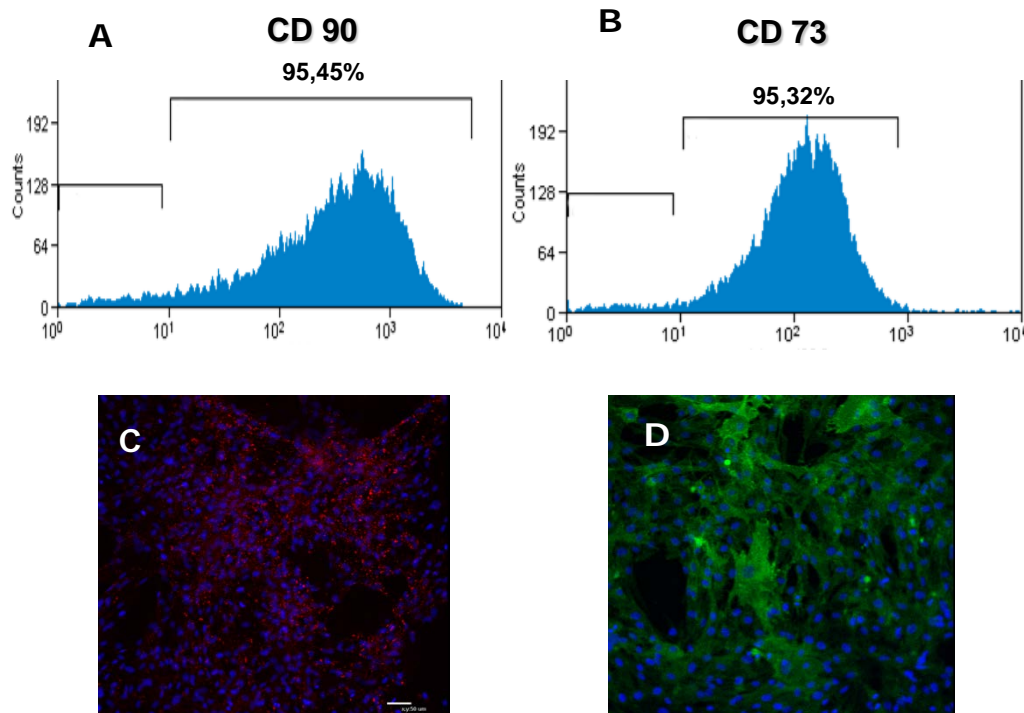


**Figura 6:** Expresión de CD73 y CD90 en AT-MSCs de rata (Escala: 50  $\mu\text{m}$ ). Microscopía confocal. **A.** Expresión de CD73 en AT-MSCs de rata cultivadas en superficie plástica; **B.** Expresión de CD90 en AT-MSCs de rata cultivadas en superficie plástica.

También se analizaron las muestras por medio de citometría de flujo y se obtuvieron los histogramas recogidos en la Fig. 7.

Los histogramas muestran en el eje de ordenadas la intensidad de fluorescencia del marcador en estudio y en el de abscisas el número de células.

Las células obtenidas en el histograma control se localizan en la región R2 e indican el total de células carentes de fluorescencia en la longitud de onda 488 nm, mientras que en las muestras problema se observa la presencia de fluorescencia, indicado en la población R3. El porcentaje de CD90 positivas para las AT-MSCs de rata es del 95,45% (Fig. 7A) y para el marcador CD73 es un 95,32% (Fig. 7B). Lo que se completa con los resultados obtenidos con microscopía confocal (Fig. 7C y 7D).



**Figura 7:** Análisis de los marcadores específicos CD90 y CD73 en AT-MSCs de rata. **A.** Histograma obtenido por citometría para el marcador CD90; **B.** Histograma obtenido por citometría para el marcador CD73; **C.** Análisis del marcador CD90 mediante microscopía confocal; **D.** Análisis del marcador CD73 mediante microscopía confocal.

### 1.3.- Pruebas de multipotencia de las AT-MSCs de rata

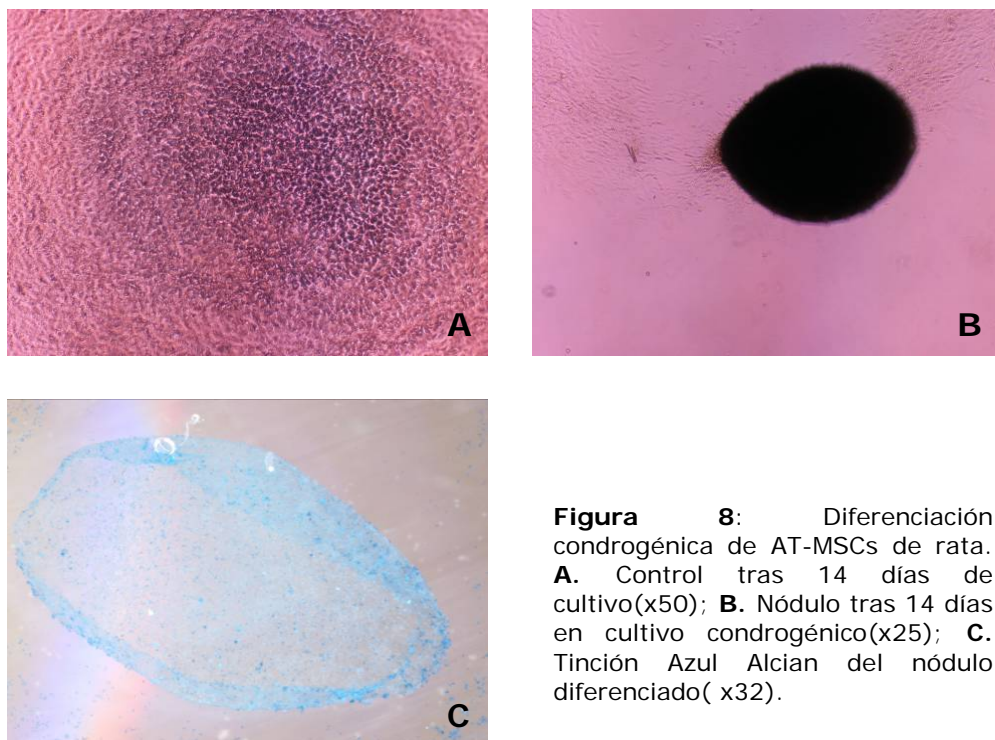
Además de los marcadores de membrana característicos de las AT-MSCs, realizamos diferentes ensayos de diferenciación de la población expandida en 3 linajes mesodérmicos: tejido cartilaginoso, óseo y adiposo con el fin de confirmar la multipotencialidad de estas células.

Para diferenciar las AT-MSCs de rata en condrocitos, realizamos cultivos en micromasa en multiplaca, con una solución control y una solución diferenciadora.

Tras la diferenciación condrogénica se observaron cambios morfológicos y fisiológicos en las células. En el cultivo en micromasa las células se levantan y repliegan sobre sí mismas dando lugar a un nódulo (Fig. 8B). Sin embargo, las células aisladas que no formaron

el acúmulo modifican su morfología hacia una forma más redondeada.

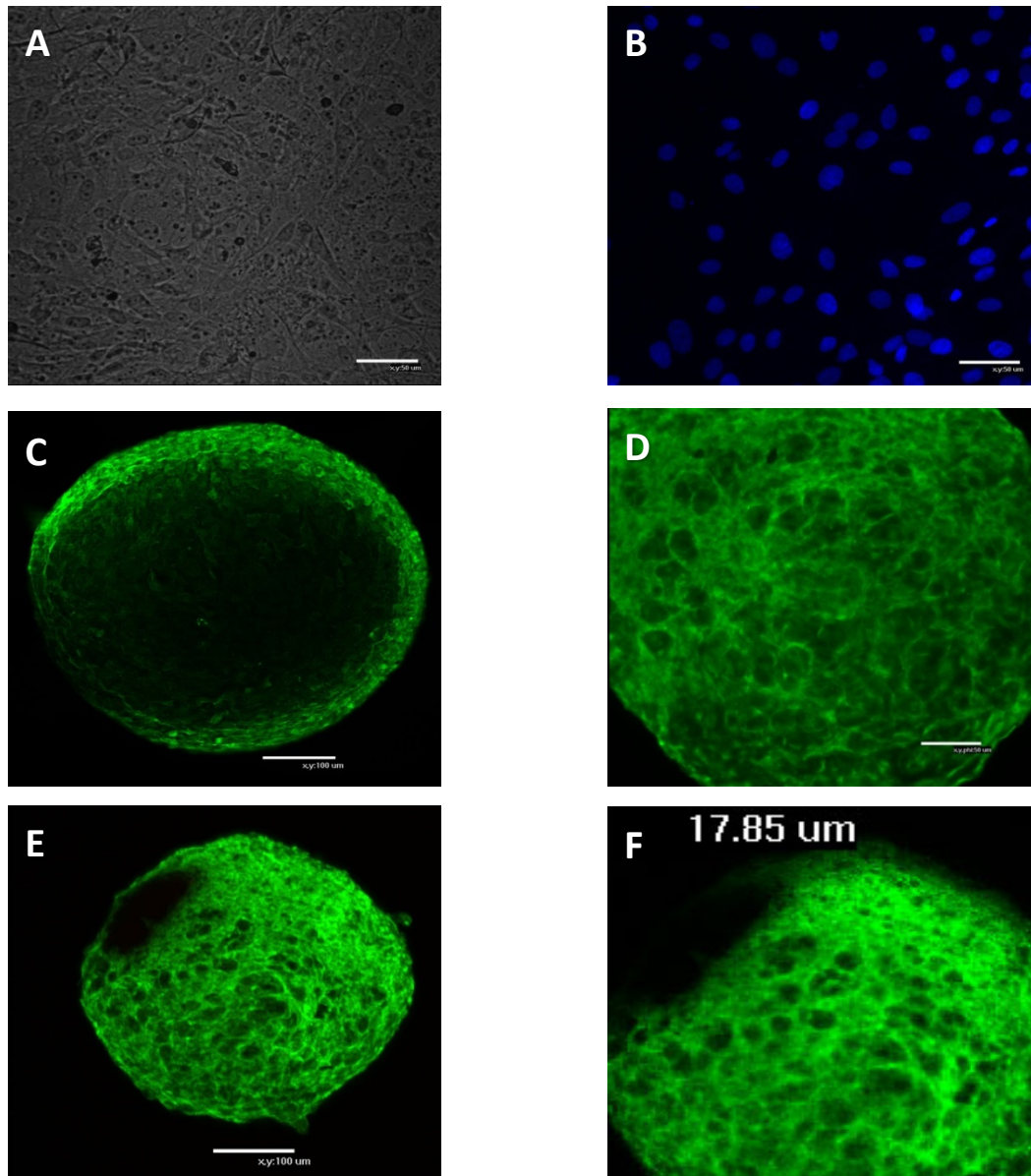
Observamos que las muestras control se pegan y se mantienen indiferenciadas, mientras que las AT-MSCs de rata, en solución diferenciadora, empiezan a formar los nódulos al cabo de 24 horas, y producen gran cantidad de matriz extracelular, principalmente a partir del día 14, lo que se ve claramente tras realizar una tinción con Azul Alcian (Fig. 8).



**Figura 8:** Diferenciación condrogénica de AT-MSCs de rata. **A.** Control tras 14 días de cultivo(x50); **B.** Nódulo tras 14 días en cultivo condrogénico(x25); **C.** Tinción Azul Alcian del nódulo diferenciado( x32).

Las células mesenquimales de rata fueron sometidas a una diferenciación condrogénica durante 14 días y posteriormente, se analizaron mediante pruebas de inmunofluorescencia para detectar el colágeno tipo II. El resultado fue observado mediante microscopía confocal y resultó positivo para las células AT-MSCs de rata diferenciadas, mientras que los nódulos control dieron resultados negativos. La fluorescencia emitida por el anticuerpo se observa en verde en el nódulo formado tras la diferenciación celular (Fig. 9). Para comprobar la diferenciación condrogénica, hicimos también PCR cuantitativa para determinar la expresión del gen de colágeno tipo II

en los cultivos diferenciados, pero no obtuvimos buenos resultados, posiblemente por defectos en la optimización de los primers utilizados.

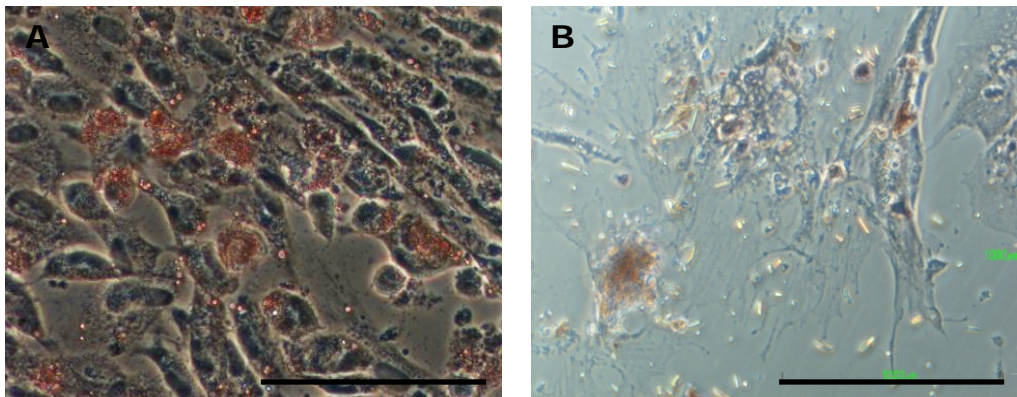


**Figura 9:** Microscopía confocal para el colágeno tipo II tras la diferenciación condrogénica en AT-MSCs de rata. **A y B.** Muestran los controles negativos de diferenciación. **C, D, E y F.** Nódulos de diferenciación condrogénica positivos a colágeno tipo II.

En cuanto a la diferenciación adipogénica, las AT-MSCs cultivadas en monocapa se mantienen en un medio de diferenciación, durante 14 días, y mediante la tinción Oil Red observamos que se ponen de manifiesto los depósitos lipídicos de las células adiposas. En

nuestras células, se vio el resultado positivo de la tinción con la marcación en rojo de los acúmulos adiposos intracelulares (Fig. 10A).

La diferenciación osteogénica de las AT-MSCs cultivadas en monocapa, fue puesta de manifiesto por medio de la tinción Red Alizarin S, la cual colorea en rojo los depósitos de calcio, siendo positiva en las células AT-MSCs de rata, como se puede observar en la Fig. 10B.



**Figura 10:** Diferenciación adipogénica y osteogénica de las AT-MSCs de rata (Escala: 1.000  $\mu\text{m}$ ). **A.** Tinción Oil Red. **B.** Tinción Rojo Alizarín.

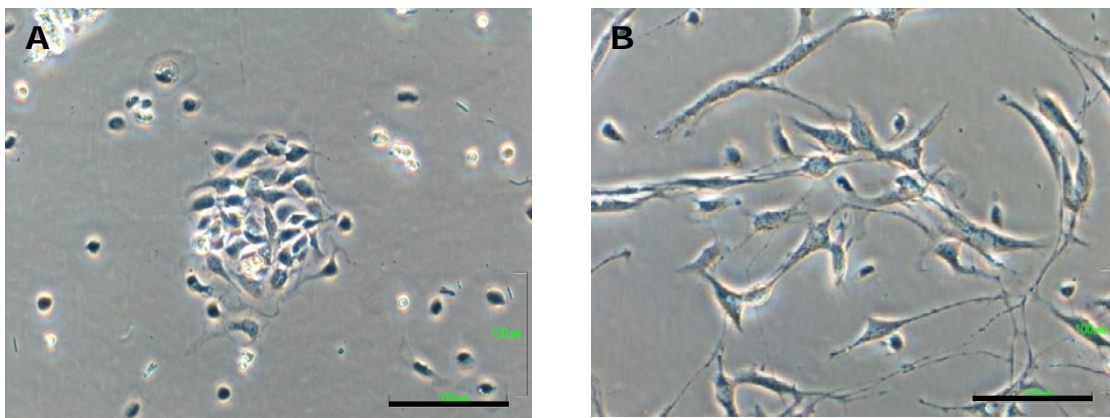
## 2.- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs DE CABALLO

### 2.1.- Obtención y cultivo de las MSCs de caballo

Las MSCs de caballo fueron aisladas tanto del tejido adiposo, como de la médula ósea de los caballos donantes.

Las biopsias de tejido adiposo de caballo se disociaron mediante digestión con colagenasa tipo I. Tras 2 horas en disociación los adipocitos maduros, como acumulan lípidos en su interior, flotan permitiendo así su separación del resto de tipos celulares mediante centrifugación. El pellet que se obtiene constituye la llamada Fracción Estromal Vascular, la cual es una población heterogénea en la que podemos distinguir claramente los eritrocitos del resto de células nucleadas.

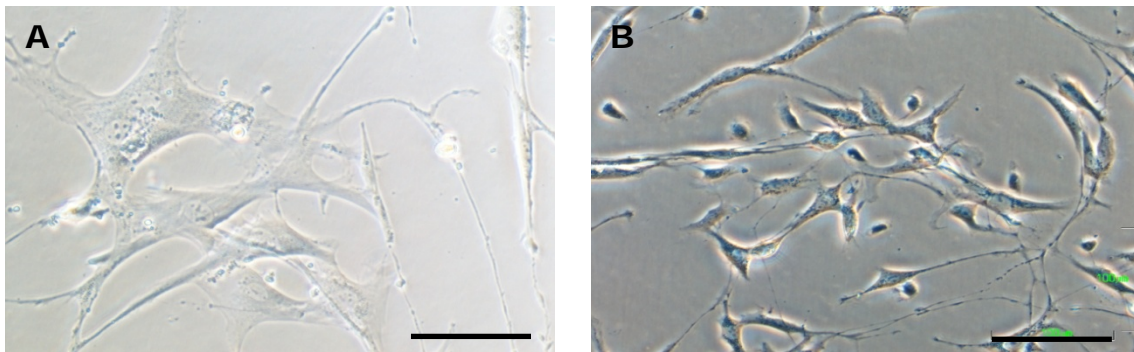
Tras su aislamiento y cultivo en condiciones estándar en frascos de cultivo, constatamos que la mayoría de las células no se adhieren, en concreto, los eritrocitos. Dentro de las células adheridas se distinguen básicamente dos morfologías bien diferenciadas: unas ligeramente redondeadas con vacuolas en su interior (pre-adipocitos) y en segundo lugar, otro tipo celular de apariencia fibroblástica y triangular con prolongaciones. Este último tipo celular es el más abundante (Fig. 11).



**Figura 11:** Cultivo de la Fracción Estromal Vascular (Escala: 100 $\mu$ m). **A.** Eritrocitos en suspensión y células pre-adipogénicas; **B.** Células adherentes con vacuolas y morfología triangular.

A medida que se van realizando subcultivos, la población se va convirtiendo en una monocapa mucho más homogénea, desapareciendo el tipo redondeado. Tras 48 horas en cultivo, las células comienzan a proliferar de manera que al 8<sup>o</sup> día alcanzan la confluencia. El número de células aumenta durante estos primeros días cerca de 25 veces. Estas células también presentan viabilidades superiores al 90% y se pueden mantener en cultivo durante largos períodos de tiempo, manteniendo su elevada tasa de proliferación.

El comportamiento en cuanto a la proliferación de las AT-MSCs de rata y caballo es similar, salvo que las células obtenidas de la grasa de caballo son de menor tamaño y con formas más alargadas que las de rata (Fig. 12).



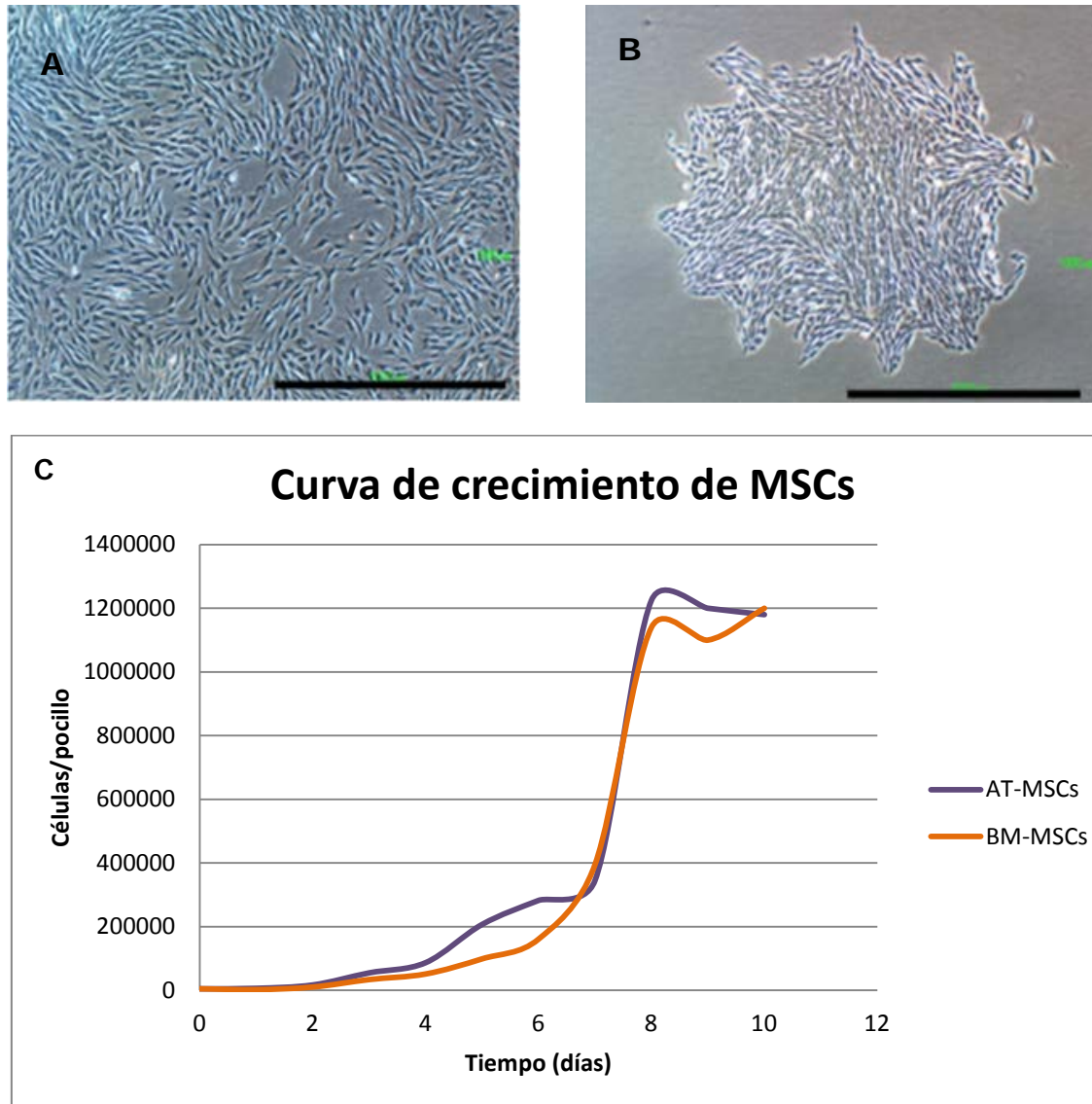
**Fig. 12:** Morfología de las células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo de rata **(A)** y caballo **(B)** (Escala: 100 $\mu$ m).

