



universidad
de león

Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía

Facultad de Veterinaria

Tesis Doctoral

**TERAPIA CON CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES ADULTAS DIRIGIDA AL
TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES
OSTEOARTICULARES**

Autor

Saúl Pérez Castrillo



Directora

María Vega Villar Suárez



León, 2016

El secreto de mi felicidad está en no esforzarse por el placer,
sino en encontrar el placer en el esfuerzo.

André Gide

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar el trabajo tan arduo como el desarrollo de una tesis doctoral y observar el fruto de varios años de investigación, merece la pena dedicar unas palabras a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han contribuido en el presente trabajo.

En primer lugar, y con mención especial, agradecer a mi directora de tesis Vega Villar porque, gracias a su apoyo, dedicación y esfuerzo es posible este trabajo. Gracias por el respeto hacia mis sugerencias e ideas aportadas, fuesen buenas o malas. Y gracias por la confianza depositada en mí a través de tantos años de duro trabajo.

En segundo lugar, debo agradecer a aquellas personas que han colaborado conmigo en todos los ensayos realizados. De estas personas llevo muchos conocimientos, muy buenos recuerdos y, sobre todo, alegría. Gracias María Luisa González, María Elisa López y José María Maniega.

También quiero agradecer a todas aquellas personas que han pasado o están en nuestro departamento, tanto realizando tesis doctoral como proyectos fin de máster. Gracias Marta Esteban, Laura Miguélez, Jessica Álvarez, María Tarilonte y Sandra Lobato.

Me gustaría también agradecer a miembros de otros departamentos que se han invertido su tiempo y esfuerzo, desinteresadamente, en mejorar mi inexperiencia en uso de máquinas y técnicas de laboratorio, así como a resolver dudas presentadas en el trabajo realizado. Gracias Sonia Martínez, Elías Rodríguez, Victoria García y Antonio.

Me gustaría agradecer de forma muy especial a mis padres y hermanas. Gracias por ayudarme en los buenos y malos momentos, gracias por confiar en mí durante todo este tiempo, gracias por vuestro apoyo y esfuerzo. Gracias.

A MI FAMILIA

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN..... | 23 |
| 1.1. | ENFERMEDADES OSTEOARTICULARES..... | 31 |
| 1.1.1. | Osteoartritis..... | 31 |
| 1.1.2. | Artritis reumatoide..... | 33 |
| 1.1.3. | Citoquinas y factores que intervienen en la etiopatogenia de la OA y AR..... | 35 |
| 1.2. | INGENIERÍA DE TEJIDOS APLICADA AL CARTÍLAGO ARTICULAR..... | 38 |
| 1.2.1. | Ingeniería de tejidos..... | 38 |
| 1.2.2. | Terapia convencional en enfermedades osteoarticulares..... | 62 |
| 1.2.3. | Tratamientos biológicos..... | 65 |
| 1.2.4. | Terapia celular en las enfermedades osteoarticulares..... | 66 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 63 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 69 |
| 3.1. | MATERIALES..... | 79 |
| 3.2. | OBTENCIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR, TEJIDO ADIPOSO Y MÉDULA ÓSEA..... | 79 |
| 3.2.1. | Obtención de cartílago articular de humano..... | 79 |
| 3.2.2. | Obtención de cartílago articular de caballo..... | 80 |
| 3.2.3. | Obtención de tejido adiposo de humano..... | 80 |
| 3.2.4. | Obtención de tejido adiposo de caballo..... | 81 |
| 3.2.5. | Obtención de médula ósea de caballo..... | 81 |
| 3.3. | AISLAMIENTO Y MULTIPLICACIÓN CELULAR..... | 82 |
| 3.3.1. | Aislamiento de condrocitos..... | 82 |
| 3.3.2. | Aislamiento de ASCs..... | 83 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.3.3. | Aislamiento de BMSCs..... | 83 |
| 3.3.4. | Multiplicación, tripsinización y criopreservación celular . | 84 |
| 3.4. | CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs POR MEDIO DE MARCADORES DE SUPERFICIE | 86 |
| 3.4.1. | Caracterización de ASCs y BMSCs de caballo y de humano mediante marcadores de superficie por citometría de flujo | 86 |
| 3.4.2. | Caracterización de ASCs y BMSCs de caballo y de humano mediante marcadores de superficie por microscopía confocal | 87 |
| 3.5. | TÉCNICAS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR | 89 |
| 3.5.1. | Inducción de la condrogénesis..... | 89 |
| 3.5.2. | Inducción de la adipogénesis | 92 |
| 3.5.3. | Inducción de la osteogénesis | 94 |
| 3.6. | TRANSFECCIONES, ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN Y AISLAMIENTO DE UNA LINEA CELULAR DE CABALLO MEDIANTE TRANSFECCIÓN ESTABLE | 96 |
| 3.6.1. | Transfección con Lipofectamine 2.000® | 96 |
| 3.6.2. | Transfección con SAFectin® | 97 |
| 3.6.3. | Análisis de la eficiencia de la transfección | 98 |
| 3.6.4. | Aislamiento de las líneas celulares con transfección estable | 98 |
| 3.7. | TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN..... | 99 |
| 3.7.1. | Fijación de las muestras..... | 100 |
| 3.7.2. | Inclusión y deshidratación de las muestras..... | 100 |
| 3.7.3. | Preparación de las muestras y visualización..... | 101 |
| 3.8. | PRODUCCIÓN DE MATRICES EXTRACELULARES A PARTIR DE MSCs DE CABALLO | 102 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.8.1. | Producción de matrices extracelulares a partir de medio ascórbico..... | 102 |
| 3.8.2. | Producción de matrices extracelulares a partir de medio condrogénico | 103 |
| 3.8.3. | Aislamiento de las matrices extracelulares..... | 103 |
| 3.8.4. | Tratamiento de las DSCMs | 104 |
| 3.9. | CARACTERIZACIÓN DE LAS DSCMs..... | 105 |
| 3.9.1. | Tinción con azul alcian | 105 |
| 3.9.2. | Análisis proteico por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-Page) | 105 |
| 3.9.3. | Microscopía electrónica de barrido | 110 |
| 3.9.4. | Inmunohistoquímica de proteínas extracelulares..... | 111 |
| 3.10. | ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR | 112 |
| 3.10.1. | Eficiencia de adhesión celular sobre DSCMs | 112 |
| 3.10.2. | Análisis del promedio del área celular utilizada sobre DSCMs | 112 |
| 3.10.3. | Análisis de la proliferación celular sobre DSCMs | 113 |
| 3.10.4. | Análisis de la viabilidad celular | 114 |
| 3.11. | TÉCNICAS DE MONOCULTIVOS, CO-CULTIVOS Y CULTIVOS CON MEDIOS CONDICIONADOS CON CÉLULAS DE CABALLO Y DE HUMANO | 115 |
| 3.11.1. | Monocultivos y co-cultivos de células de caballo..... | 115 |
| 3.11.2. | Monocultivos y co-cultivos en humano con y sin condroitín sulfato..... | 116 |
| 3.11.3. | Inducción de la inflamación | 118 |
| 3.11.4. | Medios condicionados | 118 |

| | |
|--|-----|
| 3.12. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CO-CULTIVOS..... | 119 |
| 3.12.1. Tinción verde..... | 119 |
| 3.12.2. Tinción violeta | 120 |
| 3.13. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA..... | 120 |
| 3.13.1. Extracción de RNA | 121 |
| 3.13.2. Retrotranscripción del RNA | 121 |
| 3.13.3. Diseño de <i>Primers</i> | 121 |
| 3.13.4. PCR a tiempo real (PCR cuantitativa) | 125 |
| 3.14. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) DE PROSTAGLANDINA E ₂ | 125 |
| 3.15. CUANTIFICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO..... | 126 |
| 3.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 127 |
| 3.17. CUADRO EXPLICATIVO DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA..... | 128 |
| 4. RESULTADOS..... | 129 |
| 4.1. OBTENCIÓN DE MSCs Y CONDROCITOS DE CABALLO..... | 131 |
| 4.1.1. Obtención de MSCs de caballo..... | 131 |
| 4.1.2. Obtención de condrocitos de caballo..... | 133 |
| 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs DE CABALLO..... | 135 |
| 4.2.1. Caracterización de las MSCs de caballo por medio de marcadores de superficie | 135 |
| 4.2.2. Pruebas de multipotencialidad de las MSCs de caballo..... | 137 |
| 4.3. OBTENCIÓN DE ASCs Y CONDROCITOS DE HUMANO..... | 139 |
| 4.3.1. Obtención de ASCs de humano | 139 |
| 4.3.2. Obtención de condrocitos de humano..... | 140 |
| 4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS ASCs DE HUMANO..... | 142 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.4.1. | Caracterización de las ASCs de humano por medio de marcadores de superficie | 142 |
| 4.4.2. | Pruebas de multipotencialidad de las ASCs de humano..... | 144 |
| 4.5. | EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN..... | 145 |
| 4.5.1. | Eficiencia de transfección en ASCs de caballo..... | 145 |
| 4.5.2. | Eficiencia de transfección en BMSCs de caballo..... | 146 |
| 4.6. | ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS TRANSFECTANTES | 147 |
| 4.6.1. | Lipofectamine 2.000 [®] | 147 |
| 4.6.2. | SAFEctin [®] | 148 |
| 4.7. | PÉRDIDA DIARIA DE LA FLUORESCENCIA | 149 |
| 4.8. | AISLAMIENTO DE LAS MSCs GFP ⁺ DE CABALLO..... | 151 |
| 4.9. | ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE Y DE LA MULTIPOTENCIALIDAD DE LAS MSCs GFP ⁺ DE CABALLO..... | 152 |
| 4.9.1. | Análisis de la expresión de los marcadores de superficie | 152 |
| 4.9.2. | Análisis de la multipotencialidad..... | 153 |
| 4.10. | CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MSCs Y MSCs GFP ⁺ DE CABALLO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)..... | 159 |
| 4.11. | CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSCs (DSCMs)..... | 164 |
| 4.11.1. | Producción de las DSCMs..... | 164 |
| 4.11.2. | Análisis por microscopía de barrido de las DSCMs | 165 |
| 4.11.3. | Caracterización proteica de las DSCMs | 168 |
| 4.12. | SIEMBRA, PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD DE LAS MSCs DE CABALLO SOBRE LAS DSCMs..... | 170 |

| | |
|---|-----|
| 4.12.1. Eficiencia de la adhesión celular..... | 170 |
| 4.12.2. Análisis del área celular utilizada sobre las DSCMs..... | 171 |
| 4.12.3. Proliferación celular | 172 |
| 4.12.4. Viabilidad celular | 173 |
| 4.13. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE CONDROGÉNESIS EN LAS MSCs CRECIENDO SOBRE DSCMs..... | 175 |
| 4.14. ANÁLISIS DE LA OSTEOGÉNESIS SOBRE LAS DSCMs..... | 176 |
| 4.15. PERFIL INMUNOMODULADOR DE LAS MSCs DE CABALLO. | 178 |
| 4.15.1. Evolución de la expresión de los marcadores de superficie de MSCs de caballo en presencia de TNF | 178 |
| 4.15.2. Evolución de la multipotencialidad de MSCs de caballo en presencia de TNF | 178 |
| 4.15.3. Expresión de los genes iNOS, IL-6, TGF- β 1 y COX-2 de MSCs de caballo en presencia de TNF..... | 180 |
| 4.15.4. Cuantificación de PGE ₂ y de óxido nítrico por las MSCs de caballo en presencia de TNF..... | 180 |
| 4.16. CO-CULTIVOS DE CÉLULAS DE CABALLO..... | 181 |
| 4.16.1. Proliferación celular en co-cultivos..... | 181 |
| 4.16.2. Expresión génica | 184 |
| 4.16.3. Producción de PGE ₂ | 185 |
| 4.16.4. Concentración de óxido nítrico (NO) | 186 |
| 4.17. ADICIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS EN CULTIVOS DE CONDROCITOS DE CABALLO..... | 187 |
| 4.17.1. Expresión génica | 187 |
| 4.17.2. Producción de PGE ₂ | 190 |
| 4.17.3. Concentración de óxido nítrico (NO) | 190 |
| 4.18. EFECTO INMUNOMODULADOR DEL CONDROITÍN SULFATO SOBRE CO-CULTIVOS HUMANOS | 191 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.18.1. | Proliferación celular en co-cultivos..... | 191 |
| 4.18.2. | Expresión génica | 193 |
| 4.18.3. | Evolución de expresión de genes específicos de condrogénesis | 195 |
| 4.18.4. | Cuantificación de PGE ₂ | 196 |
| 5. | DISCUSIÓN | 199 |
| 5.1. | OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES Y CONDROCITOS DE CABALLO Y DE HUMANO | 202 |
| 5.2. | CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs..... | 204 |
| 5.3. | ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN EN LAS MSCs DE CABALLO | 206 |
| 5.4. | AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE MSCs GFP ⁺ DE CABALLO..... | 208 |
| 5.5. | CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MSCs Y MSCs GFP ⁺ DE CABALLO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)..... | 210 |
| 5.6. | MATRICES EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSCs DE CABALLO (DSCMs)..... | 212 |
| 5.7. | PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS MSCs DE CABALLO... | 220 |
| 5.8. | PAPEL INMUNOMODULADOR DEL CONDROITÍN SULFATO Y LAS ASCs DE HUMANO | 224 |
| 6. | CONCLUSIONES | 231 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA..... | 239 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del efecto de las citoquinas pro-inflamatorias en el cartílago articular.