Los aspirados de médula ósea se obtuvieron de 3 caballos, haciendo la extracción de las primeras esternebras con el animal en la estación y bajo control ecográfico. Estas células se aislaron con éxito utilizando un gradiente de densidad. Las poblaciones de MSCs de médula ósea de caballo tienen características morfológicas muy similares a las células de humano y roedores.

Aunque presentan una morfología similar a las de tejido adiposo, podemos destacar como diferencia significativa entre los dos tipos celulares que nos ocupan en el presente estudio, que las AT-MSCs crecen homogéneamente hasta confluir en una monocapa, mientras que las BM-MSCs, muestran un crecimiento más lento y se produce en forma de colonias aisladas, que finalmente confluyen hasta formar una monocapa completa (Fig. 13A-B). Cuando las células se subcultivan pierden este comportamiento y crecen con el mismo patrón que las células procedentes del tejido adiposo.

En la gráfica que representa la curva de crecimiento de los dos tipos de MSCs valorados en nuestro trabajo, se observa que las AT-MSCs, en los primeros días de cultivo, tienen una elevada proliferación, que se iguala a las BM-MSCs después del 6<sup>o</sup> día hasta alcanzar una monocapa homogénea final hacia el 8<sup>o</sup> día de cultivo. Se nota una curva ligeramente más elevada, en cuanto a la velocidad de proliferación, de las AT-MSCs respecto a sus homólogas derivadas de la médula ósea. Las AT-MSCs forman una población más homogénea

y alcanzan antes que las BM-MSCs la confluencia en monocapa. Aunque con resultados finales, en cuanto al número de células bastante similares en ambos tipos celulares (Fig. 13C).



**Figura 13:** Morfología de MSCs de caballo. Microscopía óptica. **A.** AT-MSCs de caballo; **B.** BM-MSCs de caballo en un pase 0 tras 5 días de cultivo. Ambos grupos forman monocapas de células fibroblásticas adheridas a los frascos de cultivo. Las AT-MSCs crecen de manera homogénea y las BM-MSCs formando colonias. (Escala: 1.000  $\mu\text{m}$ ); **C.** Medición de la proliferación de las AT-MSCs y de las BM-MSCs en un pase 0.

## 2.2.- Caracterización de las MSCs de caballo

Tras el aislamiento y cultivo de las MSCs de caballo procedemos a su caracterización mediante un análisis citométrico y de



inmunofluorescencia de los marcadores de superficie celular de las dos muestras a estudio.

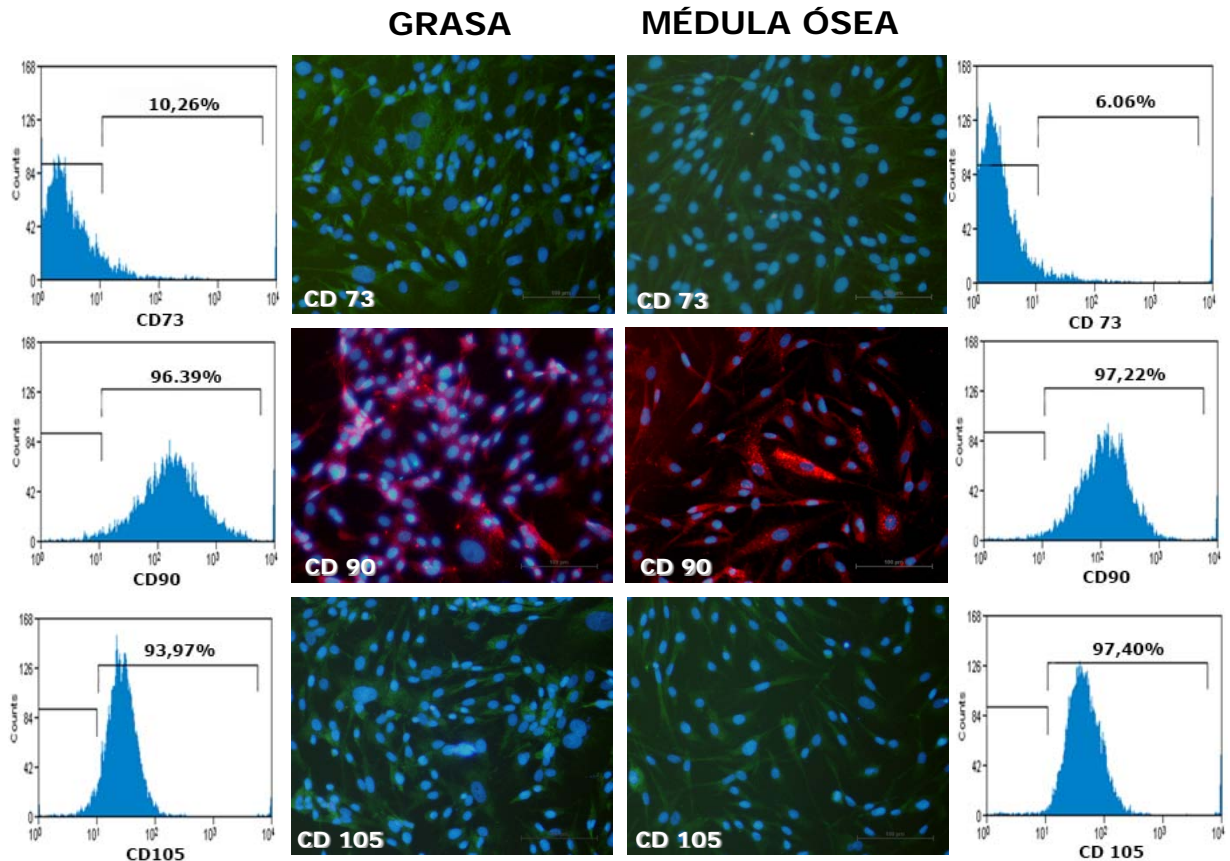
En dichas poblaciones hemos analizado la expresión de CD73, CD90 y CD105 como marcadores de superficie específicos de células troncales mesenquimales. De esta manera, la caracterización de las MSCs equinas mediante inmunofluorescencia confirma que las características y expresión de los marcadores de superficie celular concuerdan con los esperados de las MSCs.

También examinamos las poblaciones celulares mediante citometría de flujo obteniendo resultados positivos para cada marcador, excepto para el CD73, quizás porque el anticuerpo utilizado no era específico para la especie equina.

En primer lugar, obtenemos unos histogramas que muestran un resultado negativo para el control de los dos tipos celulares, mientras que para los marcadores CD90 y CD105 los resultados fueron positivos obteniendo un elevado porcentaje de células marcadas.

El resultado obtenido para el marcador CD73 fue de un 10,26% para AT-MSCs y un 6,06% para BM-MSCs, resultado bajo pensamos que debido a la inespecificidad de especie de los anticuerpos para el marcador de superficie CD73. Mientras que para el marcador CD90 el resultado fue de un 96,39% para AT-MSCs y un 97,22% para BM-MSCs. Cuando analizamos el marcaje con CD105, obtuvimos un porcentaje del 93,97% en AT-MSCs y un 97,40% en BM-MSCs.

El resultado obtenido por microscopía confocal para los marcadores de superficie fue positivo en todos los casos (Fig. 14).



**Figura 14:** Análisis de los marcadores específicos CD73, CD90 y CD105 en AT-MSCs y BM-MSCs de caballo por citometría de flujo y microscopía confocal.

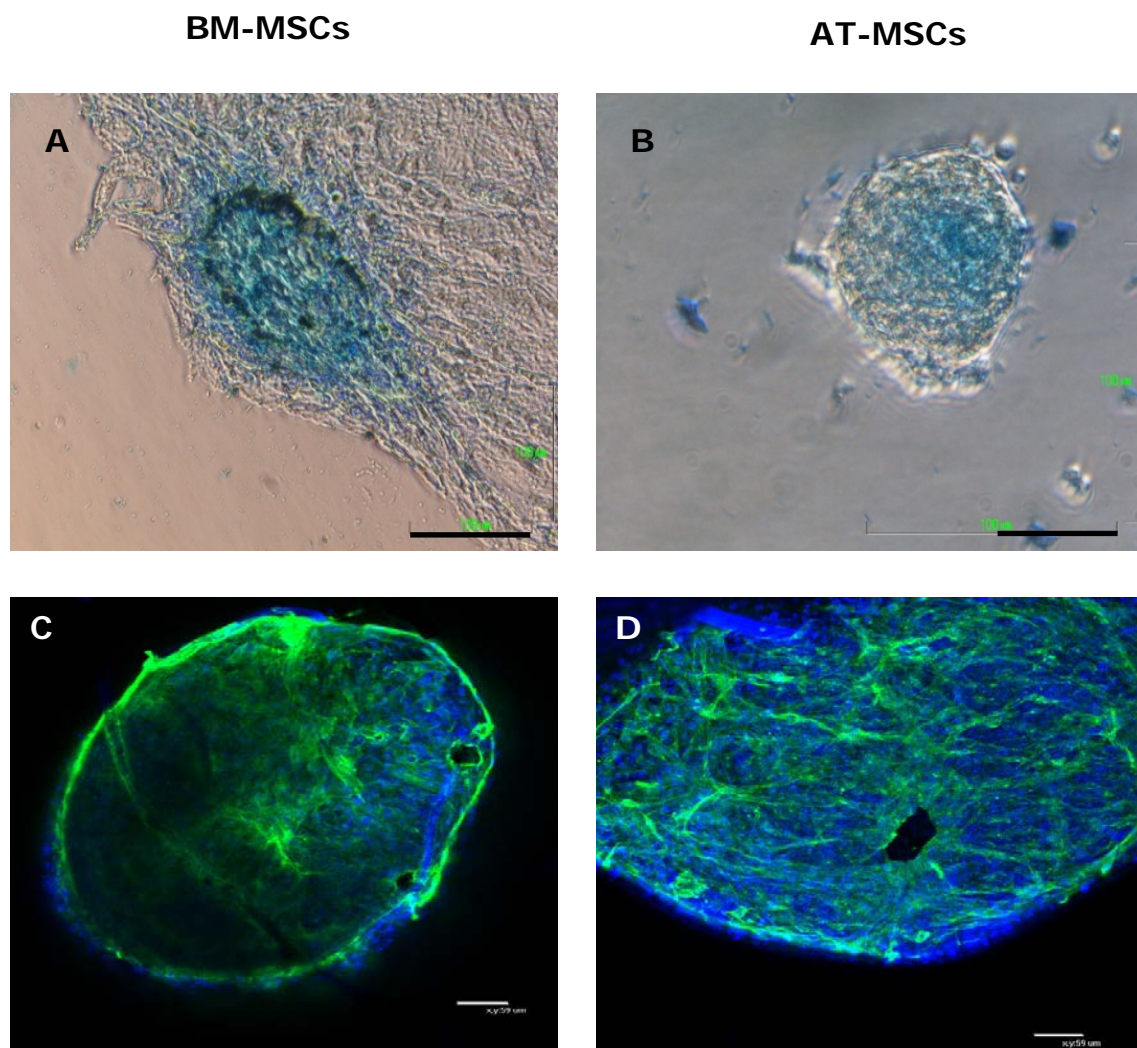
### 2.3.- Pruebas de multipotencia de las MSCs de caballo

Además de los marcadores de superficie celular característicos de las células troncales mesenquimales realizamos diferentes ensayos de diferenciación de las AT-MSCs y las BM-MSCs expandidas en 3 linajes mesodérmicos como son: los tejidos cartilaginoso, óseo y adiposo con el fin de confirmar la multipotencialidad de nuestras células.

La diferenciación condrogénica tras 14 días de cultivo en micromasa, para las MSCs de caballo fue analizada utilizando la tinción Azul Alcian (Fig. 15).

Se obtuvieron resultados positivos para las BM-MSCs (Fig. 15A) y para las AT-MSCs (Fig. 15B) las cuales forman unos pequeños nódulos brillantes durante su cultivo en diferenciación condrogénica.

Tras cultivar las MSCs en forma de pellet, llevamos a cabo pruebas de inmunofluorescencia para poner de manifiesto la presencia de colágeno tipo II en la matriz extracelular, pero ante la dificultad para conseguir un anticuerpo específico de caballo, no obtuvimos un marcaje positivo. Por lo que nos decantamos por el agregano, el cual también es un abundante proteoglicano dentro de la matriz extracelular del cartílago, obteniendo resultados positivos tanto en las AT-MSCs (Fig. 15D), como en las BM-MSCs (Fig. 15C) de caballo.



**Figura 15:** Estudio de la diferenciación condrogénica de las MSCs de caballo. **A.** Nódulo de BM-MSCs de caballo tinción Azul Alcian; **B.** Nódulo de AT-MSCs de caballo tinción Azul Alcian; **C.** Nódulo de BM-MSCs de caballo microscopía confocal para el agregano; **D.** Nódulo de AT-MSCs de caballo microscopía confocal para el agregano.

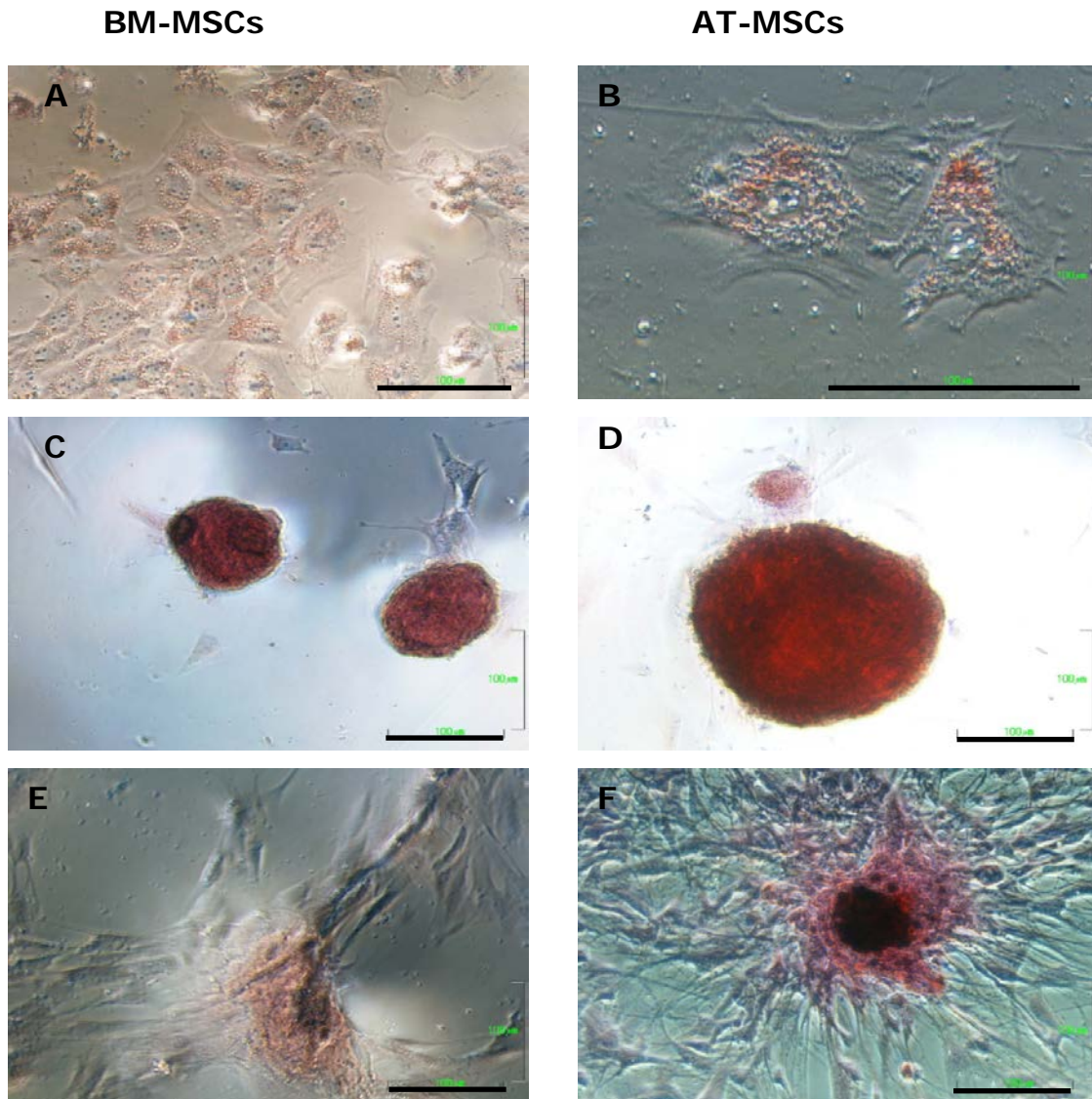
Las MSCs cultivadas en medio de diferenciación adipogénica, durante 14 días, se diferenciaron como se observa mediante el resultado analizado con la tinción Oil Red-O, que pone de manifiesto los depósitos lipídicos en las células adiposas.

En cuanto a las AT-MSCs y las BM-MSCs de caballo el resultado fue positivo, poniéndose de manifiesto la presencia de depósitos lipídicos teñidos de rojo y con numerosas vacuolas grasas intracelulares (Fig. 16A-B).

La diferenciación osteogénica de las MSCs de caballo, fue puesta de manifiesto por medio de dos tinciones: Red Alizarin S y von Kossa, siendo positivas ambas, tanto en las células BM-MSCs (Fig. 16A) como en las AT-MSCs (Fig. 16B).

En la tinción con Red Alizarin se observaron unos nódulos celulares compactos teñidos de rojo, mientras que las células aisladas se mantienen sin coloración, debido a que la tinción es sobre los depósitos cálcicos extracelulares.

En la tinción de von Kossa se observan los depósitos de calcio en coloración negra.



**Figura 16:** Diferenciación adipogénica y osteogénica de MSCs de caballo (Escala: 100 µm). **A.** Tinción Oil Red para las BM-MSCs de caballo; **B.** Tinción Oil Red para las AT-MSCs de caballo; **C.** Tinción Rojo Alizarín de BM-MSCs de caballo; **D.** Tinción Rojo Alizarín de AT-MSCs de caballo; **E.** Tinción von Kossa de BM-MSCs de caballo; **F.** Tinción von Kossa de AT-MSCs de caballo.

## **2.4.- Caracterización morfológica de las MSCs de caballo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Para obtener una mejor caracterización de las MSCs de caballo hacemos un estudio de su ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión.

Nos encontramos con células de un tamaño aproximado de 15-20  $\mu\text{m}$ . Los núcleos celulares son excéntricos, irregulares y con varios nucléolos, también se observan acúmulos de cromatina condensada alrededor de la membrana nuclear (Fig. 17A-B). La membrana plasmática presenta formas irregulares lo que facilita el contacto célula-célula.

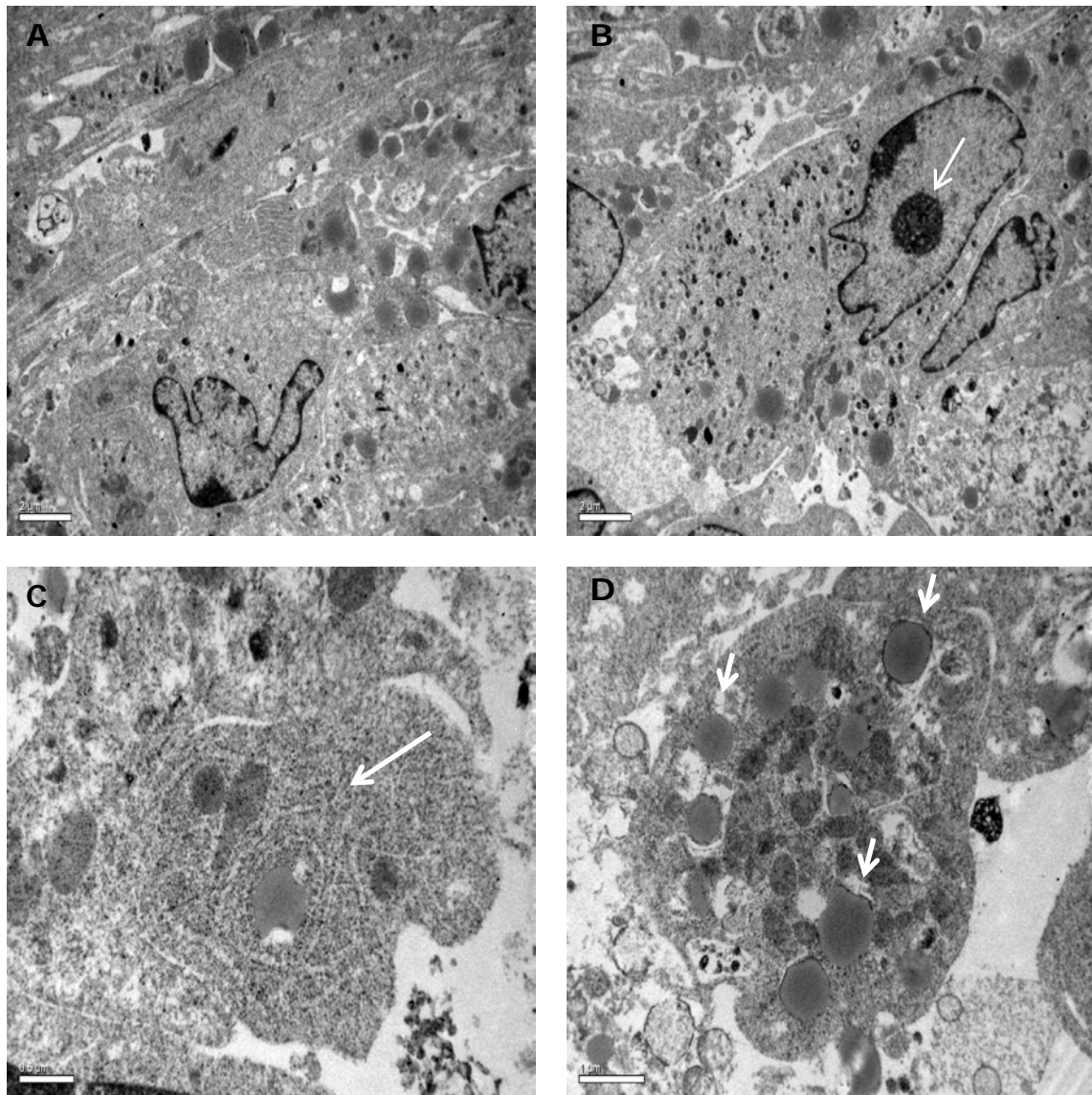
Los orgánulos citoplasmáticos se localizan principalmente en la zona central de la célula, de manera que, cerca del núcleo encontramos numerosas mitocondrias tanto de forma redonda, como alargadas y cercanas a los núcleos (Fig. 18A).