Figura 2: Esquema de las citoquinas y factores que intervienen en la etiopatogenia de la OA y la AR.

Figura 3: Breve esquema del proceso de ingeniería de tejido cartilaginoso aplicado tanto en humanos como en animales.

Figura 4: Tipos de células troncales y su potencial de diferenciación.

Figura 5: Esquema del efecto del condroitín sulfato en la inhibición de las rutas metabólicas pro-inflamatorias en el cartílago articular.

Figura 6: Esquema del proceso de producción y aislamiento de las matrices extracelulares derivadas de MSCs (DSCMs) de caballo.

Figura 7: Morfología de las MSCs de caballo en pase 0, tras 5 días de proliferación celular y curva de crecimiento de MSCs de caballo en pase 0 en función de los días.

Figura 8: Morfología de los condrocitos de caballo en pase 0, en el segundo día tras la siembra y tras 5 días de proliferación celular y curva de crecimiento de condrocitos de caballo en pase 0, en función de los días.

Figura 9: Análisis de los marcadores de superficie específicos CD73, CD90 y CD105 en ASCs y BMSCs de caballo, por medio de citometría de flujo y microscopía confocal.

Figura 10: Análisis histológico e inmunofluorescencia de las diferenciaciones de MSCs de caballo.

Figura 11: Morfología de MSCs de humano en pase 0, en el segundo día de cultivo y tras 6 días de cultivo y curva de crecimiento de MSCs de humano en pase 0, en función de los días.

Figura 12: Morfología de los condrocitos de humano en pase 0, en el segundo día de cultivo y tras 6 días de proliferación celular y curva de crecimiento de los condrocitos de humano en pase 0, en función de los días.

Figura 13: Análisis de los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 en las ASCs de humano.

Figura 14: Análisis histológico e inmunofluorescencia de las diferenciaciones de las ASCs de humano.

Figura 15: Eficiencia de transfección y citotoxicidad en las ASCs y BMSCs de caballo utilizando los productos transfectantes Lipofectamine 2.000[®] y SAFEctin[®].

Figura 16: Evolución de la expresión de GFP, cuantificado por citometría de flujo en ASCs y BMSCs de caballo.

Figura 17: Análisis de los marcadores de superficie CD90 y CD105 en las ASCs, ASCs GFP⁺, BMSCs y BMSCs GFP⁺ de caballo.

Figura 18: Análisis de la multipotencialidad de ASCs y ASCs GFP⁺ por medio de tinciones histológicas y análisis de la fluorescencia.

Figura 19: Análisis de la multipotencialidad de BMSCs y BMSCs GFP⁺ por medio de tinciones histológicas y análisis de la fluorescencia.

Figura 20: Imágenes del microscopio electrónico de transmisión de las MSCs y MSCs GFP⁺ a bajos aumentos (6.000x).

Figura 21: Imágenes del microscopio electrónico de transmisión de las MSCs y MSCs GFP⁺ a 15.000x.

Figura 22: Imágenes del microscopio electrónico de transmisión de las MSCs y MSCs GFP⁺ a 25.000x.

Figura 23: Imagen macroscópica de las DSCMs derivadas de medio ascórbico y medio condrogénico producidas por MSCs de caballo teñidas con azul alcian.

Figura 24: Caracterización de las DSCMs producidas por ASCs y BMSCs de caballo con microscopía electrónica de barrido.

Figura 25: Análisis proteico por SDS-Page de las DSCMs.

Figura 26: Análisis de la presencia en las distintas DSCMs de colágeno tipo I, colágeno tipo II, fibronectina, agregano y ácido hialurónico por inmunofluorescencia.

Figura 27: Cuantificación del ratio de eficiencia de adhesión celular de las MSCs, sembradas sobre las DSCMs y análisis del área de siembra utilizada por las MSCs sembradas sobre DSCMs.

Figura 28: Proliferación celular y cuantificación de la viabilidad de ASCs y BMSCs creciendo sobre las DSCMs.

Figura 29: Cuantificación de la expresión de los genes de condrogénesis colágeno tipo II (COL2A1) y agregano (ACAN) por medio de PCR a tiempo real en ASCs y BMSCs sembradas sobre las DSCMs.

Figura 30: Análisis histológico de la osteogénesis de las ASCs y de las BMSCs por medio de tinción con rojo alizarín y cuantificación de la mineralización.

Figura 31: Inmunofenotipo de CD90 y CD105 de las MSCs de caballo, incubadas durante 12 horas con TNF y comparadas con su control, y evolución de la multipotencialidad de las MSCs de caballo estimuladas con TNF.

Figura 32: Análisis de la expresión relativa de los genes iNOS, IL-6, TGF- β 1 y COX-2, de la cuantificación de PGE₂ por medio de ELISA y la producción de óxido nítrico en las MSCs de caballo estimuladas con TNF durante 12 horas.

Figura 33: Análisis de la proliferación de los condrocitos y las ASCs y BMSCs a las 24, 36 y 48 horas de cultivo con y sin TNF.

Figura 34: Análisis de la expresión relativa de los genes iNOS, IL-6, COX-2, TGF- β 1, COL2A1 y ACAN en condrocitos de caballo y en condiciones de co-cultivo con ASCs y BMSCs.

Figura 35: Concentración de PGE₂ y de óxido nítrico secretada al medio de cultivo por condrocitos de caballo y co-cultivos de ASCs y BMSCs con condrocitos de caballo con y sin TNF.

Figura 36: Análisis de la expresión relativa de los genes iNOS, IL-6, COX-2, TGF- β 1, COL2A1 y ACAN en condrocitos de caballo, creciendo con los medios condicionados procedente de ASCs y BMSCs de caballo.

Figura 37: Concentración de PGE₂ y de óxido nítrico secretada al medio de cultivo por condrocitos de caballo, creciendo con los medios condicionados procedente de ASCs y BMSCs de caballo.

Figura 38: Análisis de la proliferación de los condrocitos y las ASCs de humano, a las 24 y 36 horas en cultivo con y sin TNF y tras añadir CS a las 24 horas al medio de cultivo.

Figura 39: Análisis de la expresión relativa de los genes IL-6, iNOS, MMP-13,IDO-1, TNF y TGF- β 1 en condrocitos de humano, ASCs y co-cultivos de condrocitos y ASCs estimulados con TNF a los que se les adicionó condroitín sulfato.

Figura 40: Análisis de la expresión relativa de los genes específicos de condrogénesis SOX-9, ACAN y COL2A1 en condrocitos de humano,

ASCs y co-cultivos de condrocitos y ASCs estimulados con TNF a los que se les adicionó condroitín sulfato.

Figura 41: Concentración de PGE₂ secretada al medio de cultivo por condrocitos, ASCs y co-cultivo de condrocitos y ASCs de humano estimulados con TNF a los que se les añadió condroitín sulfato.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentraciones de condroitín sulfato utilizadas para realizar la recta patrón de cuantificación de los glicosaminoglicanos, por medio del análisis colorimétrico a 600 nm.

Tabla 2: Indica el medio de cultivo añadido con los diferentes ratios y tiempos empleados para la transfección, con los dos productos lipotransfectantes.

Tabla 3: Concentraciones de albúmina sérica bovina utilizada para realizar la recta patrón del método de cuantificación proteica de Bradford.

Tabla 4: Ensayos realizados con monocultivos y co-cultivos de condrocitos y MSCs de caballo.

Tabla 5: Ensayos realizados con monocultivos y co-cultivos de condrocitos y MSCs de humano.

Tabla 6: Ensayos realizados con medios condicionados de MSCs de caballo en condrocitos de caballo.

Tabla 7: Secuencia de los *primers* diseñados para caballo y la referencia del mRNA.

Tabla 8: Secuencia de los *primers* diseñados para humano y la referencia del mRNA.

Tabla 9: Concentraciones utilizadas para realizar la recta patrón con el fin de cuantificar la concentración de óxido nítrico producido tras la inflamación.

Tabla 10: Esquema detallado de los ensayos realizados en la presente tesis doctoral con las especies animales, las células utilizadas y los ensayos realizados.

RESUMEN

Actualmente, el envejecimiento de la población conlleva un aumento de enfermedades articulares degenerativas. Estas enfermedades tienen una elevada incidencia en la población mundial, e implican cambios degenerativos en las articulaciones provocando disminución de su funcionalidad, dolor e incluso una discapacidad significativa, causando numerosas pérdidas económicas al sistema sanitario.

La osteoartritis es una enfermedad causada por el deterioro de la articulación que suele aparecer en edades avanzadas de un individuo consecuencia, principalmente, del sobrepeso, envejecimiento articular, lesiones articulares, defectos genéticos de las articulaciones y el sobreesfuerzo a nivel articular. Por el contrario, la artritis reumatoide es una enfermedad crónica autoinmune, sistémica e inflamatoria que conduce a la destrucción del tejido articular y a la incapacidad funcional del mismo.

La ingeniería de tejidos tiene como objetivo desarrollar técnicas que puedan restaurar, mantener y mejorar la función de un determinado tejido dañado. Esta rama de la bioingeniería se centra en la combinación de células y biomateriales con el fin de mejorar o reemplazar funciones biológicas de un tejido dañado. En los últimos años, las investigaciones centran sus estudios en el uso de células troncales mesenquimales como línea celular para la ingeniería de tejidos, debido a que presentan una alta supervivencia *in vitro*, son autorrenovables y poseen la capacidad de diferenciarse hacia uno o más tipos celulares distintos. Además de estas características, recientes estudios, sugieren que las células troncales mesenquimales presentan un papel inmunomodulador importante, reduciendo la inflamación provocada en las enfermedades osteoarticulares.

En este trabajo, obtuvimos células troncales mesenquimales tanto de caballo (procedentes de tejido adiposo y de médula ósea) como de humano (procedentes de tejido adiposo). Una vez obtenidas, se caracterizaron para poder confirmar que se trataba de células troncales mesenquimales. Todas ellas fueron positivas para los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 y evidenciamos su multipotencialidad hacia adipocitos, condrocitos y osteocitos.

Posteriormente, desarrollamos distintas técnicas con el fin de evaluar su capacidad en la regeneración del cartílago y su papel inmunomodulador en enfermedades que afectan a la integridad de la articulación, como la osteoartrosis o la artritis reumatoide. Tanto las células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo, como de médula ósea de caballo, fueron transfectadas con Lipofectamine 2.000[®] y SAFEctin[®] con el fin de obtener una población de células transfectadas de forma estable, que tuviesen las mismas características que las células troncales mesenquimales.

El uso de biomateriales comerciales puede generar problemas de rechazo debido a la procedencia de los mismos, por lo que se han utilizado profusamente biomateriales naturales obtenidos de matrices extracelulares de tejidos descelularizados. Las últimas investigaciones centran sus estudios en la producción de matrices extracelulares producidas por las propias células troncales mesenquimales. La ventaja de estas matrices frente a las procedentes de tejidos, es la posibilidad de adaptarlas a las necesidades de cada objetivo, seleccionar el tipo celular que más nos conviene y el mejor sistema de cultivo para su obtención. Estas matrices constituyen una red compleja, compuesta de muchas moléculas diferentes como colágenos, fibronectina y proteoglicanos. Se ha demostrado que son capaces de inducir la diferenciación de las células troncales mesenquimales y se consideran, por lo tanto, un atractivo candidato como biomaterial que sea capaz de inducir la diferenciación de los

tejidos donde son implantados. Para obtener las matrices en este trabajo, utilizamos medio ascórbico y medio condrogénico y células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo y médula ósea. Comparamos la bioactividad que tenían los diferentes tipos de matrices sobre ambos tipos de células troncales mesenquimales. Las matrices obtenidas con medio condrogénico eran más compactas y fáciles de manejar y, en general, la proliferación y adhesión fue mayor en ellas. En cuanto a la capacidad de diferenciación hacia tejido cartilaginoso o hueso, los resultados obtenidos fueron muy variables y dependían más del tipo celular con el que se había producido la matriz y el tiempo en cultivo que del medio utilizado para su producción.

Por otra parte, analizamos el papel inmunomodulador de las MSCs de caballo y de humano. Para ello utilizamos co-cultivos de células troncales mesenquimales y condrocitos inflamados, así como la adición de medios condicionados obtenidos de células troncales mesenquimales a cultivos de condrocitos inflamados. Además, en el estudio realizado con células de humano, evaluamos el efecto antiinflamatorio que tenía el condroitín sulfato sobre la reducción de la inflamación en las enfermedades osteoarticulares, y analizamos si existía algún efecto positivo cuando se combinaba con células troncales mesenquimales. En todos los casos, constatamos que la expresión de genes relacionados con la inflamación, se veía significativamente reducida cuando los condrocitos eran co-cultivados con células troncales mesenquimales, o bien se les adicionaba medios condicionados y/o condroitín sulfato.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el futuro prometedor, y todo el potencial que presentan las células troncales mesenquimales en la regeneración del tejido cartilaginoso y en la reducción de los efectos inflamatorios desarrollados en las enfermedades osteoarticulares.

SUMMARY

Nowadays ageing in population has led to an increase in degenerative joint diseases. These diseases have a wide prevalence on world population and, as a result, they have a great economic impact. They cause degenerative changes in the joint thus causing functional loss, pain and even significant disabilities. They also cause economic strains on public health systems.