El aparato de Golgi, con su característica forma de cisternas y sacos se encuentra rodeado de vacuolas y pequeñas vesículas, se observa muy dilatado (Fig. 18C).

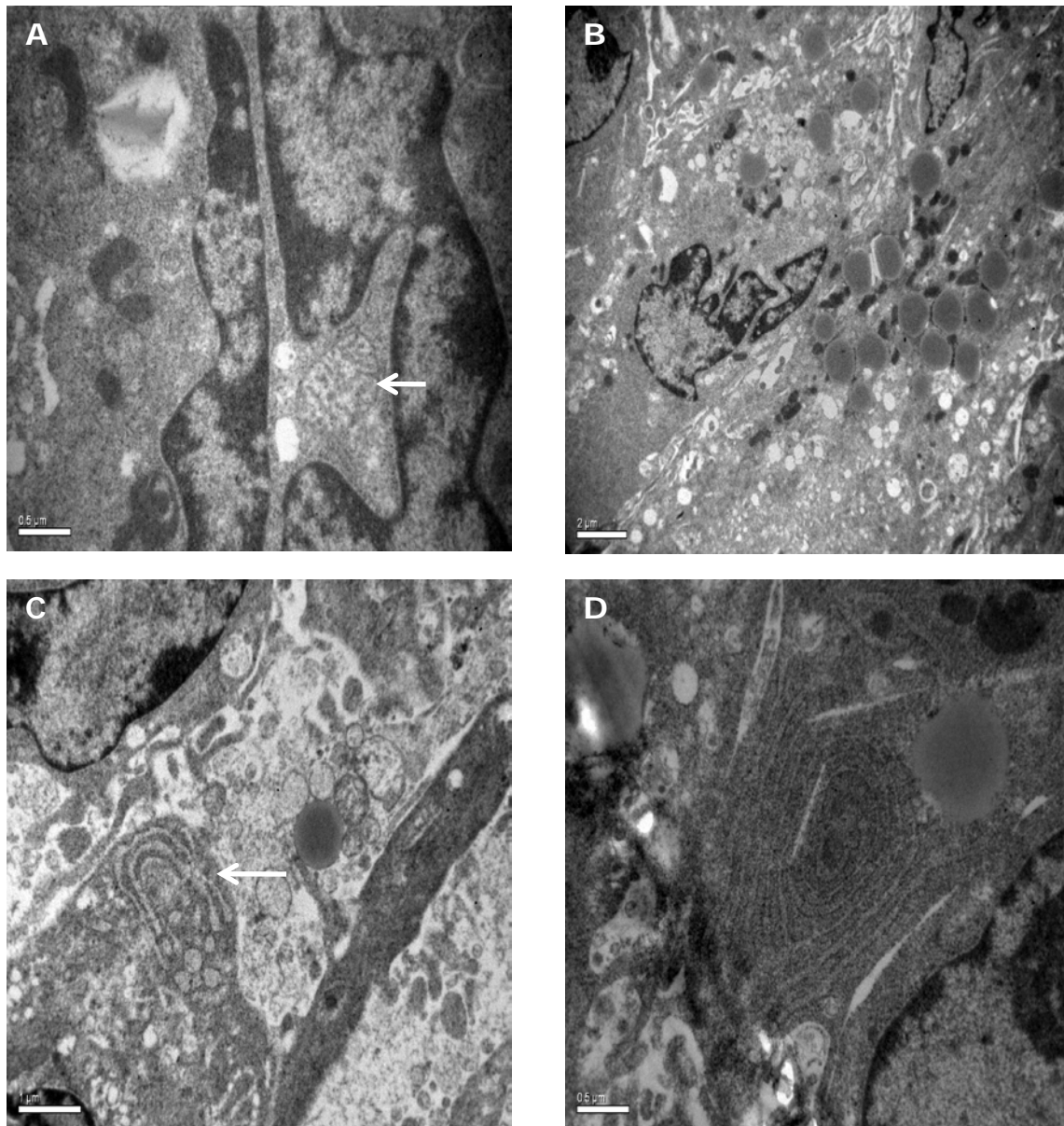
También se observa un extenso retículo endoplasmático rodeado de numerosos ribosomas, lo que es indicativo de una gran producción protéica (Fig. 17C). El retículo endoplásmico se localiza por todo el citoplasma y según los cortes, se observa en forma de saco o vacuolas (Fig. 18D).

Se aprecia un elevado número de vacuolas, lisosomas vesículas de pinocitosis en todo el citoplasma, entre las que destacan las vacuolas grasas (Fig. 17D), sobretodo en las zonas proximales al retículo endoplasmático.

Al valorar la morfología ultraestructural de las MSCs, no se aprecian diferencias significativas entre las AT-MSCs y las BM-MSCs.



**Figura 17:** TEM AT-MSCs de caballo. **A-B.** Núcleos celulares con centriolos (flecha) y cromatina condensada en la periferia de la membrana nuclear (x6.000); **C.** Retículo endoplasmático rugoso con los ribosomas adheridos (flecha) (x25.000); **D.** Vacuolas lipídicas (flecha) (x25.000).



**Figura 18:** TEM BM-MSCs de caballo. **A.** Mitocondria (flecha) con crestas mitocondriales cercanas a los núcleos (x25.000); **B.** Núcleos celulares y diversos orgánulos citoplasmáticos (x15.000); **C.** Aparato de Golgi (flecha) (x15.000); **D.** Retículo endoplasmático (x25.000).



### **3.- OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE MSCs**

#### **3.1.- Determinación de la viabilidad celular de las AT-MSCs de rata criopreservadas.**

Uno de los problemas prácticos con el que la ingeniería de tejidos se puede encontrar a la hora de su utilización en la clínica, es el transporte y conservación celular durante largos periodos de tiempo.

Pudimos observar que cuando la grasa era mantenida en hielo durante 24 horas en un medio de transporte específico (90% DMEM, 10 % SFB y solución antibiótica/antimicótica) en refrigeración, las células se mantenían viables, aunque en menor cantidad, y se adherían sin problemas a los frascos de cultivo.

Por ello pensamos en utilizar diferentes protocolos descritos en la bibliografía, con el fin de evaluar cuál era el método de congelación más adecuado para poder prolongar la conservación de nuestras células (MSCs), durante largos periodos de tiempo, con el fin de poder utilizarlas en futuras terapias celulares.

Para congelar las células, se emplearon los distintos protocolos anteriormente descritos, en la tabla 5 del apartado 5.1 de Materiales y Métodos, y se procedió a descongelarlas tras 12 semanas de criopreservación, para así evaluar cuál sería el mejor protocolo.

La viabilidad celular se determinó mediante citometría de flujo, valorando las células vivas, muertas y apoptóticas mediante un protocolo de tinción que emplea anexina V, unida a Alexa Fluor 488<sup>®</sup> y el Ioduro de propidio, que permiten detectar la fluorescencia mediante un citómetro.

En las células apoptóticas, la fosfatidilserina, que es un fosfolípido de la membrana plasmática celular, se transloca del interior al exterior de la membrana quedando expuesta al ambiente extracelular.

La Anexina V es una proteína de unos 36 kD de unión específica a los fosfolípidos y dependiente de  $Ca^{2+}$ , por lo que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina (PS) y que se une a ella cuando ésta se expone al exterior de la membrana plasmática celular, lo que ocurre cuando la integridad de la membrana está afectada en las fases precoces de la apoptosis celular. Así se pueden distinguir las células vivas (no teñidas), de las células apoptóticas (verdes) de las muertas (rojas) en el citómetro.

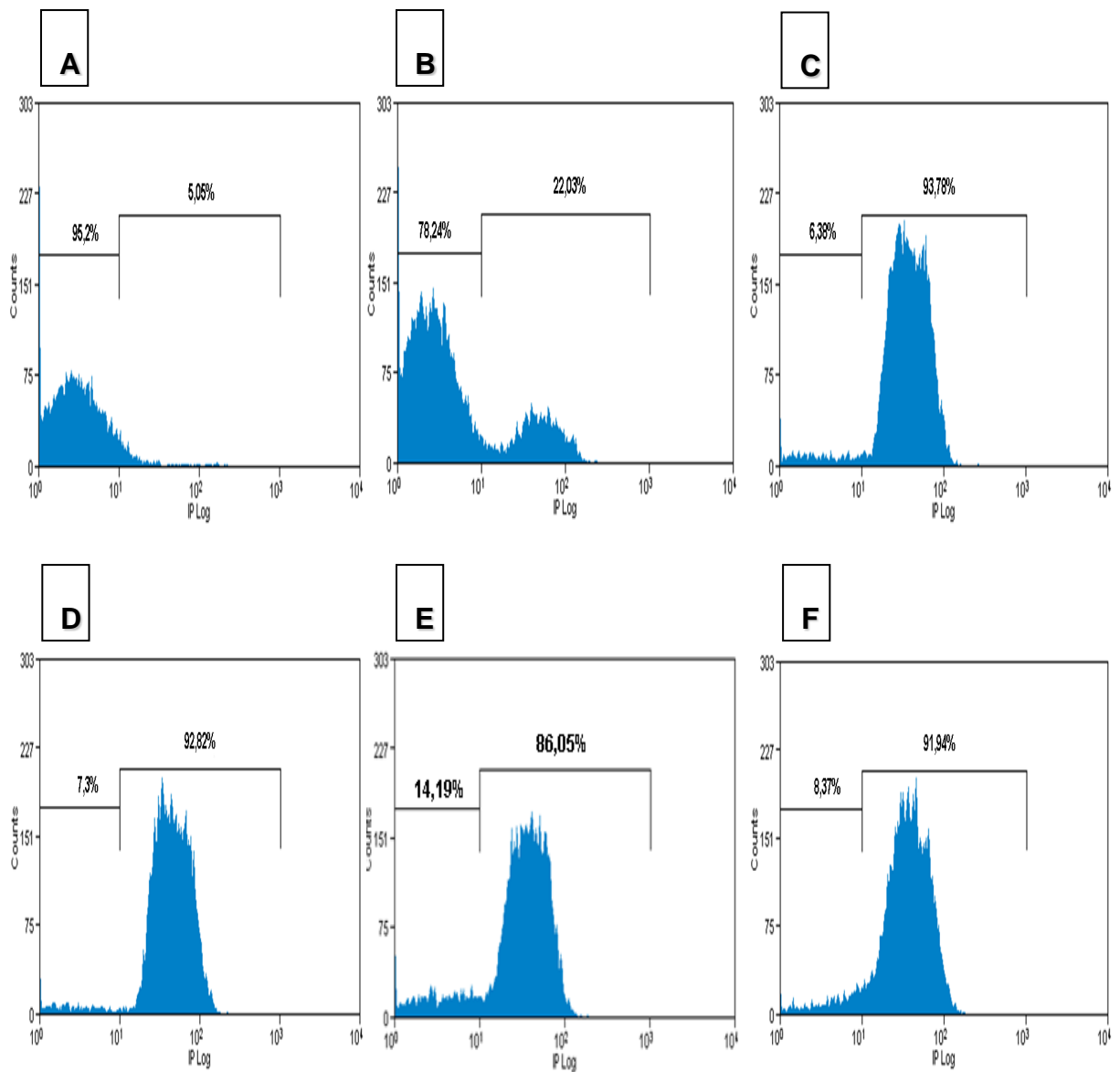
El Ioduro de propidio es un colorante que se une al ADN celular, cuando éste sale al exterior al romperse la membrana celular, lo que ocurre cuando existe una necrosis celular irreversible. De manera que las células que son Anexina V positivas y Ioduro de propidio negativas son células viables; las células que se encuentran en un estadio de apoptosis temprana son Anexina V positivas y Ioduro de propidio negativas, mientras que las células que se encuentran en un estadio de apoptosis tardío o necrosis resultan Anexina V y Ioduro de propidio positivas.

Mientras que las células que se encuentran en un estadio de apoptosis temprana pueden excluir el IP, las IP positivas y Anexina V negativas se consideran células necróticas.

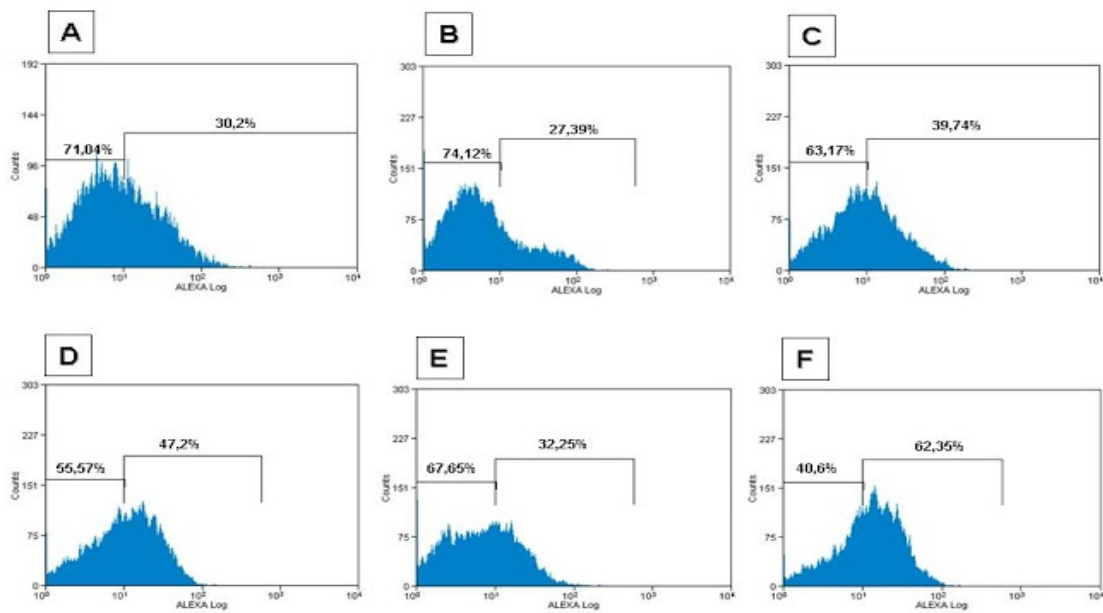
Los resultados fueron analizados mediante el programa Cell Quest®.

Observamos que el protocolo de criopreservación **A**, fue con el que se obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad celular (95%). El número de células apoptóticas, determinado con Anexina V, fue similar con todos los protocolos utilizados. Obtuvimos un menor

porcentaje de células apoptóticas utilizando el protocolo A y el B (Fig. 19-20).



**Figura 19:** Datos representativos del porcentaje de células vivas después de la criopreservación. La muerte celular se determinó mediante tinción con Ioduro de Propidio.



**Figura 20:** Datos representativos del porcentaje de células apoptóticas después de la criopreservación. La apoptosis se determinó mediante tinción con Anexina V.

Por lo que una vez analizados los resultados de los 6 medios diferentes de criopreservación, observamos que los mejores resultados referentes a los parámetros estudiados, fueron los obtenidos con el protocolo **A**, el cual consistía en un 10% DMEM, 10% DMSO, 80% de SFB, llevados hasta los  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y a continuación almacenados en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  y finalmente descongelado en un baño templado a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Por tanto, quedó patente que las células preservadas con 80% de SFB demostraron tener mejor viabilidad que las conservadas con 80 % de DMEM.

### 3.2.- Caracterización de las AT-MSCs de rata criopreservadas

Dado que la exposición continuada a los agentes criopreservantes, como el DMSO y el procedimiento de congelación pueden producir daño celular, decidimos investigar si el

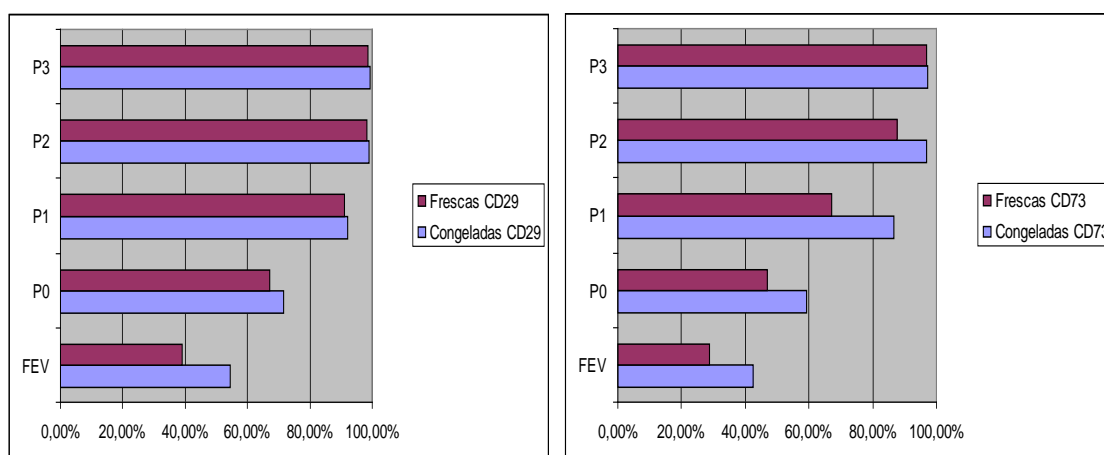
procedimiento de criopreservación altera la expresión de las proteínas de superficie, es decir, de los marcadores de superficie.

El nivel de expresión fue analizado en células en fresco y tras la congelación, 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.

La expresión de los perfiles de los marcadores de superficie celular CD29 y CD73, fue analizada mediante citometría de flujo (Fig. 21). Donde se observó que las AT-MSCs, antes y tras 12 semanas de criopreservación, muestran patrones similares de expresión de los marcadores de superficie seleccionados para los sucesivos pases. De la misma manera, los cambios secuenciales en la expresión de los patrones fueron parecidos en los 2 grupos de AT-MSCs. Salvo el CD73, que decreció en el primer pase de las células frescas; en general, se observó una mayor expresión de marcadores en las células criopreservadas que en las células frescas.

El marcador de superficie CD29, generalmente permanece constante en los dos grupos. Por lo tanto, con los resultados obtenidos se ve que la expresión de los marcadores de superficie celular de las AT-MSCs experimenta cambios muy pequeños bajo condiciones de criopreservación en relación a las células frescas.

En este estudio, demostramos que la criopreservación no altera los marcadores de superficie de las AT-MSCs de rata. Que las células criopreservadas mantienen similares ratios de crecimiento con las células no criopreservadas y crecen a una misma velocidad para alcanzar la confluencia en el mismo periodo de tiempo de cultivo; lo cual es indicativo de que la criopreservación de las AT-MSCs no retrasa o altera la proliferación celular.



**Figura 21:** Expresión del CD29 y CD73 en células frescas y congeladas AT-MSCs de rata en varios subcultivos.

### 3.3.- Evaluación de la influencia de la criopreservación en la multipotencialidad de las MSCs de rata y caballo.

El potencial condrogénico de las AT-MSCs de rata criopreservadas se evaluó utilizando el protocolo denominado por nosotros para nuestro estudio, como: **A** ya que hemos observado que son las que conservan un porcentaje de viabilidad más elevado.

Tras la descongelación celular y en cultivos en micromasa y en monocapa en multiplacas de 24 pocillos, se les añadió un medio de diferenciación condrogénica y un medio básico que se utilizó de control.

Para poder evaluar si se ha llevado a cabo la diferenciación condrogénica adecuadamente, se realiza una tinción con Azul Alcian y se complementa con microscopía confocal. De este modo observamos que las células criopreservadas, mantenidas con el medio de control se mantienen adheridas pero indiferenciadas, mientras que sus homólogas cultivadas con el medio diferenciador empiezan a formar nódulos a las 24 horas y a partir del día 14 tienen una elevada producción de matriz extracelular (Fig. 22A-B).