Osteoarthritis is a disease characterized by articular damage, which usually occurs in elderly people and principally due to overweight, joint ageing, articular injuries, joint genetic defects and overexertion of the joint. Rheumatoid arthritis is, however, an autoimmune, systemic and inflammatory chronic disease which causes articular tissue damage and functional joint disability.

Tissue engineering aims at developing techniques which could restore, maintain and improve a specific tissue function for injuries. This bioengineering handwork focuses on cell-scaffold combinations so as to improve or replace the biological functions of injured tissues. Nowadays mesenchymal stromal cells as tissue engineering cell line are being focused on as they have a high in vitro survival rate and a greater self-renewal capacity as well as having multi-lineage potential. Apart from these characteristics, mesenchymal stromal cells have been suggested as having immunomodulation effects which reduce osteoarticular disease inflammation.

Equine (from adipose tissue and bone marrow) and human (from adipose tissue) mesenchymal stromal cells were obtained for this study. They were then characterized to support the mesenchymal stromal cell profile. They were positive to CD73, CD90 and CD105 surface markers and showed tri-lineage differentiation towards adipocytes, chondrocytes and osteocytes.

Different techniques were then developed so as to evaluate cartilage regenerative potential and osteoarticular disease immunomodulation profile of the mesenchymal stromal cells. Both equine adipose-derived mesenchymal stromal cells and equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells were transfected with Lipofectamine 2,000[®] and SAFEctin[®] in order to obtain a stable transfected cell population which had the same characteristics as mesenchymal stromal cells.

Commercial scaffolds could cause rejection problems depending on the source of the scaffold. Thus, decellularized tissue matrices are increasingly being used as natural scaffolds. Present studies focus on decellularized cell derived matrices produced from mesenchymal stromal cells. The advantage of using these matrices as opposed to tissue matrices is that it is possible to adapt them to the needs of each target and to choose the cell type using the best culture system to obtain them. These matrices make up a complex network of different molecules such as collagen, fibronectin and proteoglycans. They are capable of differentiating mesenchymal stromal cells and they are considered to be a good natural scaffold candidate to regenerate injured tissues. In order to obtain matrices for this study, ascorbic and chondrogenic media and equine mesenchymal stromal cells were used. Matrix bioactivity on both mesenchymal stromal cell types was compared. Chondrogenic derived-matrices were more compact and easier to handle. Cell proliferation and adhesion were generally better on chondrogenic derived-matrices. With regard to differentiation capacity towards cartilage and bone, the results obtained were very variable and depended on the cell type used and culture time involved but not the media derived matrices.

Immunomodulation properties from equine and human mesenchymal stromal cells were analyzed. For this purpose,

mesenchymal stromal cells and chondrocytes co-cultures and mesenchymal stromal cells-derived conditioned media on inflamed chondrocytes cultures were used. In human assays, the anti-inflammatory effect which chondroitin sulfate has on osteoarticular diseases was analyzed in combination with the mesenchymal stromal cells anti-inflammatory effect. Inflammatory gene expressions were reduced in chondrocytes under co-culture, conditioned media and chondroitin sulfate conditions.

The results obtained show a promising and potential for cartilage tissue regeneration and immunomodulation effect on osteoarticular mesenchymal stromal cell diseases.

ABREVIATURAS

Nota

A lo largo del texto se utilizarán las abreviaturas de los términos en inglés debido al uso extendido de dicha lengua en publicaciones científicas y al uso de abreviaturas de manera cotidiana en el lenguaje científico. Muchos de los acrónimos en inglés son de uso general en ciencia, por lo que para simplificar el texto se mantendrán las abreviaturas en inglés.

ACAN: agrecano

ASC: célula troncal mesenquimal derivada de tejido adiposo

BMP: proteína morfológica ósea

BMSC: célula troncal mesenquimal derivada de médula ósea

CD: *cluster* de diferenciación

COL2A1: colágeno tipo II

COX: ciclooxigenasa

CS: condroitín sulfato

DCM: matriz extracelular descelularizada procedente de células

DMARD: medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad

DSCM: matriz extracelular descelularizada procedente de células troncales mesenquimales

ECM: matriz extracelular

EMF: fragmento extracelular liberado

ESC: célula troncal embrionaria

GFP: proteína verde fluorescente

HCl: ácido clorhídrico

HLA: antígeno leucocitario humano

HMGB-1: proteína del grupo de alta movilidad Box 1

IFN: interferón

IL: interleucina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

iPSC: célula troncal pluripotente inducida

IV: intravenosa

Klf-4: Kluppel Like Factor 4

MMP: metaloproteasa

mPGES-1: PGE sintasa 1 microsomal

MSC: célula troncal mesenquimal

Myc: Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar

Nanog: gen homeodominio tipo NK-2

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NGS: suero normal de cabra

NO: óxido nítrico

NSAID: agentes anti-inflamatorios no esteroideos

OA: osteoartritis

Oct-4: Factor de unión al octámero de transcripción 4

PGE₂: prostaglandina E₂

PLA: fosfolipasa

PTR: artroplastia de rodilla

RA: artritis reumatoide

RFP: proteína roja fluorescente

ROS: especie reactiva de oxígeno

SOX: Región Y determinante del sexo

sPLA: fosfolipasa soluble A

SVF: fracción estromal vascular

SYSADOA: medicamento sintomático de acción lenta para osteoartritis

TE: tris-EDTA

TGF: factor de crecimiento tumoral

TIMP: inhibidor tisular de MMP

TNF: factor de necrosis tumoral

TNFRSF: receptor TNF

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

YFP: proteína amarilla fluorescente

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES OSTEOARTICULARES

El envejecimiento de la población actualmente conlleva un aumento de enfermedades articulares degenerativas. Estas enfermedades tienen una elevada incidencia en la población mundial e implican cambios degenerativos en las articulaciones provocando disminución de la funcionalidad en las mismas, dolor, e incluso una discapacidad significativa, causando numerosas pérdidas económicas al sistema sanitario [1].

Dentro del grupo de enfermedades osteoarticulares se encuentran todas las patologías que involucran el deterioro y pérdida de la función, tanto del sistema óseo como del sistema articular, provocando la alteración de la estructura interna y adyacente del cartílago o de los tejidos blandos periarticulares [2].

Existen un gran número de enfermedades osteoarticulares descritas, pero las más prevalentes y debilitantes son la osteoartritis y la artritis reumatoide, afectando tanto a humanos [3] como a caballos [4].

1.1.1. Osteoartritis

La osteoartritis es una enfermedad causada por el deterioro de la articulación que suele aparecer en edades avanzadas de un individuo como consecuencia, principalmente, del sobrepeso, envejecimiento articular, lesiones articulares, defectos genéticos de las articulaciones y el sobreesfuerzo a nivel articular. Esta enfermedad no se produce por igual en todas las articulaciones del individuo, si no que están más dañadas aquellas que han sido sometidas a mayor esfuerzo [5].