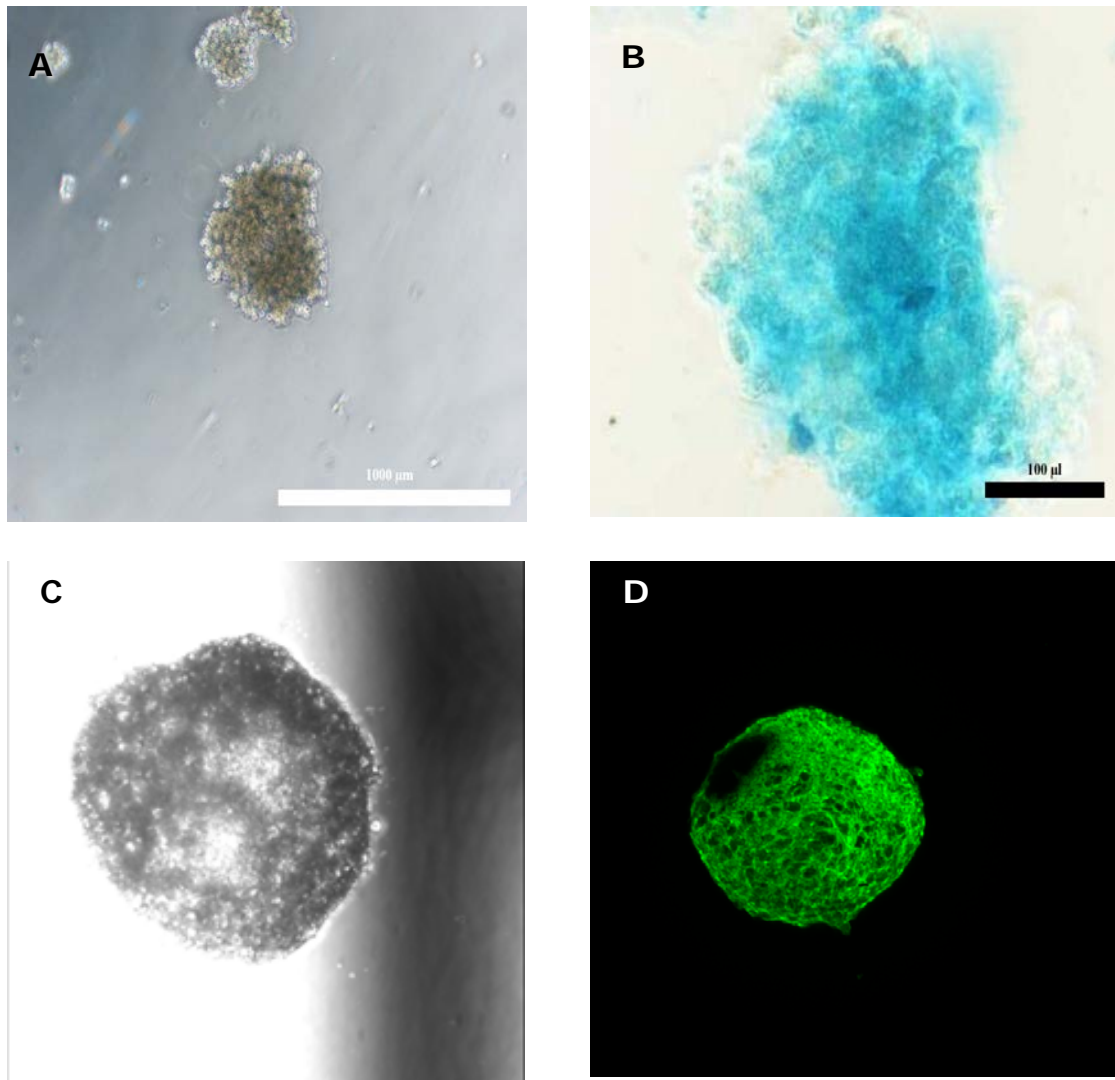
Para poder evaluar la influencia de la criopreservación sobre la capacidad de diferenciación de las células troncales, se realizaron pruebas de inmunofluorescencia indirecta utilizando como marcador el colágeno tipo II.

El colágeno tipo II es un marcador de diferenciación de tejido cartilaginoso, por lo que se utilizó para comprobar la diferenciación de las células troncales en cartílago.

Utilizamos como control células troncales de tejido adiposo sometidas a congelación. Después de mantener los cultivos en diferenciación durante 7 días, observamos que tanto las células frescas (no criopreservadas), como las criopreservadas formaban nódulos de gran tamaño, visibles macroscópicamente.

Los resultados de microscopía confocal pusieron de manifiesto un marcaje positivo muy intenso para el colágeno tipo II tanto en las células frescas como en las criopreservadas (Fig. 22C-D). Por lo tanto, no vimos diferencias significativas en la capacidad de diferenciación de las células que habían sido sometidas a un proceso de criopreservación.

Todo ello es indicativo de una diferenciación condrogénica positiva tras soportar un proceso de criopreservación.



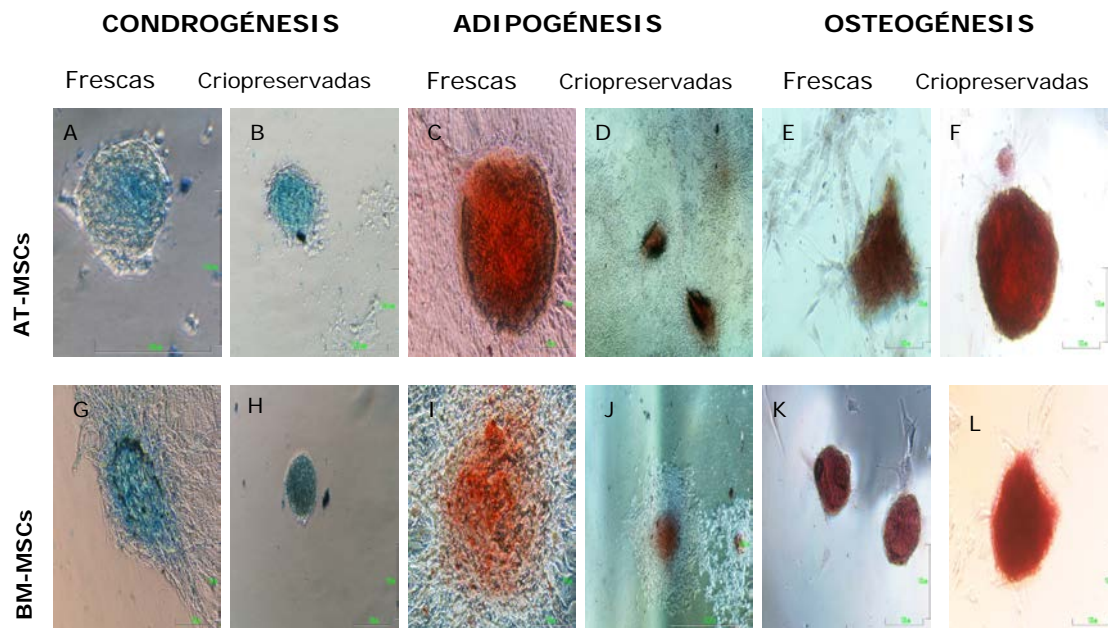
**Figura 22:** Nódulos de AT-MSCs de rata en diferenciación condrogénica. **A.** Nódulo de células troncales diferenciadas y criopreservadas (Escala: 1.000µm); **B.** Nódulo de células troncales diferenciadas y criopreservadas. Tinción Azul Alcian (Escala: 100µm); **C-D.** Nódulo de células troncales diferenciadas y criopreservadas con expresión de colágeno tipo II con microscopía confocal .

Los resultados obtenidos en rata, se complementan con pruebas de multipotencia en otra especie animal como es el caballo. Para ello, se llevaron a cabo diferentes tipos de tinciones en las MSCs de caballo para evaluar su capacidad multipotente tras la criopreservación (Fig. 23).

Evaluamos mediante tinciones, la capacidad de diferenciación de las AT-MSCs y BM-MSCs de caballo hacia la condrogénesis, adipogénesis y osteogénesis, sometidas a criopreservación durante un periodo de 12 semanas.



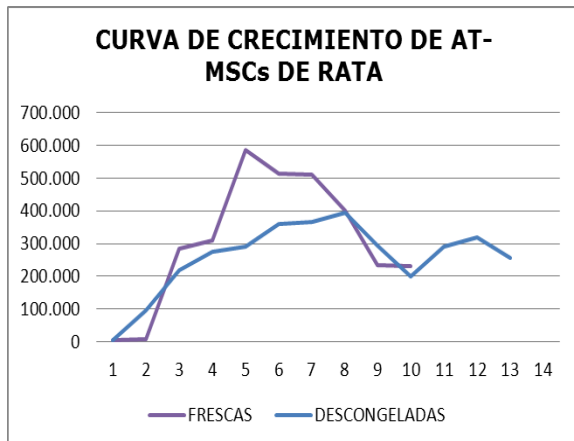
Obtuvimos resultados positivos tanto para las AT-MSCs como para las BM-MSCs de caballo, en células frescas y criopreservadas. Utilizamos una tinción con Azul Alcian para determinar la diferenciación condrogénica, tinción Oil Red-O para determinar la diferenciación adipogénica y mediante una tinción con Rojo Alizarin determinamos la diferenciación osteogénica.



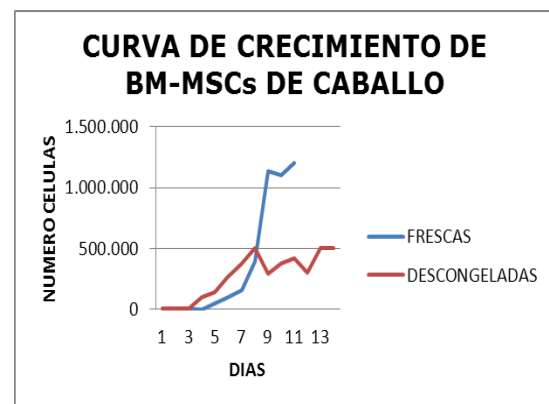
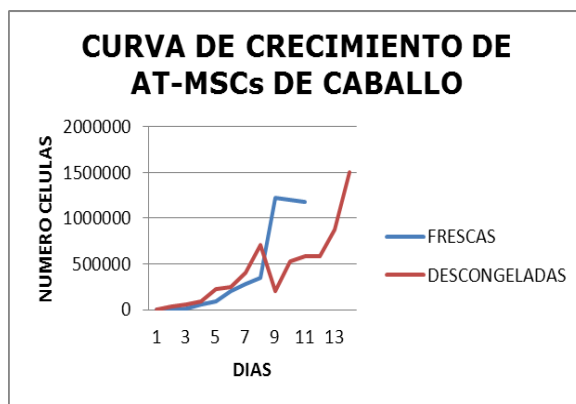
**Figura 23:** Estudio de la diferenciación condrogénica, adipogénica y osteogénica de las MSCs de caballo criopreservadas y frescas. **A-B:** Tinción Azul Alcian de AT-MSCs de caballo frescas y criopreservadas. **C-D:** Tinción Red Oil de AT-MSCs de caballo frescas y criopreservadas. **E-F:** Tinción Rojo Alizarín de AT-MSCs de caballo frescas y criopreservadas. **G-H:** Tinción Azul Alcian de BM-MSCs de caballo frescas y criopreservadas. **I-J:** Tinción Red Oil de BM-MSCs de caballo frescas y criopreservadas. **K-L:** Tinción Rojo Alizarín de BM-MSCs de caballo frescas y criopreservadas.

Estudiamos las curvas de crecimiento celular para ver cómo afecta la criopreservación a la proliferación de las mismas, y observamos que las células frescas en todos los tipos celulares presentan un patrón similar, proliferan más rápidamente que las criopreservadas y alcanzan antes el máximo nivel de proliferación, en rata el día 5 y en caballo el día 9; mientras que las criopreservadas, en rata alcanzan el pico de máxima multiplicación el día 8 y en caballo tienen un crecimiento menos uniforme con subidas y bajadas entre los días 9 y 13 y con un número bastante inferior de células que

sus homólogas frescas (Fig. 24).



**Figura 24:** Curvas de crecimiento celular de MSCs de rata y caballo frescas y criopreservadas. **A.** Curva de crecimiento de AT-MSCs de rata; **B.** Curva de crecimiento de AT-MSCs de caballo; **C.** Curva de crecimiento de BM-MSCs de caballo.



En el presente estudio, se demuestra que las MSCs de rata conservan su potencial condrogénico y los marcadores de superficie que las caracterizan, tras 12 semanas sometidas a criopreservación; y las de caballo conservan su multipotencialidad en los 3 linajes mesodérmicos elegidos en nuestro estudio.

## 4.- CULTIVO CELULAR SOBRE LOS BIOMATERIALES

### 4.1.- Evaluación de la morfología celular sobre los biomateriales

Para valorar la morfología de las MSCs una vez sembradas y su capacidad de adhesión al biomaterial, utilizamos la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) y pruebas de

inmunofluorescencia indirecta observadas por microscopía confocal y/o microscopio de fluorescencia.

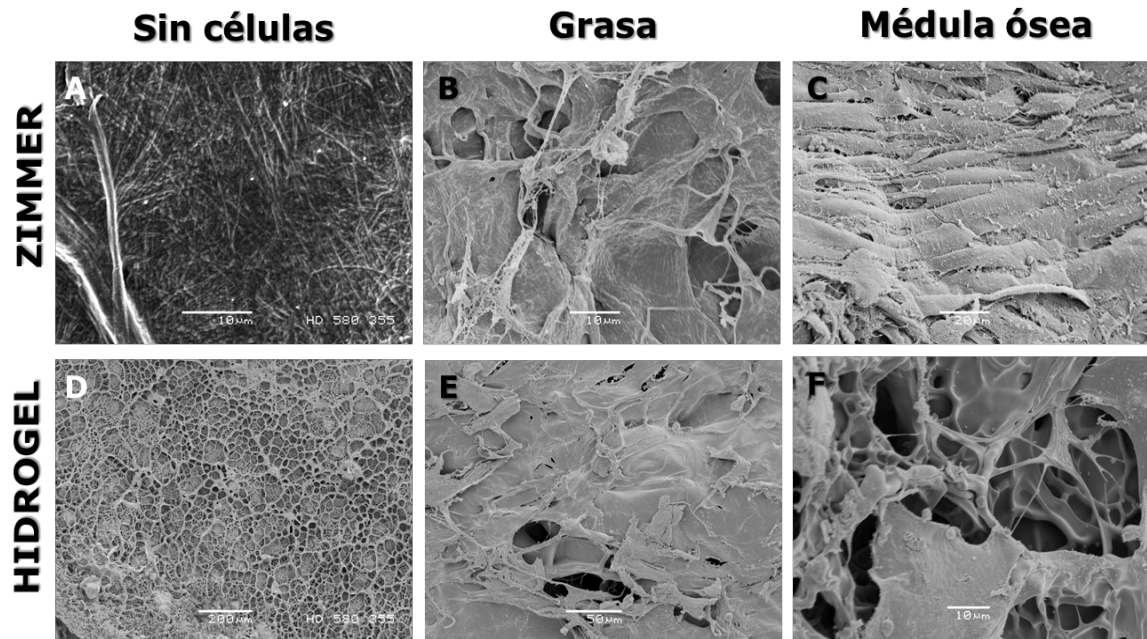
Cada biomaterial posee una estructura, porosidad y resistencia diferente en función de su composición, por ello es importante valorar la proliferación y distribución de las células sobre cada uno de ellos.

Se observó una distribución uniforme de las células sembradas, a lo largo de toda la superficie de los diversos materiales que valoramos mediante microscopía electrónica de barrido. En cuanto a la morfología, en todos ellos, las células adoptaban formas fibroblásticas características y proliferaban adecuadamente sobre los biomateriales estableciendo rápidamente contacto célula-célula.

Pasamos a detallar los resultados obtenidos en cada biomaterial:

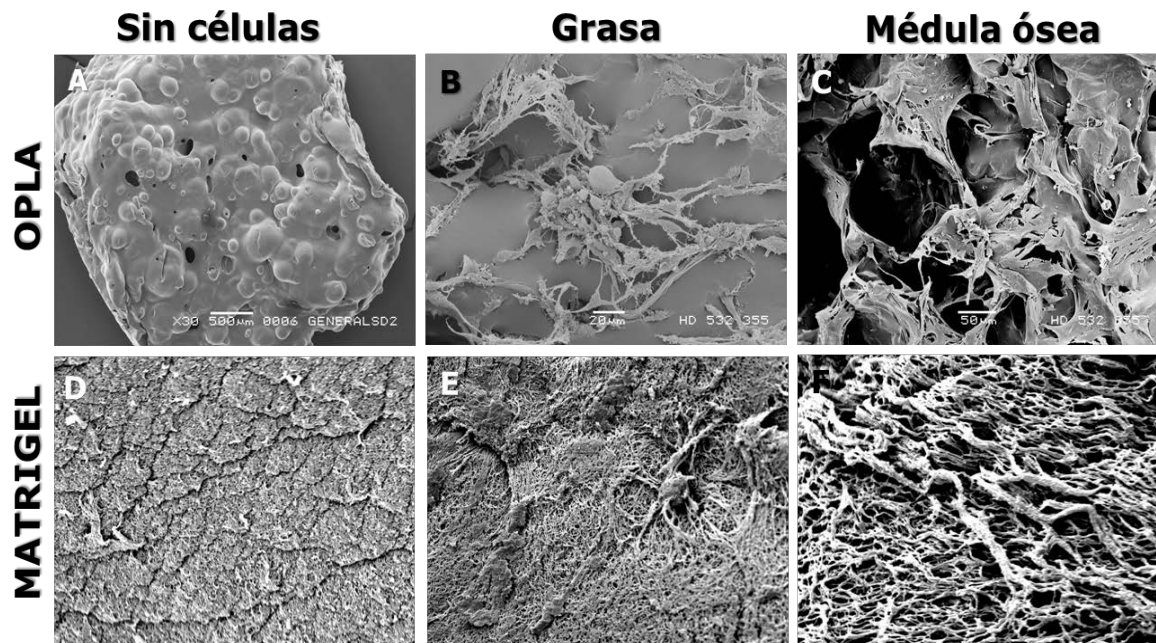
1. En el biomaterial Zimmer<sup>®</sup> se aprecia una distribución de fibras entrecruzadas entre las cuales se insertan las AT-MSCs y las BM-MSCs, las cuales crecen cubriendo toda la superficie del biomaterial (Fig 25B-C).
2. El Hidrogel posee una superficie similar a una red de entramado muy poroso por el que penetran las células distribuyéndose por toda la superficie (Fig. 25E-F).

En ambos casos las células tienen una morfología fibroblástica y su distribución es muy similar.



**Figura 25:** SEM de MSCs de caballo sembradas sobre hidrogel y Zimmer<sup>®</sup>. **A y D.** Superficie de los biomateriales de Zimmer<sup>®</sup> e Hidrogel sin células. En el Zimmer<sup>®</sup> se observan fibras entrecruzadas y en el hidrogel tenemos una disposición cavernosa del material. **B, C, E, F.** Distribución celular de las MSCs procedentes de médula ósea y de tejido adiposo sobre los dos biomateriales.

- 3 El OPLA<sup>®</sup> tiene una superficie lisa y abullonada donde las AT-MSCs y las BM.MSCs crecen agrupándose en pequeños acúmulos (Fig. 26A, B y C).
- 4 El Matrigel<sup>®</sup> es un biomaterial viscoso gelatinoso, no sólido como los anteriores, y que posee una superficie rugosa y quebradiza formando una red de fibras entrecruzadas similar al Zimmer<sup>®</sup> pero menos compacta. Las células crecen en su superficie y dentro del biomaterial de manera homogénea (Fig. 26D, E y F).



**Figura 26:** SEM sobre Matrigel<sup>®</sup> y OPLA<sup>®</sup> sembrados con MSCs de caballo. **A y D.** Superficie de los biomateriales de OPLA<sup>®</sup> y Matrigel<sup>®</sup> sin células. El OPLA<sup>®</sup> tiene un aspecto liso con pequeñas elevaciones redondeadas en su superficie, mientras que el Matrigel<sup>®</sup> es más rugoso y compacto. **B, C, E y F.** Distribución celular de las MSCs sobre los biomateriales.

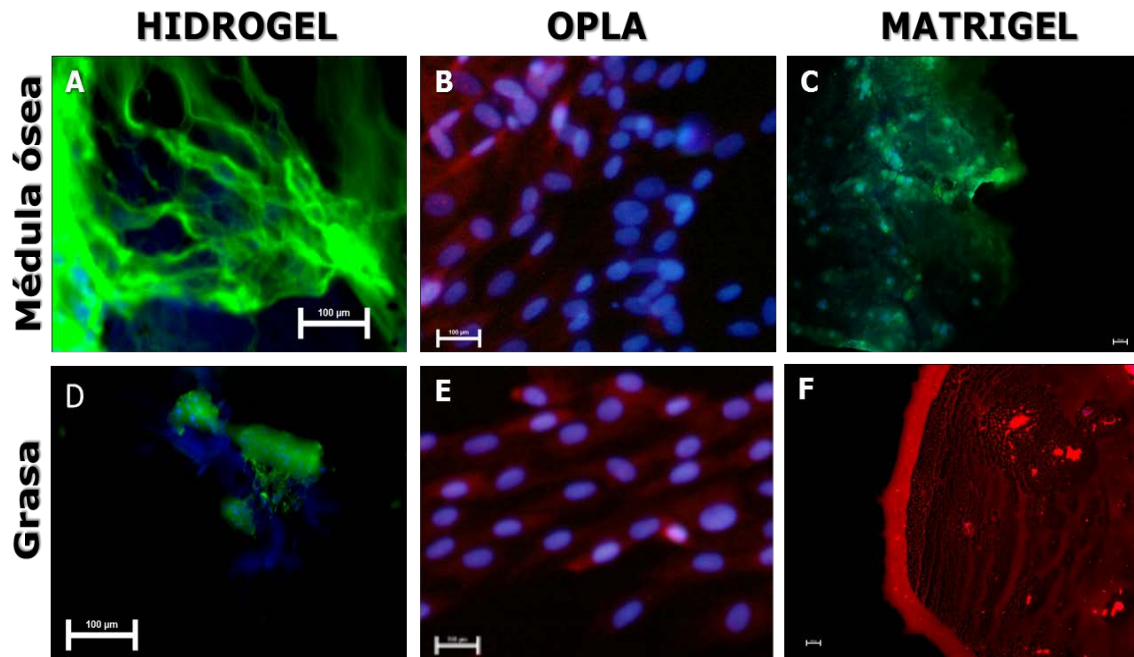
En los cuatro biomateriales probados, no observamos ninguna diferencia en el comportamiento y morfología de las MSCs procedentes de médula ósea o de tejido adiposo.

#### 4.2.- Evaluación de la distribución celular sobre los biomateriales

Además del microscopio electrónico de barrido donde podemos observar la distribución celular en la superficie de los biomateriales, realizamos pruebas de fluorescencia con Faloidina y Dapi para poder completar el estudio sobre la distribución de las células sobre estos soportes (Fig.27).

En el caso del biomaterial de Zimmer<sup>®</sup> se observó que el propio biomaterial es autofluorescente, lo que no nos permitía visualizar adecuadamente los contornos celulares sobre el mismo.

Se constató la presencia y distribución uniforme de las MSCs de caballo sobre la superficie de los biomateriales, observamos los núcleos celulares teñidos de azul y los citoplasmas en verde o rojo.