La osteoartritis causa la destrucción de la articulación provocando la degeneración del cartílago que la forma y produce cambios en el hueso subcondral y en la membrana sinovial. Todas estas

alteraciones causan daño en el hueso subyacente, dando lugar a cambios morfológicos tales como esclerosis subcondral, quistes óseos subcondrales, formación de osteofitos y sinovitis [6].

El tejido más afectado por esta enfermedad es el cartílago hialino, en el cual se alteran las interacciones célula-matriz destruyendo la integridad tisular [7]. Sin embargo, todavía no está muy clara la patogenia de la osteoartritis, aunque se cree que la producción crónica de diferentes mediadores por el tejido articular contribuye a la degradación progresiva del tejido.

En la actualidad, la inflamación está considerada como el factor fundamental que produce el desarrollo y la progresión de la OA en los primeros estadios de la enfermedad [8]. Estudios recientes demuestran que la secreción de factores de inflamación, como citoquinas pro-inflamatorias, son mediadores críticos del metabolismo alterado y aumentan el catabolismo de la matriz extracelular [9]. Estas citoquinas llevan a cabo la destrucción del cartílago a través de una sobreexpresión de genes inflamatorios y reguladores catabólicos, y una disminución en la expresión de genes antiinflamatorios o anabólicos en los condrocitos articulares [10]. En particular, la interleucina 1 (IL-1) reduce la expresión de colágeno tipo II (COL2A1) [11] y aumenta la producción de metaloproteasas (MMPs) [12,13], prostaglandina E2 (PGE₂), citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (NO) [14,15].

En los condrocitos articulares, el aumento de la expresión de las MMPs está acompañado de un aumento en la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales promueven la expresión de otras MMPs, agreganasas, intermediarios de especies reactivas de oxígeno y mediadores inflamatorios lipoderivados [16]. Estas sustancias hacen

aumentar la actividad catabólica de los condrocitos causando la destrucción de la matriz extracelular [17].

Por otra parte, los fragmentos de matriz extracelular liberados (EMFs), IL-1 y TNF estimulan la actividad de los macrófagos, mastocitos y sinoviocitos en el fluido sinovial produciendo sinovitis. Como resultado, las células sinoviales producirán una expresión adicional de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, TNF y MMPs contribuyendo a aumentar la degradación de la matriz cartilaginosa (Fig. 1) [18,19].

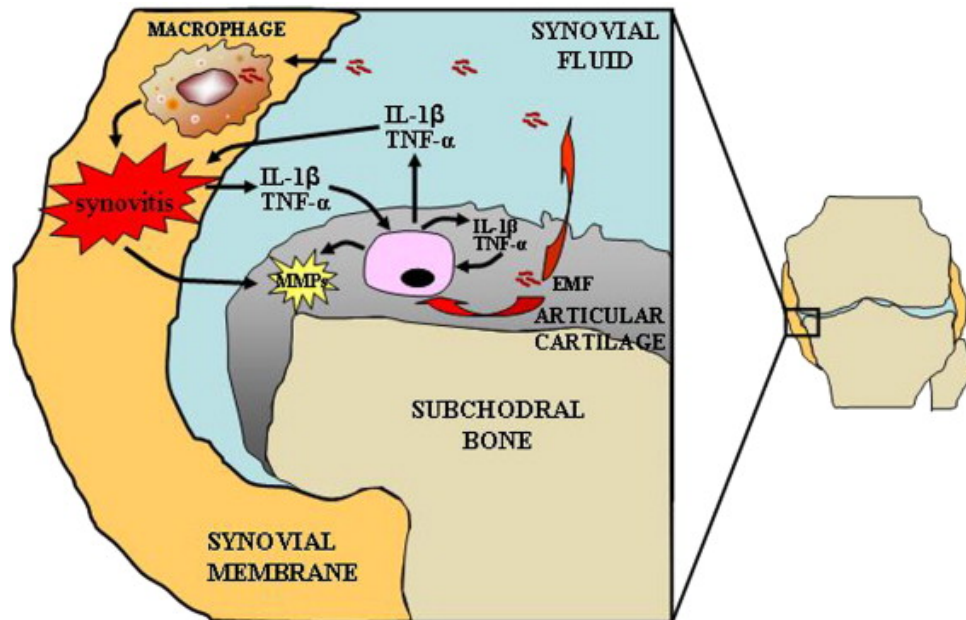


Figura 1: Esquema del efecto de las citoquinas pro-inflamatorias en el cartilago articular y su papel en la activación de las células sinoviales. Figura obtenida de [20].

1.1.2. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad crónica, sistémica e inflamatoria que conduce a la destrucción del tejido articular y a la incapacidad funcional del mismo. Esta enfermedad está causada por una respuesta autoinmune, producida por los anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados y por los factores reumatoides [21].

Puede aparecer en cualquier estadio de edad de un individuo, producido tanto por factores genéticos como por causas desconocidas, aunque su presentación suele ser mayor en mujeres que en hombres.

En este proceso patológico juega un papel importante la membrana sinovial hiperplásica de la articulación sinovial, la cual invade el cartílago articular y el hueso subyacente. Los condrocitos intentan, en un primer momento, reparar la alteración producida sobre el cartílago, aumentando la síntesis de colágeno y proteoglicanos. Este proceso no se produce de manera óptima y, como consecuencia, tiene lugar la síntesis de proteinasas (MMPs), al tiempo que se reduce la síntesis de sus inhibidores (TIMPs). De esta forma, la destrucción del cartílago, da lugar a la liberación de pequeños fragmentos de matriz extracelular (EMFs) que alcanzan el líquido sinovial. Los sinoviocitos fagocitan estos fragmentos de matriz extracelular y producen citoquinas pro-inflamatorias (tales como IL-1 y TNF) y otros productos pro-inflamatorios que intensifican la degradación del cartílago [20].

Durante este proceso, una gran variedad de mediadores pro-inflamatorios secretados por los sinoviocitos hacen que las células inflamatorias, entre ellas los basófilos [22], sean reclutados en el líquido sinovial. Varios de estos compuestos son: IL-17A, TNF, IL-1, IL-6, IL-18, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IL-33, HMGB1 y otras quimioquinas [23]. El efecto de otras citoquinas hace que las células inmunitarias sean retenidas en la membrana sinovial, inhibiendo su apoptosis y activando mecanismos de inmunidad innata. Otros factores activan la proliferación y destrucción de la membrana sinovial, aumentando el proceso inflamatorio y dando lugar a un proceso crónico que conduce a la destrucción y remodelación de los tejidos que forman la articulación [24].

1.1.3. Citoquinas y factores que intervienen en la etiopatogenia de la OA y AR

La principal función de los condrocitos en el tejido cartilaginoso es la producción de matriz extracelular. El balance entre anabolismo y catabolismo de la matriz del cartílago está regulado por los condrocitos, activados por señales o factores externos. Las principales moléculas catabólicas son las citoquinas inflamatorias y las proteasas, las cuales participan en la degradación de la matriz condrogénica. Por el contrario, los agentes anabólicos, entre los que se encuentran los factores de crecimiento, contribuyen al mantenimiento y a la producción de nueva matriz extracelular condrogénica [25].

Una de las moléculas que desempeña un papel importante en el desarrollo de la inflamación y patogenia de la RA y de la OA es la citoquina pro-inflamatoria TNF. Esta citoquina pertenece a una familia de péptidos implicados en la respuesta inmune y en la muerte celular programada. Tanto en los pacientes con RA como en los pacientes con OA, los niveles de TNF están significativamente elevados en sangre y, especialmente, en las articulaciones sinoviales [26].

Las funciones del TNF están mediadas por dos receptores celulares distintos, TNFRSF1A y TNFRSF1B, localizándose tanto de forma soluble como sobre las membranas celulares [27]. El efecto del TNF sobre las células desencadena la activación de la síntesis de otras citoquinas pro-inflamatorias, de moléculas de adhesión y la activación de los neutrófilos. El TNF es también un co-estimulador de la activación de las células T y de la producción de anticuerpos por las células B [28].

Otra citoquina que tiene un papel importante en la inflamación en la RA y OA es la IL-1, siendo, junto con el TNF, los dos mediadores

pro-inflamatorios principales que inducen la síntesis de otras citoquinas y sustancias inflamatorias en las enfermedades osteoarticulares. La IL-1 presenta tres isoformas: IL-1 α , IL-1 β (formas pro-inflamatorias) y una proteína antiinflamatoria relacionada, IL-1RA, la cual se une a los receptores de IL-1 α e IL-1 β , bloqueando su acción pro-inflamatoria. El efecto de la IL-1 sobre los condrocitos es inducir la supresión de la síntesis de la matriz extracelular y la liberación de agreganastas activas, enzima dominante responsable de la pérdida de proteoglicanos de la matriz extracelular [29]. Su efecto también altera la expresión de colágeno tipo II reduciéndola, mientras que induce la expresión de otros tipos de colágeno como el de tipo I y III [30,31].

La IL-6 es otra citoquina producida por los condrocitos tras ser inducidos por la IL-1 β y el TNF. Su efecto, junto con el de la IL-1 β hace que el potencial catabólico de los condrocitos aumente [32,33]. En estudios recientes se ha relacionado la IL-6 como inductor de la expresión del receptor transmembrana Notch en condrocitos, señal que hace que se inhiba la expresión de agregano pero que aumente la de MMP-13 [34]. Otros estudios sugieren que la IL-6, en algunos casos, presenta propiedades pro-inflamatorias y en otras anti-inflamatorias, por lo que su efecto sobre los condrocitos no está muy claro [35].

Los componentes de la matriz extracelular del cartílago son degradados, en enfermedades osteoarticulares, por medio de las proteasas. Dentro de este grupo, las más importantes y que generan un efecto más destructor son las metaloproteasas (MMPs) [36]. La IL-1 sintetizada por los condrocitos en respuesta a un estímulo inflamatorio, es capaz de inducir la expresión de las MMPs y otros catabolitos. Los catabolitos que ejercen mayor degradación en el cartílago afectado son el TNF, MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13 y los

fragmentos de colágeno tipo II degradado (EMFs) [37]. Las MMP-1, MMP-3, MMP-13 junto con la IL-6, son las principales sustancias que se detectan en el fluido sinovial en articulaciones osteoarthriticas, sin embargo, en pacientes afectados de AR, los niveles de estas MMPs son bajos [38].

Junto con la síntesis de MMPs y otras proteinasas por los condrocitos, la IL-1 y TNF también aumentan la síntesis de PGE₂, debido a la actividad de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), PGE sintasa-1 microsomal (mPGES-1) y la fosfolipasa soluble A2 (sPLA2). Ésto conlleva la sobreexpresión de óxido nítrico por medio de la vía de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [39,40].

El efecto del factor de crecimiento transformante (TGF- β) en el fenotipo de los condrocitos presenta resultados contradictorios. Por una parte, se ha demostrado que el TGF- β es capaz de inducir la expresión de colágeno tipo II [41], sin embargo, otro estudio indica que es capaz de inhibir la expresión de colágeno tipo II y de proteoglicanos [42]. Además, la acción del TGF- β en la síntesis de matriz condrogénica está relacionada con la especie animal de estudio. En ratones, el efecto de TGF- β induce la expresión de matriz [43], mientras que en humano el efecto es antagónico, reduciendo la expresión de COL2A1 y ACAN [44].

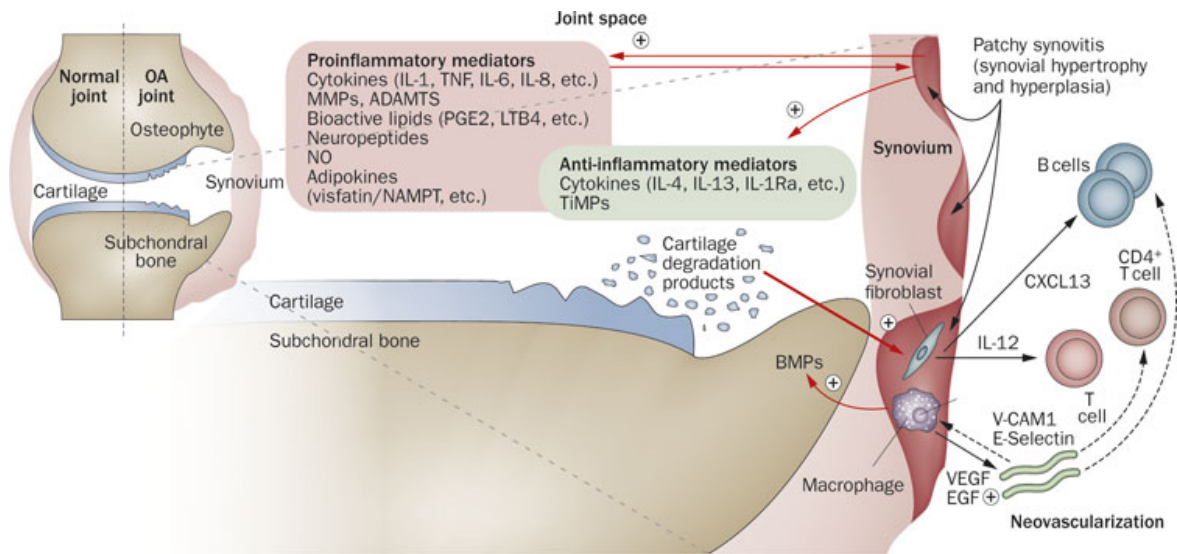


Figura 2: Esquema de las citoquinas y factores que intervienen en la etiopatogénesis de la OA y la AR. Figura obtenida de [45].