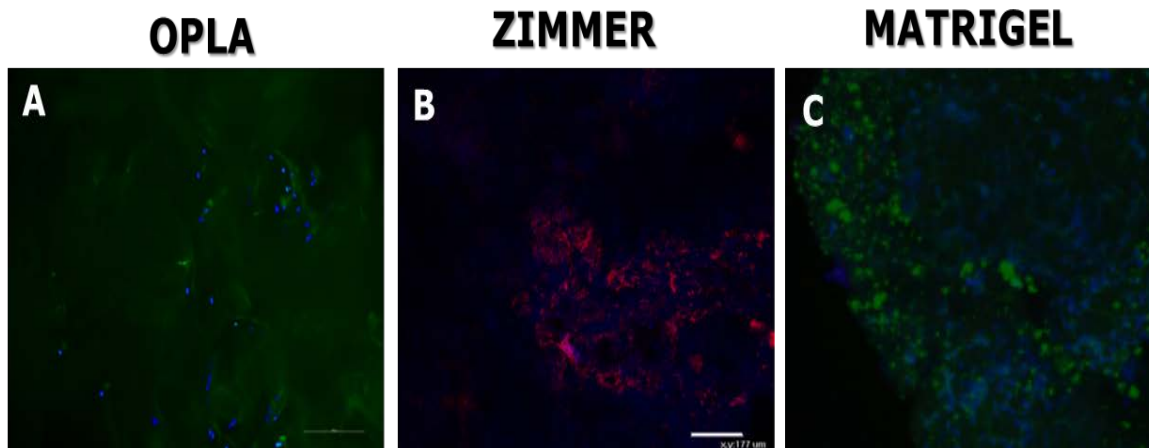


**Figura 27:** Distribución celular en los distintos biomateriales. Tinción del citoplasma con Faloidina y de los núcleos celulares con DAPI; **A y D.** Hidrogel, **B y E** OPLA<sup>®</sup>, **C y F** Matrigel<sup>®</sup>.

### 4.3.- Evaluación de la adhesión celular sobre los biomateriales

La microscopía confocal también nos permite realizar cortes a distintos niveles del biomaterial tridimensional y así poder observar la distribución de las células en profundidad.

Para valorar el grado de adhesión celular a los distintos biomateriales realizamos inmunofluorescencia indirecta con Fosfatasa de Adhesión Kinasa con la que se aprecian los puntos de adhesión celular del citoplasma en verde y en azul se tiñen los núcleos celulares (Fig.28). Se observa una gran adhesión celular en todos los biomateriales valorados.



**Figura 28:** Adhesión celular sobre diversos biomateriales. Microscopía confocal con FAK para BM-MSCs de caballo; **A.** OPLA<sup>®</sup>; **B.** Zimmer<sup>®</sup>; **C.** Matrigel<sup>®</sup>.

#### 4.4.- Evaluación de la proliferación celular sobre los biomateriales

Para cuantificar la proliferación celular sobre los biomateriales se utilizaron dos metodologías diferentes.

Realizamos la cuantificación del DNA total en la que previamente a la extracción con fenol-cloroformo, es necesario degradar o digerir por completo los biomateriales, para poder liberar las células.

En nuestro caso, nos encontramos con muchos problemas a la hora de degradar el hidrogel, ya que es un biomaterial diseñado de manera que una de sus principales características es la dureza. Utilizamos distintos protocolos y combinaciones enzimáticas para lograr su digestión pero fue prácticamente imposible degradarlo, por lo que pensamos en medios alternativos para determinar la proliferación celular, como el Alamar Blue<sup>®</sup>.

##### 4.4.1.- Extracción de DNA con fenol-cloroformo-isoamílico

Este método cuantifica la proliferación celular de forma indirecta, midiendo la cantidad de DNA extraído mediante el protocolo de

extracción con fenol cloroformo isoamílico descrito en el capítulo 9.1.2 de Materiales y Métodos.

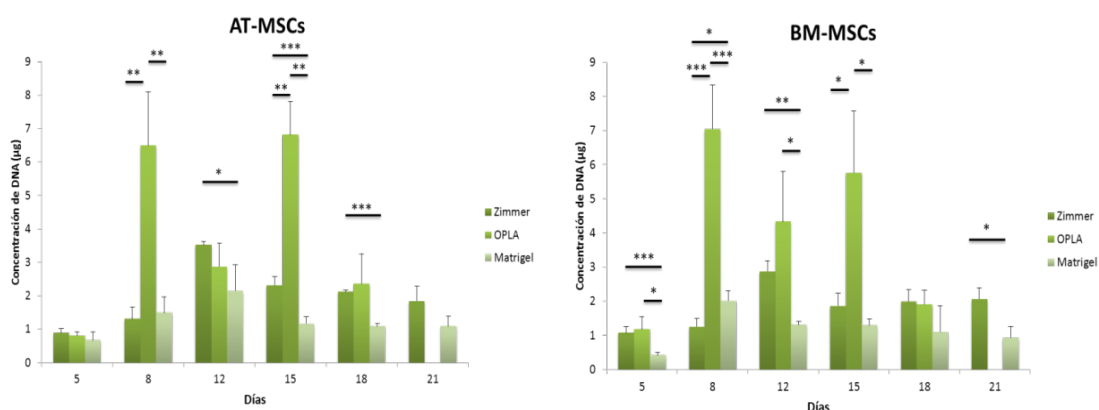
El Hidrogel no se ha podido degradar con ninguna de las soluciones enzimáticas, ni con el politrón, por lo que no se ha podido llevar a cabo la cuantificación de DNA. El resto de biomateriales siguen una curva de crecimiento estándar y similar tanto en las AT-MSCs como en las BM-MSCs .

El biomaterial con mayor proliferación es el Zimmer<sup>®</sup>, donde las células alcanzan su máximo crecimiento a los 12 días de la siembra.

El Matrigel<sup>®</sup> es el biomaterial con menor proliferación, en las BM-MSCs alcanzan su máximo a los 8 días de la siembra y en las AT-MSCs a los 12 días.

El OPLA<sup>®</sup> no sigue una curva de crecimiento estándar en el mismo período que el resto de biomateriales ya que alcanza su máximo de proliferación a los 18 días en cultivo.

Todos estos resultados se recogen en la Figura 29.



**Figura 29:** Cuantificación de la proliferación celular con extracción de DNA con fenol-cloroformo; **A.** AT-MSCs; **B.** BM-MSCs. En las gráficas podemos observar cómo, salvo en el caso del OPLA<sup>®</sup>, tanto las MSC de médula ósea como las de grasa se comportan de forma muy similar en los diferentes tipos de biomateriales. La mayor proliferación celular se consigue con el biomaterial de Zimmer<sup>®</sup>. \*La diferencia entre los grupos fue significativa ( $p \leq 0.05$ ). \*\* La diferencia entre los grupos fue significativa ( $p \leq 0.01$ ). \*\*\* La diferencia entre los grupos fue significativa ( $p \leq 0.005$ ).



#### 4.4.2.- Cuantificación del DNA mediante Alamar Blue®

Esta técnica cuantifica la proliferación celular analizando la variación colorimétrica que se produce en el medio de cultivo al añadir Alamar Blue®, la variación de color se mide a una longitud de onda de 570 nm.

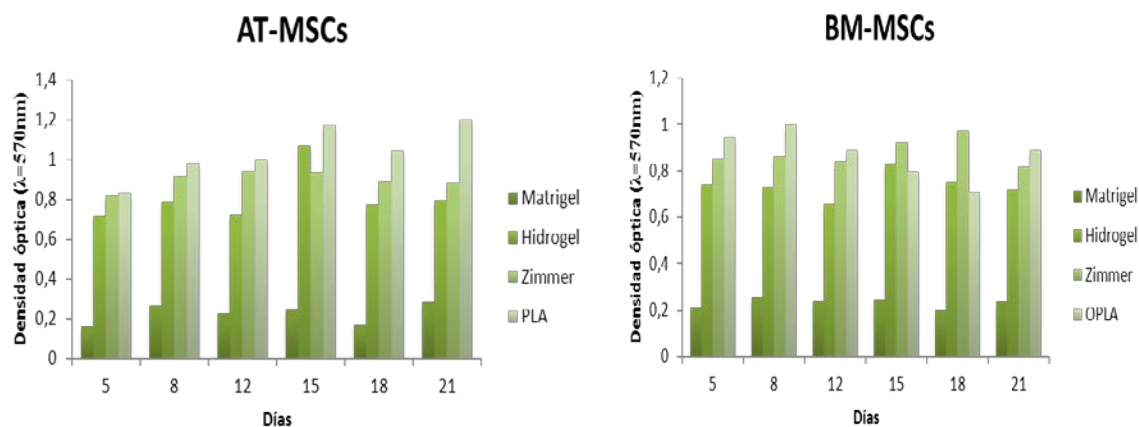
A 570 nm se observa que siguen una curva de crecimiento estándar pero más tenue y menos definida que con la cuantificación con fenol-cloroformo (Fig. 30).

Las células cultivadas sobre Hidrogel siguen una curva de crecimiento estándar con un máximo de proliferación a los 15 días de la siembra en los dos tipos celulares a estudio.

En el Matrigel® prácticamente se mantienen constantes y con una baja densidad óptica en AT-MSCs y en BM-MSCs.

Las AT-MSCs sembradas sobre OPLA®, sí dan lugar a una curva de crecimiento estándar, con su máximo de proliferación a los 15 días de la siembra para grasa, mientras que las BM-MSCs lo adquieren a los 8 días.

Los resultados recogidos de las células cultivadas sobre el Zimmer® siguen una curva de proliferación estándar poco definida, ya que los valores son muy homogéneos y similares en los 2 tipos de MSCs, pero con una elevada proliferación celular.



**Figura 30:** Cuantificación de la proliferación celular con Alamar Blue<sup>®</sup>. **A.** AT-MSCs sobre OPLA<sup>®</sup>, Matrigel<sup>®</sup>, Hidrogel y Zimmer<sup>®</sup>. **B.** BM-MSCs sobre OPLA<sup>®</sup>, Matrigel<sup>®</sup>, Hidrogel y Zimmer<sup>®</sup>.

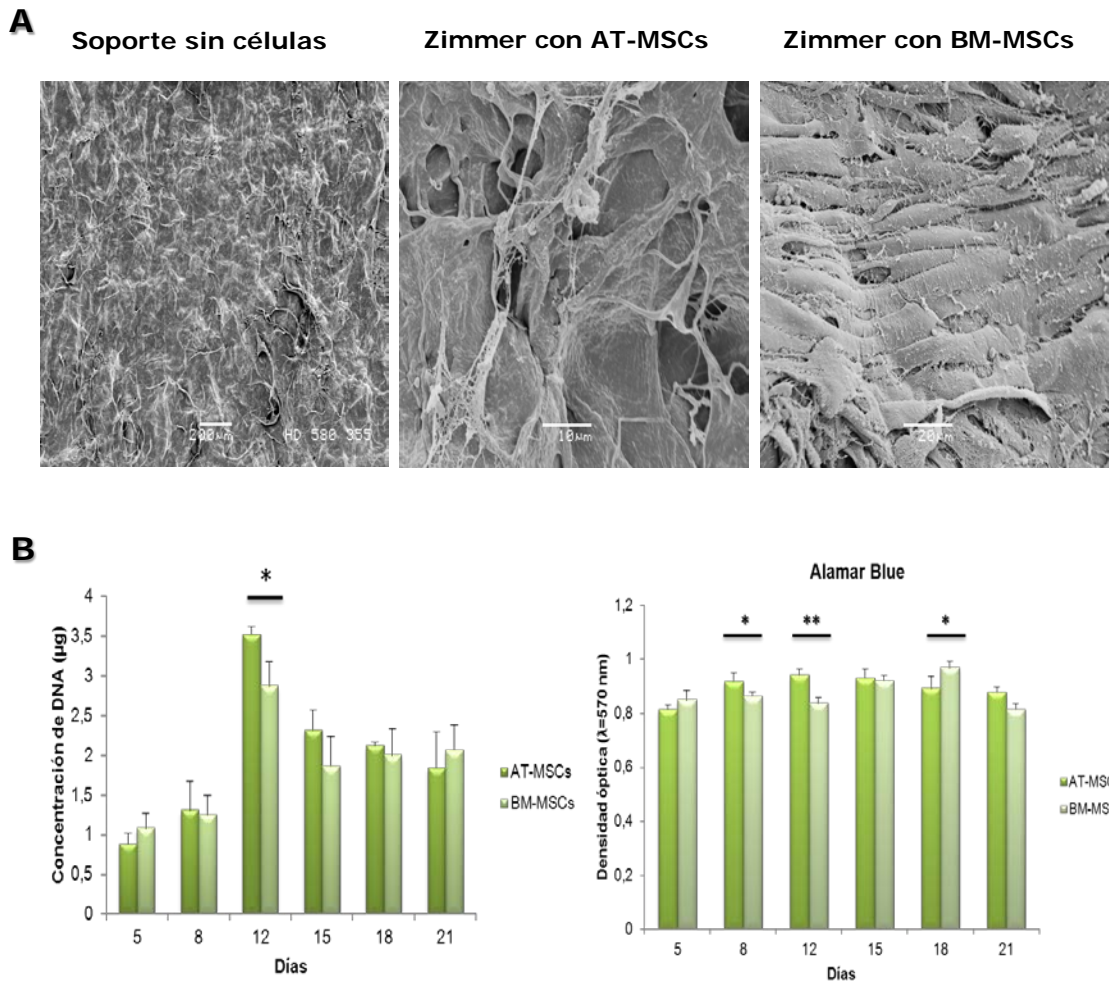
## 5.- VALORACIÓN DEL EFECTO REGENERADOR DE LAS MSCs DE CABALLO SOBRE MOLDES TRIDIMENSIONALES EN UN ESTUDIO *IN VIVO*

### 5.1.- Cuantificación del DNA mediante Alamar Blue<sup>®</sup>

Como hemos visto anteriormente que la proliferación celular sobre el biomaterial Zimmer<sup>®</sup> fue evaluada con resultados muy positivos, lo hemos elegido como el biomaterial de soporte celular para nuestro estudio de implantación *in vivo*.

Tras un cultivo estático durante 21 días de las AT-MSCs y las BM-MSCs sobre el biomaterial, se determinó la densidad celular en distintos días (5, 8, 12, 15, 18, y 21 días). El rango más alto se alcanzó en el día 12, para posteriormente decrecer en densidad hasta el día 21.

La proliferación observada fue muy similar en las AT-MSCs y en las BM-MSCs, salvo en el día 12, que el contenido total de DNA fue superior en los cultivos de AT-MSCs. No se apreciaron diferencias significativas en ambas líneas celulares entre los días 5 y 21 (Fig.31).



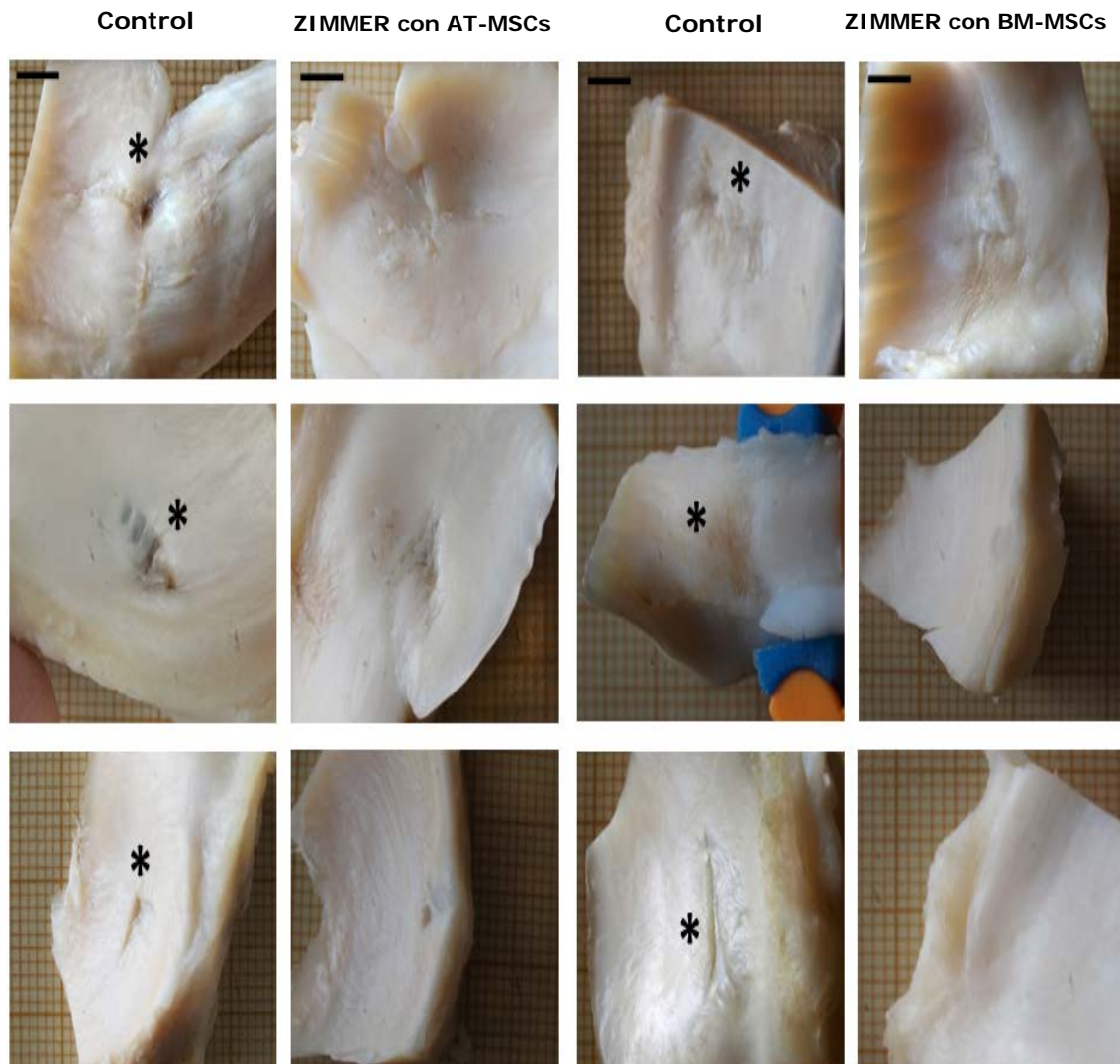
**Figura 31: A.** SEM. Biomaterial de Zimmer® sembrado con MSCs de caballo. Soporte vacío (izda.), AT-MSCs (medio) y BM-MSCs (dcha.). **B.** Evaluación de la proliferación celular de AT-MSCs y BM-MSCs sobre soportes Zimmer® determinando el contenido total de DNA mediante el método Alamar Blue®. \*La diferencia entre los grupos fue significativa ( $p \leq 0.05$ ). \*\* La diferencia entre los grupos fue significativa ( $p \leq 0.01$ ).

## 5.2.-Implantación local de MSCs como promotoras de la regeneración de menisco

Los defectos articulares fueron realizados en la parte craneal del menisco medial de ambas rodillas, y posteriormente fueron rellenados con un biomaterial de Zimmer® sembrado con las MSCs o los dejamos sin tratamiento en las rodillas que consideramos control.

Una fotografía representativa muestra los hallazgos macroscópicos de los meniscos a los 12 meses tras la implantación de las MSCs *in vivo* como se muestra en la figura 32. En dicha figura se

observa, macroscópicamente, que tanto las AT-MSCs como las BM-MSCs promueven la regeneración de menisco.



**Figura 32:** Morfología macroscópica de los meniscos. Hallazgos tras 12 meses de la implantación de las MSCs. En los meniscos control podemos observar que el defecto permanece con un gran tamaño (asterisco), mientras que en los que se implantó el soporte con MSCs hay mayor regeneración. Escala 1cm.

En los meniscos utilizados como control, es decir sin tratamiento, se observa un defecto de gran profundidad, que permanece prácticamente intacto en todos los animales pasados 12 meses de la intervención; en algunos casos se ve parcialmente reparado por tejido fibroso.

En los meniscos tratados con un molde sembrado de MSCs, observamos que no se notan diferencias macroscópicas entre los

casos sembrados con AT-MSCs y los sembrados con BM-MSCs, todos los defectos aparecen completamente o parcialmente cubiertos en todo su espesor.

El estudio histológico posterior confirma que los defectos control no han sido reparados o lo han sido parcialmente pero con tejido fibroso.

Las secciones de los meniscos regenerados con las MSCs, así como las secciones utilizados como control, fueron teñidas con Safranina O/ Fast Green, pasados 12 meses de su implantación, como muestra la figura 33. La serie de secciones teñidas con Safranina O detecta la localización de los proteoglicanos presentes en el tejido cartilaginoso. Gracias a ello, se observa una mayor cantidad de proteoglicanos en los defectos tratados con las MSCs que en los defectos control que no mostraron presencia alguna de Safranina O (Fig.33 A-1, A-2, A-3 y C-1 C-2, C3).

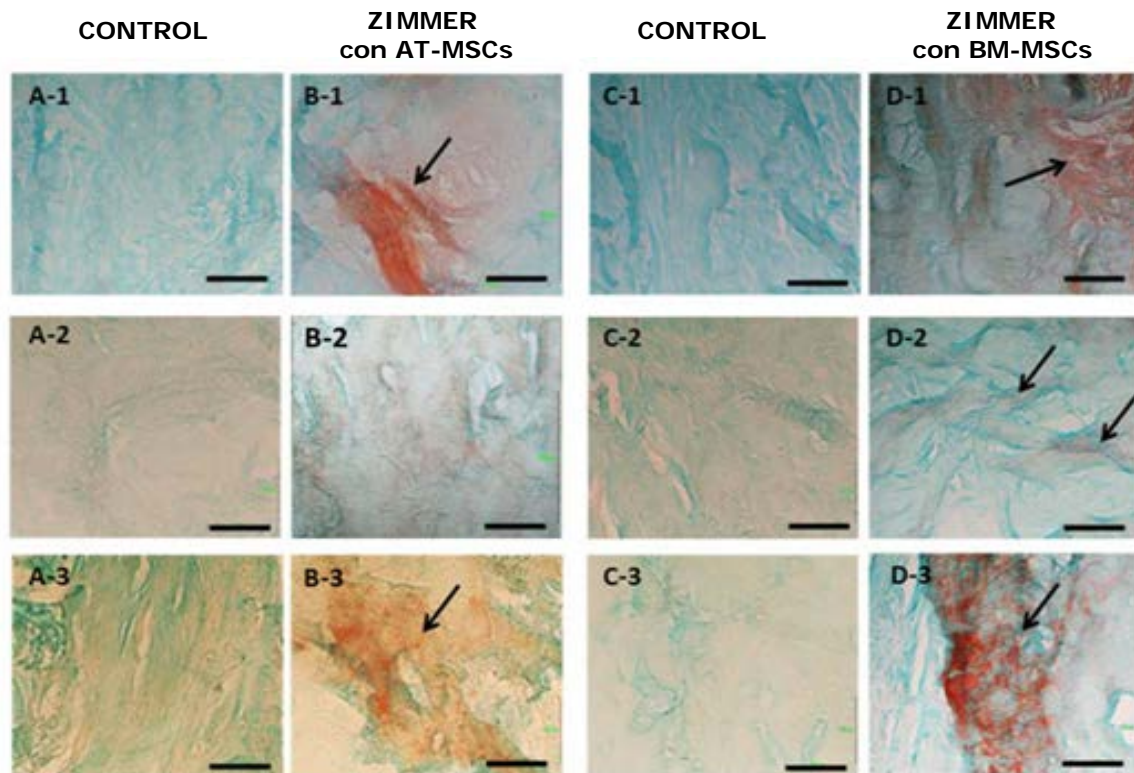
Por otro lado, en la región correspondiente a los defectos tratados [(Fig. 33 B1, B-3, D-1, D-2, D3 (flechas)] se sugiere el desarrollo de un tejido de reparación de naturaleza cartilaginosa. En la fig. 33 B-2 se observa una estructura de fibras de colágeno, pero sin síntesis de proteoglicanos.

Se aprecia una intensidad notable en la tinción con Safranina O, en los defectos reparados con AT-MSCs y BM-MSCs, sin que haya diferencias significativas entre ambas.

Tras los 12 meses del transplante los controles aparecen en verde sin proteoglicanos específicos, mientras que en el caso de los defectos tratados con AT-MSCs y BM-MSCs, aparecen grandes áreas teñidas de rojo que muestran la abundante presencia de depósitos de proteoglicanos en las mismas (fig. 33 flechas).

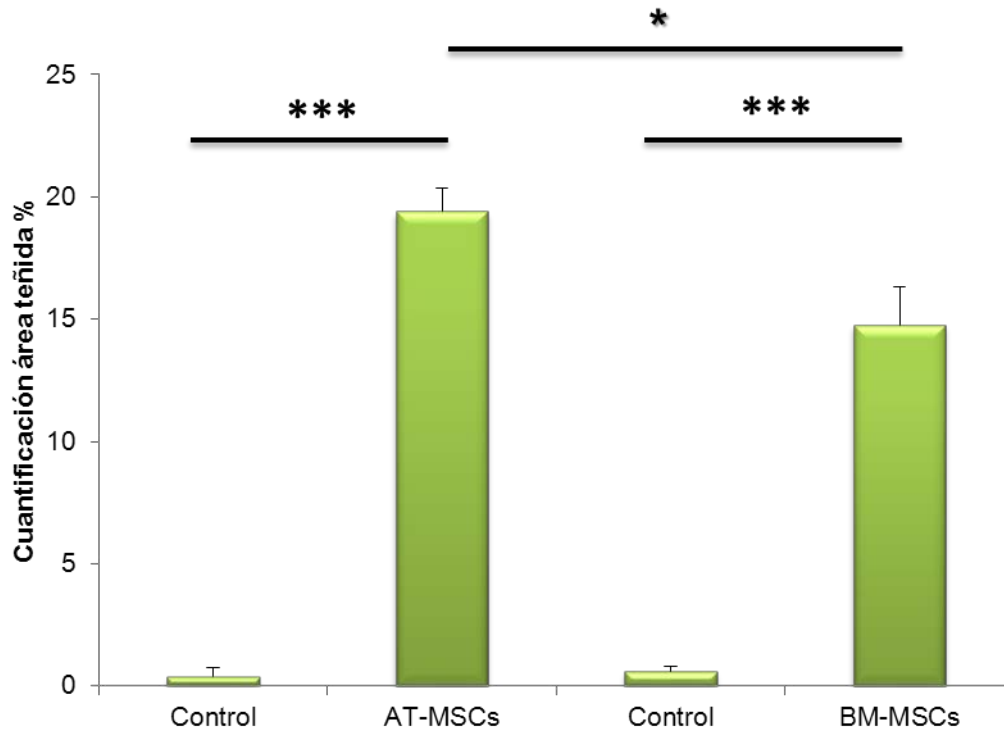
Por otro lado, las fibras de colágeno se mostraban más estructuradas en los defectos tratados con las MSCs que en los

defectos control, en los que se observa una estructura homogénea pero sin fibras identificables, salvo en A-3 y C-1.



**Figura 33:** Análisis histológico de las áreas intervenidas. Los defectos control son los denominados como **A y C**; mientras que los tratados con MSCs son los denominados **B**. AT-MSCs y **D**. BM-MSCs. Las secciones teñidas con Safranina O/Fast Green muestran un fondo verde y los proteoglicanos teñidos en rojo (flechas). Escala 100  $\mu$ m.

En los defectos meniscales reparados tanto con AT-MSCs como con BM-MSCs se puso de manifiesto una tinción intensa con Safranina-O. La cantidad de tejido meniscal regenerado (Fig. 34) fue mayor en los defectos reparados con AT-MSCs ( $p < 0.05$ ). Los biomateriales con MSCs mostraron niveles de regeneración significativamente más altos que los grupos control ( $p < 0.005$ ).



**Figura 34:** Gráfica de la cuantificación de la tinción con Safranina O de los proteoglicanos en cada sección de menisco. \* La diferencia entre los grupos fue significativa ( $p \leq 0.05$ ). \*\*\* La diferencia entre los grupos fue significativa ( $p \leq 0.005$ ).

# DISCUSIÓN

---





La ausencia de tratamientos eficaces para corregir defectos condrales y enfermedades articulares hace necesario buscar posibles soluciones dentro de la ingeniería de tejidos y de la terapia celular.

Uno de los principales retos de la ingeniería de tejidos es encontrar una fuente celular ideal para conseguir la regeneración tisular. Estas células deben cumplir una serie de requisitos como el poder ser aisladas, expandidas y cultivadas fácilmente.

Los condrocitos venían siendo la opción más sencilla para su uso en la regeneración del cartílago, ya que se encuentran en el tejido nativo y se han estudiado ampliamente, con el fin de descubrir su papel en producir, mantener y remodelar la matriz extracelular cartilaginosa. Sin embargo, son células adultas que presentan el problema de tener una escasa proliferación y que cuando se cultivan sobre superficies plásticas, se desdiferencian en células de tipo fibroblástico.

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 sin perder su potencial de diferenciación y ser modificadas genéticamente para inducir y mejorar la condrogénesis<sup>224</sup>.

Aunque el progreso en su utilidad en ingeniería de tejidos, se ha visto limitado por la dificultad para ejercer el control sobre su diferenciación. La proliferación de estas células, es una de sus características más apreciadas<sup>225</sup>.

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<sup>226</sup>.

Las células troncales derivadas del tejido adiposo ofrecen una alternativa prometedora, siendo una fuente abundante y asequible de células troncales<sup>85</sup>.

En este trabajo se obtuvieron y cultivaron células troncales derivadas del tejido adiposo subcutáneo de la región abdominal e inguinal de la rata; y de tejido adiposo subcutáneo de la región glútea del caballo y de médula ósea de caballo. A continuación se evaluaron y caracterizaron las células obtenidas y se comprobó su capacidad de diferenciación.

### **1.1.- OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MSCs**

La primera especie escogida para la realización de este trabajo científico, por ser uno de los animales más probados en la reparación experimental del cartílago, fue *Rattus norvegicus*. Esta especie tiene una amplia gama de marcadores comerciales disponibles y un rápido ciclo biológico, que permite con facilidad una evaluación de los resultados *in vivo* en futuros trabajos<sup>227</sup>.

En segundo lugar, escogimos el caballo (*Equus ferus caballus*) como segunda especie animal para nuestro trabajo, ya que por las similitudes existentes entre las enfermedades articulares, en concreto, la articulación fémoro-tibio-patelar, de los caballos presenta un elevado grado de similitud con la misma articulación humana, por lo que los resultados obtenidos en este modelo animal pueden ser directamente aplicables a la patología humana<sup>228</sup>; estos estudios de investigación básica facilitarán el desarrollo e implantación de nuevas estrategias terapéuticas, basadas en la utilización de células troncales.

En cuanto al lugar de recogida de tejido, escogimos la grasa subcutánea abdominal e inguinal en rata y de la región glútea en el caballo, por ser una fuente de fácil acceso y con mínima morbilidad

para el animal. Además Kern *et al.*<sup>114</sup> compararon las células troncales del cordón umbilical, tejido adiposo y médula ósea y observaron que el tejido adiposo era el que mayor cantidad de células troncales proporcionaba.

Para *Rattus norvegicus* se ha descrito la biopsia de tejido adiposo en la grasa visceral<sup>229</sup>, grasa perirrenal<sup>227</sup>, epididimal<sup>230,231</sup> y subcutánea<sup>232</sup>. Hemos observado que la grasa intraabdominal daba peores resultados en cuanto a la obtención de células viables capaces de adherirse a un sustrato plástico.

Existen en la bibliografía varios métodos para la obtención de tejido adiposo, como son la resección por biopsia<sup>232,233</sup>; lipoaspiración por ultrasonidos y lipoaspiración tumescente<sup>234</sup>. Nosotros empleamos el método de resección por biopsia, porque Oedayrajsingh-Varma *et al.*<sup>235</sup> demostraron que las células obtenidas por este método tienen una mayor viabilidad, frecuencia y capacidad de replicación.

Para el aislamiento celular usamos con éxito el método de digestión enzimática, descrito por Robdell en 1964<sup>236</sup>, para la separación por centrifugación diferencial *in vitro* de adipocitos maduros y sus progenitores a partir de grasa subcutánea. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación diferencial, contenía adipocitos maduros, mientras que el pellet celular resultante contenía componentes de un color rojizo, la FEV.

Observamos que la FEV obtenida en cultivo, consiste en una población heterogénea constituida por dos grandes grupos celulares, el de las células más pequeñas y no nucleadas y el de células nucleadas, resultados que coinciden con trabajos previos<sup>237</sup>. Las células no nucleadas son eritrocitos, no se pegan a la superficie plástica y por tanto, tras los lavados realizados en los diferentes pases desaparecen. El otro grupo, el de células nucleadas<sup>237</sup>, es de mayor tamaño y está constituido por una población heterogénea de

células adherentes que incluye preadipocitos, fibroblastos, células del músculo liso, pericitos, eritrocitos y células endoteliales<sup>238</sup>.

Las AT-MSCs 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 un mayor número de prolongaciones. Al subcultivar las células, se produce progresivamente una homogenización del cultivo<sup>239</sup>.

Las MSCs de médula ósea, fueron obtenidas del esternón de caballo, posteriormente aisladas mediante el método de gradiente de densidad Ficoll y se observó que al sembrarlas sobre una superficie plástica, mostraban características morfológicas elongadas. Estas células presentaban procesos celulares característicos que conducían a la formación de agregados de apariencia hexagonal estableciendo contactos estrechos con las células vecinas<sup>125</sup>.

## **1.2.- EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs**

En el tejido adiposo obtenido de las ratas con este método y lugar de recogida utilizado, hemos conseguido obtener cantidades bastante aceptables de grasa, cerca de 2,95 +/- 1,7 g 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. Nosotros observamos que de los animales de más peso y con mayor contenido en grasa obteníamos menor número de células troncales (resultados no mostrados).

La proliferación de estas células, es una de sus características más apreciadas, habiéndose demostrado que es superior a las células troncales de médula ósea<sup>225</sup>. También se ha demostrado que las AT-MSCs de la grasa subcutánea tienen mayor capacidad proliferativa que la grasa omental de los mismos individuos. Aunque no se observaron diferencias significativas en la capacidad de diferenciación entre el tejido adiposo de las dos localizaciones<sup>240</sup>.

La proliferación de las AT-MSCs y de las BM-MSCs tanto de rata como de caballo quedó demostrada con las curvas de crecimiento; las MSCs de rata crecen más rápidamente, son de mayor tamaño y menos elongadas que las de caballo.

Antes de que estas células puedan ser utilizadas rutinariamente en terapia celular, es necesario describir parámetros que las definan e identifiquen como una población celular uniforme de MSCs<sup>234</sup>.

El Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee for the International Society for Cellular Therapy define las Multipotent Mesenchymal Stromal Cells (MSC)<sup>241</sup> como las células adherentes al plástico, en condiciones de cultivo estándar, aisladas de medula ósea y otros tejidos que normalmente se denominaban mesenchymal stem cells. En segundo lugar, es necesaria la caracterización de células a través de marcadores de superficie celular específicos de células troncales. Por lo que deben expresar los marcadores CD73, CD90 y CD105, en un porcentaje igual o superior al 95% de la población celular, medido mediante citometría de flujo y presentar un porcentaje inferior al 2% para los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a y HLA clase II. Y en tercer lugar, deben tener el potencial para poderse diferenciar a adipocitos, condrocitos y osteocitos *in vitro*<sup>242</sup>.

Encontramos similitudes tanto en el fenotipo como en la capacidad de diferenciación en diferentes linajes mesodérmicos como fueron los tejidos cartilaginoso, óseo y adiposo. Observamos que, tanto las AT-MSCs como las BM-MSCs, fueron positivas por encima del 95% a los marcadores de superficie celular CD105 y CD90 medidas mediante citometría de flujo, mientras que para el CD73 no excedió el 10%. Mientras que los resultados obtenidos con microscopía confocal, fueron intensamente positivos para todos los marcadores de superficie celular. El bajo porcentaje obtenido en el

caso del CD73, puede ser debido a la falta de especificidad del anticuerpo para el caballo.

Los resultados en rata también fueron positivos para los marcadores CD29, CD73 y CD90, tanto por citometría de flujo, como por microscopía confocal, son coincidentes con los resultados previos, obtenidos en otros estudios con este tipo celular en humanos<sup>237,243</sup>.

Para completar la caracterización de nuestras células como MSCs llevamos a cabo pruebas de multipotencia que se traducen en llevar a cabo la diferenciación celular *in vitro* en tres linajes mesodérmicos: tejido cartilaginoso, óseo y adiposo<sup>89</sup>. Las células con las que se realizó el estudio sufrieron cambios estructurales y metabólicos cuando se sometían a las distintas diferenciaciones celulares. Esto quedó manifiesto tras las tinciones histológicas y ensayos de inmunofluorescencia.

Esta capacidad de diferenciación es importante para las aplicaciones terapéuticas de las MSCs en lesiones del sistema músculo-esquelético, incluyendo osteoartritis y tendinopatías, que son las patologías más frecuentes.

Las MSCs de ambas especies, en presencia del medio osteogénico descrito, presentaron un cambio morfológico evidente en microscopía óptica, pasaron de su morfología típica de apariencia fibroblástica a un tipo celular más redondeado. Fisiológicamente también mostraron cambios, su capacidad de proliferación se vio reducida y comenzaron a generar matriz extracelular rica en calcio, hecho que queda evidenciado mediante el uso de la tinción con solución Red Alizarin S que, siendo específica para este compuesto, da a los cultivos diferenciados un aspecto rojo-anaranjado, también se utilizó la tinción de von Kossa que confirmó los resultados. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por otros autores<sup>244-246</sup>.

Observamos que las AT-MSCs obtenidas de rata y caballo y las BM-MSCs de caballo, son capaces, en cultivo y en presencia de mediadores solubles específicos (TGF- $\beta$ 1, Ascorbato, ITS), de expresar proteínas de la matriz cartilaginosa. En nuestros cultivos, obtuvimos la formación de nódulos a partir de los 3 a 4 días en cultivo, alcanzando la producción máxima de matriz extracelular alrededor de los 14 días lo que se evidenció con una tinción de Azul Alcian. También se demostró mediante microscopía confocal la presencia de colágeno tipo II en rata y de agregano en caballo, como indicadores de presencia de matriz extracelular. Estos resultados, conjuntamente con estudios previos, sustentan el potencial condrogénico de estas células<sup>229,237,247</sup>.

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<sup>248</sup>.

Tras cultivar las MSCs en un medio de diferenciación adipogénica durante 14 días, utilizando una tinción de Oil Red se ponen de manifiesto los depósitos lipídicos teñidos de rojo y con numerosas vacuolas grasas intracelulares.

En cuanto a la expresión de marcadores de superficie celular específicos de células troncales (CD29, CD73, CD90 y CD105), y multipotencialidad a las tres líneas adipogénica, condrogénica y osteogénica, no hemos observado ninguna diferencia entre las MSCs procedentes de tejido adiposo y médula ósea. Estos resultados son coincidentes con los observados por Ahern *et al.*<sup>245</sup>. Siendo los tres tipos celulares utilizados positivos para las pruebas de diferenciación y para los marcadores específicos, concluimos que partimos de un cultivo primario aislado de MSCs con las que se continuará el experimento.



Una de las mayores dificultades que nos hemos encontrado a la hora de caracterizar las MSCs en medicina veterinaria, es la falta de anticuerpos monoclonales específicos de especie, y la falta de reacciones cruzadas de ciertos marcadores, en especial, con la especie equina<sup>249</sup>.

Existen pocos estudios de los efectos que pueden tener los sucesivos pases en las características de multipotencia de esta población celular, además, existen evidencias que sugieren que pueden ser una fuente de células mutantes que dan origen a tumores<sup>250</sup>. Se ha constatado la posibilidad de transformación tumoral de estas células, a lo largo de los pases<sup>251</sup>.

Para intentar evitar los problemas mencionados anteriormente, se han sugerido muchas alternativas, concretamente la utilización de células en los primeros pases (máximo hasta el cuarto pase) y utilizar los protocolos de diferenciación que eviten este tipo de problemas<sup>252</sup>.

En conclusión, nuestros datos indican que las células obtenidas y aisladas de tejido adiposo y de médula ósea de caballo pueden ser caracterizadas como MSCs. No hemos observado diferencias significativas en la capacidad de diferenciación de ambos tipos celulares. Aunque para obtener resultados más precisos sería necesario cuantificar, mediante PCR, la expresión de distintos marcadores de diferenciación

Por lo tanto, la comprensión del potencial funcional de las células y los mecanismos de señalización celular que regulan su diferenciación podrían conducir a la creación de protocolos innovadores en las intervenciones ortopédicas y en la terapia celular para la reparación de cartílago. Y por todo ello, hemos optado por utilizar el tejido adiposo y el de médula ósea como fuentes de MSCs para realizar nuestros estudios.

## 2.- OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE MSCs

Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue optimizar un protocolo de criopreservación para las MSCs. Entre la cantidad de parámetros relacionados con la criopreservación celular, los agentes crioprotectores son de los factores que más pueden afectar al ratio de supervivencia de las células congeladas tras su descongelación<sup>253-256</sup>. Los medios de congelación que hemos utilizado en este estudio contienen un 80% de SFB, el cual contribuye a la prevención de la pérdida de viabilidad de las MSCs durante el proceso de congelación-descongelación.

Las células troncales han sido criopreservadas en sucesivos estudios utilizando diferentes agentes crioprotectores<sup>154,184,257</sup>.

Los tres estudios de Thirumala *et al.*<sup>257,258</sup>, sobre las AT-MSCs humanas se centraron en los efectos físicos de la congelación sobre la integridad de la membrana celular; otro estudio centrado en la criopreservación de las AT-MSCs<sup>259,260</sup> demuestra que los lipoaspirados pueden ser utilizados como fuente de células troncales en humana tras la criopreservación.

Halvorsen *et al.*<sup>138</sup>, aseveran que las AT-MSCs humanas bajo condiciones de mineralización, muestran una elevada actividad de la fosfatasa alcalina, mayor que las células criopreservadas en medios básicos.

Goh *et al.* y Liu *et al.*<sup>154,173</sup>, descubrieron que la criopreservación no tiene efectos negativos sobre el crecimiento y la morfología de las AT-MSCs. Nosotros detectamos una menor proliferación de las MSCs en general, observada en las curvas de crecimiento, siendo más afectadas por la criopreservación las BM-MSCs de caballo que las AT-MSCs tanto de rata como de caballo, que resultaron más resistentes al proceso.

Los efectos de la criopreservación han sido investigados utilizando diferentes tipos celulares<sup>261,262</sup>. Éstos y nuestros resultados, indican que el proceso de congelación–descongelación y el almacenaje de larga duración en nitrógeno líquido no provocan cambios críticos en las MSCs; aunque puede ser la causa de ciertos daños en la estructura y funcionalidad de las proteínas celulares reduciendo ligeramente su viabilidad y provocando cambios inmunofenotípicos leves en las células.

Bigdeli *et al.*<sup>263</sup>, llevaron a cabo experimentos de criopreservación en cocultivos de condrocitos articulares y de células troncales embrionarias humanas, y observaron que existían diferencias en cuanto al fenotipo pero la diferenciación condrogénica mejoraba. Otros autores<sup>145,154,264</sup> también demostraron que no había diferencias de capacidad de diferenciación entre células criopreservadas y frescas. En referencia a la diferenciación condrogénica, sólo se encontraron referencias de Mambelli *et al.*<sup>146</sup>, Berg *et al.*<sup>147</sup> y Martinello *et al.*<sup>265</sup>. Los cuales utilizaban otras fuentes de células troncales como médula ósea y sangre de cordón umbilical de equinos.

Cuando hemos utilizado un medio de criopreservación con un 10% de SFB, la viabilidad celular estaba por debajo del 50%, pero<sup>266-268</sup> este resultado no estaba de acuerdo con los obtenidos por Thirumala *et al.*, (2005) y Heng *et al.*, (2006)<sup>177,186,269</sup> que obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad (aprox. 80%).

El principal problema que se plantea en la criopreservación es la pérdida de la capacidad de diferenciación tras la descongelación. En nuestro caso con un medio de criopreservación compuesto por un 80% SFB, 10% DMEM, 10% DMSO, conseguimos que este potencial no se altere como demostramos tanto en rata como en caballo; en concreto, en cuanto a la diferenciación condrogénica, observamos la

formación de nódulos de cartílago a los 4 días de cultivo en medio de diferenciación.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Gonda *et al.*<sup>270</sup>, en los que se usan lipoaspirados humanos, para valorar tanto la viabilidad como el potencial condrogénico de estas células, aunque sus investigaciones se basan en un medio de criopreservación no definido (Cell-Banker 1), y un programa de congelación concreto. El potencial condrogénico fue medido únicamente en cultivos en micromasa y no se valoraron las células apoptóticas.

A pesar de no poder garantizar estas premisas más allá de las 12 semanas, es clínicamente importante que, al menos tras este lapso de tiempo, y un ciclo completo de congelación/descongelación y almacenamiento a -196°C, las MSCs conserven sus características biológicas. De todas formas, estos resultados deberían servir para alentar la aplicación clínica de las MSCs tanto en terapias celulares veterinarias como humanas.

### **3.- CULTIVO DE MSCs SOBRE BIOMATERIALES**

En cuanto a los biomateriales utilizados en ingeniería tisular hay que señalar que éstos deben cumplir varios requisitos para maximizar las posibilidades de una regeneración exitosa, como la biodegradabilidad y/o biocompatibilidad, lo que facilita el crecimiento del tejido funcional y las propiedades biomecánicas adecuadas<sup>190,191,271</sup>.

En nuestro trabajo hemos evaluado cuatro biomateriales diferentes, uno compuesto de colágeno tipo I (Zimmer®), un hidrogel compuesto fundamentalmente de elastina, Matrigel® y un último biomaterial compuesto de ácido poliláctico (OPLA®). Para probar la posible utilidad clínica de estos materiales, hemos observado la capacidad de adhesión celular y de proliferación de las MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo en dichos biomateriales.

Las células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo o de médula ósea se han adherido perfectamente a la superficie de todos los biomateriales, como muestran las imágenes de SEM y han penetrado en el interior de éstos, como se puede observar en las imágenes de microscopía confocal con inmunofluorescencia frente a vinculina y fosfatasa de adhesión kinasa. Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente por otros autores en los moldes tridimensionales de colágeno<sup>272,273</sup>, en OPLA<sup>®273</sup> y en Hidrogel. En dichas imágenes se observa cómo las células sembradas se adhieren a los distintos biomateriales y toman formas fibroblásticas, estableciendo conexiones celulares y proliferando por toda la superficie de manera uniforme y hacia el interior del biomaterial.

La proliferación de estas células sigue un patrón de crecimiento estándar durante los 21 días que ha durado el ensayo valorado con la extracción de DNA con fenol-cloroformo isoamilo, mientras que para el mismo tiempo de ensayo, la determinación de la proliferación con el método colorimétrico de Alamar Blue<sup>®</sup> no ha sido tan uniforme.

Los biomateriales Zimmer<sup>®</sup> y OPLA<sup>®</sup> siguen, en los dos métodos de cuantificación de la proliferación, una curva de crecimiento estándar para las AT-MSCs y BM-MSCs con resultados similares a los de otros autores<sup>215</sup>.

En el caso del Matrigel<sup>®</sup> hemos obtenido resultados dispares, mediante la cuantificación de DNA total con fenol-cloroformo vimos que la proliferación celular iba aumentando hasta el día 8-12 y a partir de este momento disminuía. Sin embargo, en las cuantificaciones realizadas con Alamar Blue<sup>®</sup>, observamos una proliferación similar durante los 21 días de estudio, en los dos tipos celulares.

El Hidrogel sólo se pudo cuantificar con la técnica Alamar Blue<sup>®</sup> ya que, por su dureza, no fue posible degradarlo, pese a que otros

autores recogen protocolos de digestión con elastasa de neutrófilos humanos<sup>274</sup>. En las cuantificaciones realizadas con Alamar Blue<sup>®</sup>, vemos una mejor proliferación de las AT-MSCs, ambas curvas siguen el patrón de crecimiento estándar.

Los resultados indican que las MSCs cultivadas en los distintos biomateriales tienen un mejor crecimiento y proliferación en OPLA<sup>®</sup> y Zimmer<sup>®</sup>. En OPLA<sup>®</sup>, las MSCs tienen un crecimiento más lento que en el resto. En Zimmer<sup>®</sup>, las MSCs llegan a tener una alta proliferación en poco tiempo, por lo se puede producir una rápida regeneración del cartílago, lo que *a priori* podría presentarlo como el material más idóneo para hacer nuestro estudio *in vivo*.

El OPLA<sup>®</sup>, aunque se haya probado con un éxito relativo en modelos animales, su aplicación en seres humanos, está todavía limitada, ya que inducen la producción de células gigantes con encapsulación del cuerpo extraño y el substrato del polímero sufre actividad hidrolítica, que da lugar a productos parcialmente citotóxicos y productos de degradación<sup>163</sup>. Todo ello crea limitaciones a su uso clínico.

En los cuatro biomateriales probados hemos visto que ambos tipos celulares se comportan de forma similar, en cuanto a adhesión y proliferación celular. Mediante SEM y microscopía confocal evidenciamos una buena adherencia celular, y que la mejor proliferación celular se obtuvo en el biomaterial de Zimmer<sup>®</sup>.

#### **4.- VALORACIÓN DEL EFECTO REGENERADOR DE LAS MSCs DE CABALLO SOBRE MOLDES TRIDIMENSIONALES EN UN ESTUDIO *IN VIVO***

El tratamiento de lesiones meniscales se lleva a cabo mediante reparación de lesiones o defectos con tejidos fibrocartilaginosos los cuales mezclan las características de ambos tejidos el cartílago hialino

y el fibroso. Basándose en la capacidad de diferenciación que muestran las MSCs, pueden resultar una buena solución terapéutica para las lesiones de menisco reparando el tejido fibrocartilaginoso.

El presente trabajo, revela que las MSCs son capaces de reparar los defectos de meniscos creados en caballo. Una diferencia fundamental entre el cartílago hialino y el fibrocartilago, y además es una de las características que los define, es la cantidad de colágeno tipo I, colágeno tipo II y de agregano que posee cada uno<sup>267</sup>. Los resultados obtenidos en este estudio parecen sugerir que las MSCs tienen potencial para diferenciarse en fibrocartilago y de esa manera validar su uso en la reparación de lesiones de menisco.

Para investigar este potencial con mayor detalle, el modelo animal que hemos usado son caballos de raza Hispano-Bretón. Estos animales tienen una gran importancia económica en sí mismos, y además los resultados obtenidos en esta especie animal, se pueden transferir a aplicaciones clínicas humanas debido, a las similitudes anatómicas y biomecánicas de la articulación femoro-tibial de ambas especies.

Las AT-MSCs son una interesante fuente celular alternativa, que comparten muchas propiedades con las BM-MSCs<sup>136,150,237,275</sup>. Se obtienen más fácilmente y en mayor proporción que las BM-MSCs<sup>152,234</sup>. En este estudio, *in vivo* e *in vitro*, comparamos las AT-MSCs y las BM-MSCs de donantes de edades parecidas. Respecto al crecimiento celular, durante el primer día de cultivo, las AT-MSCs tuvieron una mayor proliferación que las BM-MSCs, hasta igualarse hacia el día 6, que alcanzaron la monocapa.

El presente estudio muestra que las MSCs sembradas sobre el biomaterial Zimmer<sup>®</sup>, pueden llegar a reparar defectos o lesiones meniscales. Además, el potencial de plasticidad de las MSCs fue confirmado en ensayos *in vitro* de diferenciación condrogénica, adipogénica y osteogénica en este trabajo, mediante la implantación

de MSCs indiferenciadas sobre los soportes para maximizar la adhesividad y facilitar una disposición segura de las mismas en la articulación de la rodilla<sup>276,277</sup>. Los defectos reparados con las construcciones compuestas por Zimmer<sup>®</sup>-MSCs muestran una producción de proteoglicanos y tejido fibrocartilaginoso característico, tras 12 meses de la implantación. La implantación de las MSCs parece tener una respuesta positiva *in vivo*, llevando al desarrollo efectivo de un tejido fibrocartilaginoso en el menisco dañado.

De la misma manera que ha sido estudiada, por otros autores, la reparación del cartílago articular en diferentes modelos animales<sup>268,278-280</sup>, la implantación de nuestros soportes promueve la reparación de menisco en caballos. Es notable esta reparación mediante la producción de proteoglicanos en el defecto creado, como indica la tinción de Safranina O, cuando los defectos eran tratados con células mesenquimales. De la misma manera que se ve la ausencia de proteoglicanos en el grupo control sin tratamiento.

No parece que haya estudios previos en experimentos animales que demuestren tales efectos en reparación de menisco *in vivo*, mediante MSCs en modelos equinos.

Para validar los resultados cuantitativamente, es necesaria la reproducción de defectos específicos en el menisco, en términos de tamaño y localización. De este modo, los modelos animales de menor tamaño, como los roedores, no serían adecuados para extrapolar los resultados dada la limitación del tamaño de la articulación de la rodilla en estas especies.

También existen limitaciones potenciales en este estudio. La principal se encuentra en el pequeño tamaño de la muestra y la escasez de reactivos existentes en el mercado para la investigación con equinos, lo cual limita los análisis posibles.



Finalmente, la investigación presentada en este trabajo valora la reparación del menisco tras 12 meses de la implantación. Para valorar una completa recuperación funcional del menisco serían necesarios estudios complementarios, incluyendo test mecánicos y chequeos para comprobar la mejora continua. También sería necesario hacer un seguimiento de las MSCs implantadas dentro de la articulación de la rodilla. Lo cual es crucial para entender qué ocurre con las células implantadas, así como esclarecer los mecanismos responsables de esta reparación del tejido. Estudios futuros solventarán estas limitaciones, posiblemente con el uso de células marcadas que nos ayuden en nuestro propósito.

Con los actuales avances en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, el uso de las MSCs se consolida como opción terapéutica en un futuro cercano para un amplio espectro de patologías, y con nuestros resultados, esperamos contribuir al desarrollo de nuevos protocolos y técnicas que ayuden en la posible aplicación clínica en terapias regenerativas de tejidos.

Estos estudios resultan ser el punto de inicio de las futuras investigaciones sobre cómo las MSCs equinas contribuyen a la regeneración en defectos de menisco y cómo el caballo puede servir de modelo animal para trasladar los resultados a enfermedades humanas.

# **CONCLUSIONES**

---



1. Las AT-MSCs de rata tienen mayor velocidad de proliferación que las de caballo; alcanzan la confluencia en monocapa sobre el 5º día, mientras que en caballo se alcanza el máximo hacia el 8º día. Y son de menor tamaño y con formas más elongadas que las de rata.

2. Las BM-MSCs de caballo presentan un crecimiento más lento que sus homólogas AT-MSCs y se produce en forma de colonias aisladas en cultivos primarios.

3. Las AT-MSCs y las BM-MSCs de rata y caballo mostraron expresión de marcadores de células troncales, concretamente, CD29, 73, 90 y 105. Y además tienen la capacidad de diferenciarse en condrocitos, adipocitos y osteocitos.

4. Los datos recogidos demuestran que las AT-MSCs y las BM-MSCs comparten fenotipos similares y la misma capacidad de diferenciación *in vitro* en diferentes líneas celulares.

5. El protocolo de criopreservación con el que se consiguen mayores porcentajes de viabilidad en MSCs, es el compuesto por un 80% de suero fetal bovino +10% de Dimetilsulfóxido +10% de DMEM.

6. La criopreservación de las células de rata y caballo, no influye significativamente en la tendencia de expresión de los marcadores de superficie celular, ni su capacidad de diferenciación se ve afectada; sin embargo, sí se altera su grado de expresión, siendo siempre más elevada en las congeladas, y su proliferación, la cual disminuye y se ralentiza en las criopreservadas frente a las frescas.

7. Las MSCs de caballo presentan una buena adherencia y capacidad de proliferación sobre los cuatro biomateriales estudiados: Zimmer<sup>®</sup>, Hidrogel, OPLA<sup>®</sup>, y Matrigel<sup>®</sup>; sin alterarse su morfología.

8. Los mejores resultados en cuanto a proliferación celular se obtuvieron sobre el biomaterial Zimmer<sup>®</sup>.

9. Las AT-MSCs pueden considerarse como una buena fuente celular alternativa a las BM-MSCs en terapia regenerativa ya

que presentan mayor cantidad de células/gr., una fácil obtención y proliferación mayor y más rápida.

10. Los defectos reparados con las construcciones compuestas por Zimmer<sup>®</sup>-MSCs, muestran una producción de proteoglicanos y tejido fibrocartilaginoso característico, llevando a la reparación del menisco dañado tras 12 meses de su implantación.

11. Nuestros resultados avalan el potencial de las MSCs para su utilización en terapia celular y regeneración de tejidos mediante ingeniería tisular.

# **BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM. Cartilage substitutes: Overview of basic science and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001;9(1):37-52.
2. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the united states. *Arthritis Rheum.* 1998;41(5):778-799.
3. Rosedale PD, Hopes R, Digby NJ, offord K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec.* 1985;116(3):66-69.
4. Frisbie DD. Future directions in treatment of joint disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2005;21(3):713-24, viii. doi: 10.1016/j.cveq.2005.07.001.
5. Frisbie DD, Bowman SM, Colhoun HA, DiCarlo EF, Kawcak CE, McIlwraith CW. Evaluation of autologous chondrocyte transplantation via a collagen membrane in equine articular defects: Results at 12 and 18 months. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(6):667-679. doi: 10.1016/j.joca.2007.09.013.
6. Frisbie DD, Kisiday JD, Kawcak CE, Werpy NM, McIlwraith CW. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2009;27(12):1675-1680. doi: 10.1002/jor.20933.
7. Jerosch J. Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on cartilage metabolism in OA: Outlook on other nutrient partners especially omega-3 fatty acids. *Int J Rheumatol.* 2011;2011:969012. doi: 10.1155/2011/969012; 10.1155/2011/969012.
8. Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat.* 1967;101(Pt 4):753-763.



9. Schulz RM, Bader A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J.* 2007;36(4-5):539-568. doi: 10.1007/s00249-007-0139-1.
10. Flugge LA, Miller-Deist LA, Petillo PA. Towards a molecular understanding of arthritis. *Chem Biol.* 1999;6(6):R157-66. doi: 10.1016/S1074-5521(99)80043-X.
11. Blomm W, Fawcett DW. CARTILAGE/ BONE. *Textbook of Histology, ed. Chapman & Hall.* 1994:182-233.
12. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Cell adhesion, cell junctions and extracellular matrix. *THE MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. GARLAND PUBLISHING, INC NEW YORK & LONDON.* 1989:802-836.
13. Stockwell RA, Scott JE. Distribution of acid glycosaminoglycans in human articular cartilage. *Nature.* 1967;215(5108):1376-1378.
14. Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: Mechanisms of action. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):54-67.
15. Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev.* 1988;1(1):87-112.
16. Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: Structure and potential functions. *Microsc Res Tech.* 1994;28(5):385-397. doi: 10.1002/jemt.1070280505.
17. Hodge JA, McKibbin B. The nutrition of mature and immature cartilage in rabbits. an autoradiographic study. *J Bone Joint Surg Br.* 1969;51(1):140-147.
18. Harris JD, Siston RA, Pan X, Flanigan DC. Autologous chondrocyte implantation: A systematic review. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(12):2220-2233. doi: 10.2106/JBJS.J.00049; 10.2106/JBJS.J.00049.

19. Bargmann W. Los tejidos de sostén o de soporte. *Histología y Anatomía Microscópicas Humanas*. ed. Labor . 1968:151-162.
20. Dellmann HD, Brown EM. CONNECTIVE AND SUPPORTIVE TISSUES. *TEXTBOOK OF VETERINARY HISTOLOGY*. ED LEA & FEBIGER. 1987:51-59.
21. Aagaard H, Verdonk R. Function of the normal meniscus and consequences of meniscal resection. *Scand J Med Sci Sports*. 1999;9(3):134-140.
22. McDermott ID, Amis AA. The consequences of meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br*. 2006;88(12):1549-1556. doi: 10.1302/0301-620X.88B12.18140.
23. McDevitt CA, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;(252)(252):8-18.
24. Proctor CS, Schmidt MB, Whipple RR, Kelly MA, Mow VC. Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Res*. 1989;7(6):771-782. doi: 10.1002/jor.1100070602.
25. Sweigart MA, Athanasiou KA. Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng*. 2001;7(2):111-129. doi: 10.1089/107632701300062697.
26. Fairbank TJ. Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br*. 1948;30B(4):664-670.
27. Arnoczky SP. Building a meniscus. biologic considerations. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;(367 Suppl)(367 Suppl):S244-53.
28. Buma P, Ramrattan NN, van Tienen TG, Veth RP. Tissue engineering of the meniscus. *Biomaterials*. 2004;25(9):1523-1532.
29. Ibarra C, Koski JA, Warren RF. Tissue engineering meniscus: Cells and matrix. *Orthop Clin North Am*. 2000;31(3):411-418.

30. Nakata K, Shino K, Hamada M, et al. Human meniscus cell: Characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391 Suppl)(391 Suppl):S208-18.
31. Setton LA, Guilak F, Hsu EW, Vail TP. Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(367 Suppl)(367 Suppl):S254-72.
32. Walsh CJ, Goodman D, Caplan AI, Goldberg VM. Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng.* 1999;5(4):327-337.
33. Port J, Jackson DW, Lee TQ, Simon TM. Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous cultured marrow cells in the goat model. *Am J Sports Med.* 1996;24(4):547-555.
34. Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, Reis RL. Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006;1(3):345-364.
35. Green WT, Jr. Articular cartilage repair. behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop Relat Res.* 1977;(124)(124):237-250.
36. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006;10(3):569-576.
37. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(6):432-463. doi: 10.1053/joca.2002.0801.
38. Gilbert JE. Current treatment options for the restoration of articular cartilage. *Am J Knee Surg.* 1998;11(1):42-46.

39. Dietrich I, Cochet O, Villageois P, Rodrigues CJ. Engraftment of human adipose derived stem cells delivered in a hyaluronic acid preparation in mice. *Acta Cir Bras.* 2012;27(4):283-289.
40. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005;54:465-480.
41. Huckle J, Dootson G, Medcalf N, et al. Differentiated chondrocytes for cartilage tissue engineering. *Novartis Found Symp.* 2003;249:103-12; discussion 112-7, 170-4, 239-41.
42. Vunjak-Novakovic G. The fundamentals of tissue engineering: Scaffolds and bioreactors. *Novartis Found Symp.* 2003;249:34-46; discussion 46-51, 170-4, 239-41.
43. Wei Y, Sun X, Wang W, Hu Y. Adipose-derived stem cells and chondrogenesis. *Cytotherapy.* 2007;9(8):712-716. doi: 10.1080/14653240701620596.
44. Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res.* 1998;240(1):58-65. doi: 10.1006/excr.1998.4010.
45. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro, I. dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1960;46(12):1533-1542.
46. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-395. doi: 10.1080/14653240500319234.
47. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Mesenchymal stem cell; history, biology and clinical application. *Rev Invest Clin.* 2006;58(5):498-511.

48. Takahashi K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*. 2013;140(12):2457-2461. doi: 10.1242/dev.092551; 10.1242/dev.092551.
49. Das S, Bonaguidi M, Muro K, Kessler JA. Generation of embryonic stem cells: Limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus*. 2008;24(3-4):E4-4/E3. doi: 10.3171/FOC/2008/24/3-4/E3; 10.3171/FOC/2008/24/3-4/E3.
50. Kiatpongsan S. From embryonic stem cells to functioning germ cells: Science, clinical and ethical perspectives. *J Med Assoc Thai*. 2007;90(10):2233-2237.
51. Young FE. A time for restraint. *Science*. 2000;287(5457):1424.
52. Horwitz EM, Andreef M, Frassoni F. Mesenchymal stromal cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13, Supplement 1(0):53-57. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.10.016.
53. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147.
54. BECKER AJ, McCULLOCH EA, TILL JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-454.
55. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387-403. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.387.
56. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32(1):11-16.
57. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105(3):369-377.

58. Noel D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002;3(7):1000-1004.
59. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004;8(3):301-316.
60. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4):579-592.
61. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):32-45.
62. Uematsu K, Hattori K, Ishimoto Y, et al. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*. 2005;26(20):4273-4279. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.037.
63. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-3843.
64. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34<sup>+</sup>-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006;177(4):2080-2087.
65. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-372. doi: 10.1182/blood-2005-07-2657.
66. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):74-85. doi: 10.1634/stemcells.2004-0359.

67. Lee AS, Kang RW, Kroin E, Verma NN, Cole BJ. Allograft meniscus transplantation. *Sports Med Arthrosc.* 2012;20(2):106-114. doi: 10.1097/JSA.0b013e318246f005; 10.1097/JSA.0b013e318246f005.
68. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17(4):331-340.
69. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med.* 2005;139(4):504-509.
70. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-1416. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.003.
71. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol.* 2003;160(6):909-918. doi: 10.1083/jcb.200212064.
72. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004;22(7):1330-1337. doi: 10.1634/stemcells.2004-0013.
73. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 2004;19(6):1450-1456. doi: 10.1093/humrep/deh279.
74. TILL JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14:213-222.

75. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11619-11624.
76. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: Potential for muscle regeneration. *J Cell Biol*. 2002;157(5):851-864. doi: 10.1083/jcb.200108150.
77. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol*. 2000;218(2):115-124. doi: 10.1006/dbio.1999.9565.
78. Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. *J Pathol*. 2002;197(4):479-491.
79. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-776.
80. Puglisi MA, Giuliani L, Fierabracci A. Identification and characterization of a novel expandable adult stem/progenitor cell population in the human exocrine pancreas. *J Endocrinol Invest*. 2008;31(6):563-572.
81. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*. 2002;24(1):91-98. doi: 10.1002/bies.10028.
82. Strain AJ, Crosby HA. Hepatic stem cells. *Gut*. 2000;46(6):743-745.
83. Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270(2):517-521. doi: 10.1006/bbrc.2000.2473.
84. Yen BL, Huang HI, Chien CC, et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*. 2005;23(1):3-9. doi: 10.1634/stemcells.2004-0098.



85. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003;5(5):362-369. doi: 10.1080/14653240310003026.
86. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991;78(1):55-62.
87. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 2002;20(6):530-541. doi: 10.1634/stemcells.20-6-530.
88. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy*. 2001;3(5):393-396. doi: 10.1080/146532401753277229.
89. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
90. Huss R. Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9(6):783-793. doi: 10.1089/152581600750062228.
91. Guo Z, Yang J, Liu X, et al. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chin Med J (Engl)*. 2001;114(9):950-953.
92. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3213-3218. doi: 10.1073/pnas.070034097.

93. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999;181(1):67-73. doi: 2-C.
94. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espindola G, Perez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: Phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res.* 2005;29(2):215-224. doi: 10.1016/j.leukres.2004.06.011.
95. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-395.
96. Koch TG, Berg LC, Betts DH. Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J.* 2009;50(2):155-165.
97. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, et al. Porcine mesenchymal stem cells. induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res.* 2002;307(3):321-327. doi: 10.1007/s00441-002-0525-z.
98. Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, Williams J. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 2000;61(9):1003-1010.
99. Niku M, Ilmonen L, Pessa-Morikawa T, Iivanainen A. Limited contribution of circulating cells to the development and maintenance of nonhematopoietic bovine tissues. *Stem Cells.* 2004;22(1):12-20. doi: 10.1634/stemcells.22-1-12.
100. Alhadlaq A, Elisseeff JH, Hong L, et al. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(7):911-923.

101. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997;6(2):125-134.
102. Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg*. 2001;12(6):586-93; discussion 594-5.
103. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-49. doi: 10.1038/nature00870.
104. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003;102(10):3483-3493. doi: 10.1182/blood-2003-05-1664.
105. Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes*. 1987;11(1):19-27.
106. Ning H, Liu G, Lin G, Yang R, Lue TF, Lin CS. Fibroblast growth factor 2 promotes endothelial differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*. 2009;6(4):967-979. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19207272>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19207272>.
107. Zemel R, Bachmetov L, Ad-El D, Abraham A, Tur-Kaspa R. Expression of liver-specific markers in na<sup>+</sup>-ve adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2009;29(9):1326-1337. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515222>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515222>.
108. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002;30(8):896-904.

109. Madonna R, Willerson JT, Geng YJ. Myocardin a enhances telomerase activities in adipose tissue mesenchymal cells and embryonic stem cells undergoing cardiovascular myogenic differentiation. . 2008;26(1):202-211.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17916802>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17916802>.
110. Sliwa A, Balwierz A, Kiec-Wilk B, Polus A, Knapp A, Dembinska-Kiec A. Differentiation of human adipose tissue SVF cells into cardiomyocytes. . 2009;4(3):195-198.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19533197>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19533197>.
111. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. . 2002;290(2):763-769.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11785965>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11785965>.
112. Diekman BO, Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F. Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: Induction by growth factors and cartilage-derived matrix. . 2010;16(2):523-533.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19715387>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19715387>.
113. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1285-1297. doi: 10.1002/jcb.20904.
114. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294-1301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342.

115. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.* 2003;3(5):705-713.
116. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-74.
117. Bieback K, Kern S, Kocaomer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: Bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng.* 2008;18(1 Suppl):S71-6.
118. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):341-347. doi: 10.1002/jcp.21200.
119. Aroen A. Stem cell therapy for articular cartilage defects. *Br Med Bull.* 2011;99:227-240. doi: 10.1093/bmb/ldr032; 10.1093/bmb/ldr032.
120. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17(4):331-340.
121. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997;64(2):278-294.
122. Zhao S, Wehner R, Bornhauser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev.* 2010;19(5):607-614. doi: 10.1089/scd.2009.0345; 10.1089/scd.2009.0345.

123. Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: A user's guide. *Stem Cells Dev.* 2010;19(10):1449-1470. doi: 10.1089/scd.2010.0140; 10.1089/scd.2010.0140.
124. Beane OS, Darling EM. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(10):2079-2097. doi: 10.1007/s10439-012-0639-8; 10.1007/s10439-012-0639-8.
125. Mareschi K, Rustichelli D, Calabrese R, et al. Multipotent mesenchymal stromal stem cell expansion by plating whole bone marrow at a low cellular density: A more advantageous method for clinical use. *Stem Cells Int.* 2012;2012:920581. doi: 10.1155/2012/920581; 10.1155/2012/920581.
126. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: Optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int.* 2014;2014:951512. doi: 10.1155/2014/951512.
127. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.* 2009;76(2):56-66.
128. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101-109. doi: 10.1159/000071150.
129. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-1416.

130. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006;24(4):150-154. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.01.010.
131. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: Supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. . 2006;12(12):3375-3382. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518674>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518674>.
132. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. 2003;21(3):420-431. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706014>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706014>.
133. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. . 2003;85(5):740-747. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892203>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892203>.
134. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. . 2004;113(2):585-594. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758221>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758221>.
135. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. 2006;12(4):459-465. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16582917>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16582917>.
136. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. .

2005;87(1):125-128.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733747>;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733747>.

137. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(3):290-294. doi: 10.1016/j.coph.2004.03.002.

138. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. . 2000;24 Suppl 4:S41-4.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11126240>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11126240>.

139. Gimble JM, Guilak F. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. 2003;58:137-160.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711015>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711015>.

140. Grewal NS, Gabbay JS, Ashley RK, Wasson KL, Bradley JP, Zuk PA. BMP-2 does not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. . 2009;123(2):158S-65S.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182675>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182675>.

141. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors.2003;111(6):1922-1931.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711954>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711954>.

142. Cao YL, Zhou GD. [Tissue engineering in twenty-first century-opportunity and challenge].2005;85(36):2523-2525.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16321286>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16321286>.



143. Planat-Bénard V, Menard C, André M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. . 2004;94(2):223-229.
144. Wilson A, Butler PE, Seifalian AM. Adipose-derived stem cells for clinical applications: A review. . 2011;44(1):86-98.
145. Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, et al. Cryopreservation of mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells. . 2008;17(1-2):35-41.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468233>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468233>.
146. Mambelli LI, Santos EJ, Frazão PJ, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation.2009;15(1):87-94.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196122>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196122>.
147. Berg L, Koch T, Heerkens T, Bessonov K, Thomsen P, Betts D. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. . 2009;22(5):363-370.
148. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. . 2004;109(10):1292-1298.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993122>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993122>.
149. Zuk P, Chou YF, Mussano F, Benhaim P, Wu BM. Adipose-derived stem cells and BMP2: Part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res*. 2011;52(2):119-132. doi: 10.3109/03008207.2010.484515.
150. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. . 2002;13(12):4279-4295.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475952>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475952>.

151. Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129(1):118-129. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.
152. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005;54(3):132-141.
153. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 2006;24(2):376-385. doi: 10.1634/stemcells.2005-0234.
154. Liu G, Li Y, Sun J, Zhou H, Cui L. [Effect of cryopreservation on growth and osteogenesis of human adipose-derived stem cells]. . 2010;24(10):1224-1227.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046811>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046811>.
155. Kitagawa Y, Korobi M, Toriyama K, Kamei Y, Torii . History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical application. *Jpn J Plast Reconstr Surg.* 2006;49:1097-1104.
156. Zuk PA. Stem cell research has only just begun. *Science.* 2001;293(5528):211-212.
157. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(1):50-58. doi: 10.1097/01.prs.0000293876.10700.b8.
158. Mizuno H, Itoi Y, Kawahara S, Ogawa R, Akaishi S, Hyakusoku H. In vivo adipose tissue regeneration by adipose-derived stromal cells isolated from GFP transgenic mice. *Cells Tissues Organs.* 2008;187(3):177-185. doi: 10.1159/000110805.

159. Nambu M, Ishihara M, Nakamura S, et al. Enhanced healing of mitomycin C-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix. *Wound Repair Regen.* 2007;15(4):505-510. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00258.x.
160. Okuda T, Uysal AC, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Prefabrication of tissue engineered bone grafts: An experimental study. *Ann Plast Surg.* 2010;64(1):98-104. doi: 10.1097/SAP.0b013e3181999ec1.
161. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(6):945-953. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0048.
162. Takahashi K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development.* 2013;140(12):2457-2461.
163. Raghunath J, Rollo J, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Biomaterials and scaffold design: Key to tissue-engineering cartilage. . 2007;46:73-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227284>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227284>.
164. Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. . 2003;90(6):1112-1127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635186>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635186>.
165. Jin X, Sun Y, Zhang K, et al. Ectopic neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells induced by adenoviral-mediated transfer of hTGF beta2. . 2007;28(19):2994-3003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17399784>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17399784>.

166. Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, Stolzing A. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. . 2011;9:10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21244679>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21244679>.
167. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
168. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
169. Moad M, Pal D, Hepburn AC, et al. A novel model of urinary tract differentiation, tissue regeneration, and disease: Reprogramming human prostate and bladder cells into induced pluripotent stem cells. *Eur Urol*. 2013;64(5):753-761. doi: 10.1016/j.eururo.2013.03.054; 10.1016/j.eururo.2013.03.054.
170. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*. 2008;26(11):1276-1284. doi: 10.1038/nbt.1503; 10.1038/nbt.1503.
171. Young FE. A time for restraint. *Science*. 2000;287(5457):1424.
172. Lenoir N. Europe confronts the embryonic stem cell research challenge. *Science*. 2000;287(5457):1425-1427.
173. Goh BC, Thirumala S, Kilroy G, Devireddy RV, Gimble JM. Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: Maintenance of differentiation potential and viability. . 2007;1(4):322-324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18038424>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18038424>.

174. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: A review of current techniques. *J Hematother.* 1992;1(3):233-250.
175. Freimark D, Sehl C, Weber C, et al. Systematic parameter optimization of a me(2)SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells. *Cryobiology.* 2011;63(2):67-75. doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.05.002; 10.1016/j.cryobiol.2011.05.002.
176. Devireddy RV, Thirumala S, Gimble JM. Cellular response of adipose derived passage-4 adult stem cells to freezing stress. *J Biomech Eng.* 2005;127(7):1081-1086.
177. Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, Gimble JM, Devireddy RV. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. . 2005;21(5):1511-1524. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16209556>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16209556>.
178. Armitage WJ. Cryopreservation of animal cells. *Symp Soc Exp Biol.* 1987;41:379-393.
179. Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, et al. Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120(6):1510-1517. doi: 10.1097/01.prs.0000288015.70922.e4.
180. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007;368:39-57. doi: 10.1007/978-1-59745-362-2\_3.
181. Robertson JA. Ethical and legal issues in cryopreservation of human embryos. *Fertil Steril.* 1987;47(3):371-381.
182. Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod.* 1997;57(5):1089-1095.

183. Fujioka T, Yasuchika K, Nakamura Y, Nakatsuji N, Suemori H. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int J Dev Biol.* 2004;48(10):1149-1154. doi: 10.1387/ijdb.041852tf.
184. Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW. Cryopreservation of stem cells using trehalose: Evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. . 2004;13(3):295-305.
185. Rudolph AS, Crowe JH, Crowe LM. Effects of three stabilizing agents--proline, betaine, and trehalose--on membrane phospholipids. *Arch Biochem Biophys.* 1986;245(1):134-143.
186. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Transport phenomena during freezing of adipose tissue derived adult stem cells. . 2005;92(3):372-383.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155954>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155954>.
187. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
188. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. *J Anat.* 2006;208(1):3-12. doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00511.x.
189. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204. doi: 10.1186/ar2116.

190. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(1):11-23. doi: 10.1002/jbm.820270104.
191. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(6):432-463.
192. Li Y, Ma T, Kniss DA, Lasky LC, Yang ST. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices. *Biotechnol Prog.* 2001;17(5):935-944.
193. Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Culture of organized cell communities. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;33(1-2):15-30.
194. Temenoff JS, Mikos AG. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials.* 2000;21(5):431-440.
195. Chapekar MS. Tissue engineering: Challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(6):617-620.
196. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2001;55(2):141-150.
197. Wu H, Wan Y, Cao X, Wu Q. Proliferation of chondrocytes on porous poly(DL-lactide)/chitosan scaffolds. *Acta Biomater.* 2008;4(1):76-87. doi: 10.1016/j.actbio.2007.06.010.
198. Elisseeff JH. Embryonic stem cells: Potential for more impact. *Trends Biotechnol.* 2004;22(4):155-156. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.02.006.

199. van Eijk F, Saris DB, Creemers LB, et al. The effect of timing of mechanical stimulation on proliferation and differentiation of goat bone marrow stem cells cultured on braided PLGA scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(8):1425-1433. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0081; 10.1089/ten.tea.2007.0081.
200. Santo VE, Frias AM, Carida M, et al. Carrageenan-based hydrogels for the controlled delivery of PDGF-BB in bone tissue engineering applications. *Biomacromolecules*. 2009;10(6):1392-1401.
201. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*. 2001;19(11):1029-1034. doi: 10.1038/nbt1101-1029.
202. Liu J, Meisner D, Kwong E, Wu XY, Johnston MR. A novel trans-lymphatic drug delivery system: Implantable gelatin sponge impregnated with PLGA-paclitaxel microspheres. *Biomaterials*. 2007;28(21):3236-3244. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.022.
203. Soontornworajit B, Zhou J, Zhang Z, Wang Y. Aptamer-functionalized in situ injectable hydrogel for controlled protein release. *Biomacromolecules*. 2010;11(10):2724-2730. doi: 10.1021/bm100774t; 10.1021/bm100774t.
204. Paige KT, Vacanti CA. Engineering new tissue: Formation of neo-cartilage. *Tissue Eng*. 1995;1(2):97-106. doi: 10.1089/ten.1995.1.97; 10.1089/ten.1995.1.97.
205. Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, et al. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng*. 2000;122(3):252-260.
206. van Susante JL, Buma P, van Osch GJ, et al. Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand*. 1995;66(6):549-556.



207. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci.* 1995;108 ( Pt 4)(Pt 4): 1497-1508.
208. Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy.* 2000;16(6):571-577. doi: 10.1053/jars.2000.4827.
209. Urry DW, Parker TM. Mechanics of elastin: Molecular mechanism of biological elasticity and its relationship to contraction. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23(5-6):543-559.
210. Narayanan AS, Page RC, Kuzan F, Cooper CG. Elastin cross-linking in vitro. studies on factors influencing the formation of desmosines by lysyl oxidase action on tropoelastin. *Biochem J.* 1978;173(3):857-862.
211. Debelle L, Alix AJ, Jacob MP, et al. Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies. *J Biol Chem.* 1995;270(44):26099-26103.
212. Bellingham CM, Woodhouse KA, Robson P, Rothstein SJ, Keeley FW. Self-aggregation characteristics of recombinantly expressed human elastin polypeptides. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1550(1):6-19.
213. Keeley FW, Bellingham CM, Woodhouse KA. Elastin as a self-organizing biomaterial: Use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002;357(1418):185-189. doi: 10.1098/rstb.2001.1027.
214. Tsai WB, Chen CH, Chen JF, Chang KY. The effects of types of degradable polymers on porcine chondrocyte adhesion, proliferation and gene expression. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(4):337-343.

215. Zong C, Xue D, Yuan W, et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2010;20:109-120.
216. Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. 1996;17(2):103-114.
217. Shui W, Yin L, Luo J, et al. Characterization of chondrocyte scaffold carriers for cell-based gene therapy in articular cartilage repair. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(12):3542-3550. doi: 10.1002/jbm.a.34661; 10.1002/jbm.a.34661.
218. Chau DY, Collighan RJ, Verderio EA, Addy VL, Griffin M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials*. 2005;26(33):6518-6529. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.017.
219. Soler JA, Gidwani S, Curtis MJ. Early complications from the use of porcine dermal collagen implants (permacol) as bridging constructs in the repair of massive rotator cuff tears. A report of 4 cases. *Acta Orthop Belg*. 2007;73(4):432-436.
220. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(4):571-578.
221. Zeugolis DI, Paul GR, Attenburrow G. Cross-linking of extruded collagen fibers--a biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2009;89(4):895-908. doi: 10.1002/jbm.a.32031; 10.1002/jbm.a.32031.

222. Girotti A, Reguera J, Rodriguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Matestera A. Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15(4):479-484.
223. Walmsley JR, Phillips TJ, Townsend HG. Meniscal tears in horses: An evaluation of clinical signs and arthroscopic treatment of 80 cases. *Equine Vet J*. 2003;35(4):402-406.
224. Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(2):243-262. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.027.
225. Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14(4-6):311-324. doi: 10.1159/000080341.
226. Huckle J, Dootson G, Medcalf N, et al. Differentiated chondrocytes for cartilage tissue engineering. *Novartis Found Symp*. 2003;249:103-12; discussion 112-7, 170-4, 239-41.
227. Djian P, Roncari AK, Hollenberg CH. Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest*. 1983;72(4):1200-1208.
228. Frisbie DD. Future directions in treatment of joint disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2005;21(3):713-24, viii. doi: 10.1016/j.cveq.2005.07.001.
229. Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;272(1):398-402. doi: 10.1002/ar.a.10039.
230. Bjorntorp P, Karlsson M, Gustafsson L, et al. Quantitation of different cells in the epididymal fat pad of the rat. *J Lipid Res*. 1979;20(1):97-106.

231. Greenwood MR, Hirsch J. Postnatal development of adipocyte cellularity in the normal rat. *J Lipid Res.* 1974;15(5):474-483.
232. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32(1):48-55; discussion 56-7.
233. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, et al. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng.* 2006;12(10):2853-2862.
234. Aust L, Devlin B, Foster SJ, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy.* 2004;6(1):7-14. doi: 10.1080/14653240310004539.
235. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy.* 2006;8(2):166-177.
236. RODBELL M. Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J Biol Chem.* 1964;239:753-755.
237. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. . 2001;7(2):211-228.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456>.
238. Boquest AC, Shahdadfar A, Fronsdal K, et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: Alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell.* 2005;16(3):1131-1141.

239. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: Looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*. 2010;21(11):1783-1787. doi: 10.1091/mbc.E09-07-0589.
240. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*. 2004;53(5):632-637. doi: S0026049503005432 [pii].
241. Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, et al. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol*. 2010;10:9. doi: 10.1186/1472-6750-10-9.
242. Yang F, Cho SW, Son SM, et al. Genetic engineering of human stem cells for enhanced angiogenesis using biodegradable polymeric nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3317-3322. doi: 10.1073/pnas.0905432106.
243. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res*. 2005;308(2):283-290. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.04.029.
244. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997;64(2):295-312. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(199702)64:2<295::AID-JCB12>3.0.CO;2-I [pii].
245. Ahern BJ, Schaer TP, Terkhorn SP, Jackson KV, Mason NJ, Hankenson KD. Evaluation of equine peripheral blood apheresis product, bone marrow, and adipose tissue as sources of mesenchymal stem cells and their differentiation potential. *Am J Vet Res*. 2011;72(1):127-133. doi: 10.2460/ajvr.72.1.127.

246. Savchenkova IP, Rostovskaia MS, Chupikova NI, Sharifullina SZ, Tepliashin AS. Osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow and adipose tissue. *Tsitologiya*. 2008;50(10):855-860.
247. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007;327(3):449-462. doi: 10.1007/s00441-006-0308-z.
248. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum*. 2006;54(4):1222-1232. doi: 10.1002/art.21779 [doi].
249. Taylor SE, Smith RK, Clegg PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: Scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J*. 2007;39(2):172-180.
250. Marx J. Cancer research. mutant stem cells may seed cancer. *Science*. 2003;301(5638):1308-1310. doi: 10.1126/science.301.5638.1308 [doi].
251. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005;65(8):3035-3039. doi: 65/8/3035 [pii].
252. Heng BC, Cao T. The differentiation status of stem cells and their derivatives: A key consideration in transplantation medicine. *ASAIO J*. 2004;50(6):626-628.
253. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues. *Biomaterials*. 1996;17(3):243-256.
254. Li ZY, Liu L, Chen L, Lin YF, Tian WD. An experimental study on rat bone marrow mesenchymal stem cells transfected with dentin sialophosphoprotein gene in vitro. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2006;41(7):426-429.

255. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007;368:39-57.
256. Fuller BJ. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters.* 2004;25(6):375-388.
257. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. . 2010;4(3):224-232.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967746>;  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967746>.
258. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Transport phenomena during freezing of adipose tissue derived adult stem cells. . 2005;92(3):372-383.
259. Cui XD, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Pu LL. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology.* 2007;55(3):269-278. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.08.012.
260. Cui X, Pu LL. The search for a useful method for the optimal cryopreservation of adipose aspirates: Part II. in vivo study. *Aesthet Surg J.* 2010;30(3):451-456. doi: 10.1177/1090820X10374100.
261. Almici C, Carlo-Stella C, Wagner JE, et al. Clonogenic capacity and ex vivo expansion potential of umbilical cord blood progenitor cells are not impaired by cryopreservation. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19(11):1079-1084. doi: 10.1038/sj.bmt.1700803.
262. Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells.* 2005;23(5):681-688. doi: 10.1634/stemcells.2004-0135.
263. Bigdeli N, Karlsson C, Strehl R, Concaro S, Hyllner J, Lindahl A. Coculture of human embryonic stem cells and human articular chondrocytes results in significantly altered phenotype and improved chondrogenic differentiation. . 2009;27(8):1812-1821.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544424>;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544424>.

264. Liu G, Zhou H, Li Y, et al. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. . 2008;57(1):18-24.

265. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci*. 2010.

266. Tilgner K, Atkinson SP, Yung S, et al. Expression of GFP under the control of the RNA helicase VASA permits fluorescence-activated cell sorting isolation of human primordial germ cells. *Stem Cells*. 2010;28(1):84-92. doi: 10.1002/stem.263.

267. Freemont AJ, Hoyland J. Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage: Its significance in cartilage repair and replacement. *Eur J Radiol*. 2006;57(1):32-36. doi: 10.1016/j.ejrad.2005.08.008.

268. He W, Liu YJ, Wang ZG, Guo ZK, Wang MX, Wang N. Enhancement of meniscal repair in the avascular zone using connective tissue growth factor in a rabbit model. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(23):3968-3975.

269. Heng BC, Ye CP, Liu H, et al. Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. . 2006;13(3):433-445.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16374523>;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16374523>.

270. Gonda K, Shigeura T, Sato T, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. . 2008;121(2):401-410.



271. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*. 1994;12(7):689-693.
272. Cullen DK, Stabenfeldt SE, Simon CM, Tate CC, LaPlaca MC. In vitro neural injury model for optimization of tissue-engineered constructs. *J Neurosci Res*. 2007;85(16):3642-3651. doi: 10.1002/jnr.21434 [doi].
273. Tan WH, Takeuchi S. Dynamic microarray system with gentle retrieval mechanism for cell-encapsulating hydrogel beads. *Lab Chip*. 2008;8(2):259-266. doi: 10.1039/b714573j [doi].
274. Brubaker CE, Messersmith PB. Enzymatically degradable mussel-inspired adhesive hydrogel. *Biomacromolecules*. 2011;12(12):4326-4334. doi: 10.1021/bm201261d [doi].
275. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25(16):3211-3222. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.045.
276. Ando W, Tateishi K, Hart DA, et al. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007;28(36):5462-5470. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.030.
277. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, et al. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials*. 2010;31(31):8004-8011. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.017; 10.1016/j.biomaterials.2010.07.017.

278. Moriguchi Y, Tateishi K, Ando W, et al. Repair of meniscal lesions using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from allogenic synovial MSCs in a miniature swine model. *Biomaterials*. 2013;34(9):2185-2193. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.039; 10.1016/j.biomaterials.2012.11.039.

279. Peretti GM, Gill TJ, Xu JW, Randolph MA, Morse KR, Zaleske DJ. Cell-based therapy for meniscal repair: A large animal study. *Am J Sports Med*. 2004;32(1):146-158.

280. Ferris D, Frisbie D, Kisiday J, McIlwraith CW. In vivo healing of meniscal lacerations using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and fibrin glue. *Stem Cells Int*. 2012;2012:691605. doi: 10.1155/2012/691605; 10.1155/2012/691605.