1.2. INGENIERÍA DE TEJIDOS APLICADA AL CARTÍLAGO ARTICULAR

1.2.1. Ingeniería de tejidos

Antes de definir el concepto de ingeniería de tejidos es preciso matizar la diferencia existente entre reparación y regeneración tisular.

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 biológica. Al no recuperar su estado original, sus propiedades mecánicas y físicas son inferiores, esto es una transformación que ocurre espontáneamente y el resultado final es la cicatrización [46]. Entendemos por regeneración al proceso que hace que el tejido posea las propiedades idénticas al tejido original, así como su funcionalidad. Esta capacidad de regeneración está limitada solo a unos determinados tejidos [47].

La ingeniería de tejidos tiene como objetivo desarrollar técnicas que puedan restaurar, mantener y mejorar la función de un determinado tejido dañado. Esta rama de la bioingeniería se centra

en la combinación de células y biomateriales con el fin de mejorar o reemplazar funciones biológicas de un tejido dañado [47] (Fig.3).

Por lo tanto, el objetivo principal de la ingeniería de tejidos no es reparar un tejido, si no regenerarlo. De este modo, el papel que juegan las células y los biomateriales es muy importante para obtener un tejido regenerado acorde al tejido original.

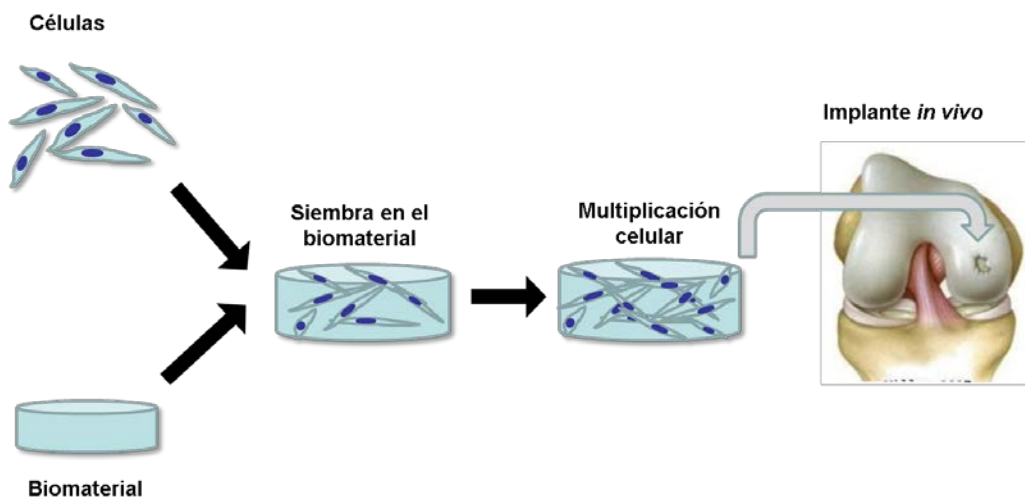


Figura 3: Breve esquema del proceso de ingeniería de tejido cartilaginoso aplicado tanto en humanos como en animales.

1.2.1.1. Células utilizadas en ingeniería del tejido cartilaginoso

1.2.1.1.1. Condrocitos

Los condrocitos maduros y diferenciados fueron la primera elección celular para la regeneración del tejido cartilaginoso, ya que es una población celular nativa del tejido a regenerar y es capaz de sintetizar los componentes de la matriz extracelular cartilaginosa [48]. Esta población celular se aísla de forma sencilla, por medio de la digestión de su matriz extracelular, sin embargo, es difícil obtener un número apropiado de células que puedan regenerar el cartílago completo [49]. El procedimiento de obtención de la muestra implica

la adquisición por medio de una biopsia artroscópica del cartílago femoral sano, área que normalmente no se somete a carga. La población celular resultante del tejido es inyectada al paciente o sembrada sobre matrices tridimensionales [50].

La expansión *in vitro* de los condrocitos se realiza de forma sencilla, pero, a partir de ciertos pases celulares, la capacidad regenerativa de los condrocitos se pierde y cambian a una apariencia fibroblástica, secretando matriz fibrosa en vez de cartilaginosa [51]. Aunque, resultados de varios estudios han demostrado que el cultivo de condrocitos sobre moldes tridimensionales, puede ayudar a mantener el fenotipo condrogénico [52]. Estudios recientes, han demostrado que la implantación de condrocitos autólogos reduce el dolor de enfermedades osteoarticulares y, en muchos casos, retrasa o elimina la necesidad de reemplazar la articulación por una prótesis [53,54].

A pesar de estas evidencias, los resultados de otros trabajos revelaron que el efecto obtenido por la implantación de condrocitos autólogos es bastante similar a los conseguidos después de un tratamiento con injerto osteocondral (mosaicoplastia) [55]. Con las evidencias obtenidas con este tipo celular, podemos concluir que no son los mejores para regenerar el tejido dañado y, por eso, se han buscado fuentes celulares alternativas con las cuales se obtengan resultados más efectivos.

1.2.1.1.2. Células troncales

En la actualidad, las terapias con células troncales están emergiendo con fuerza en el campo de la medicina regenerativa, llegando a ser una solución a posibles patologías degenerativas.

El término de célula troncal o célula madre es el término que se da a las células que presentan una alta supervivencia *in vitro*,

autorrenovables y que poseen la capacidad de diferenciarse hacia uno o más tipos celulares distintos [56]. Las células troncales no son especializadas, esto quiere decir que se pueden multiplicar dando lugar a células indiferenciadas mediante divisiones mitóticas. La capacidad autorrenovadora les permite continuar por la vía de diferenciación para la que están programadas y, de este modo, producir células de uno o varios tejidos adultos, funcionales y plenamente diferenciados, en función de su grado de multipotencialidad. El término de multipotencialidad se refiere a la capacidad de una célula para dar origen a distintos tipos celulares dentro de un mismo tejido o capa embrionaria [57-59].

La mayoría de los tejidos que componen un individuo adulto poseen una población específica de células troncales, que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce un daño tisular [60].

Actualmente, el uso de células troncales es una de las líneas de investigación más utilizadas en ingeniería de tejidos, con un gran impacto a nivel científico, comenzando 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.

Existen diferentes tipos de células troncales que, en función de su origen y potencial de diferenciación, podemos clasificar como: células troncales embrionarias (ESCs) [61], células troncales adultas postnatales o somáticas [61] y células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) [62].

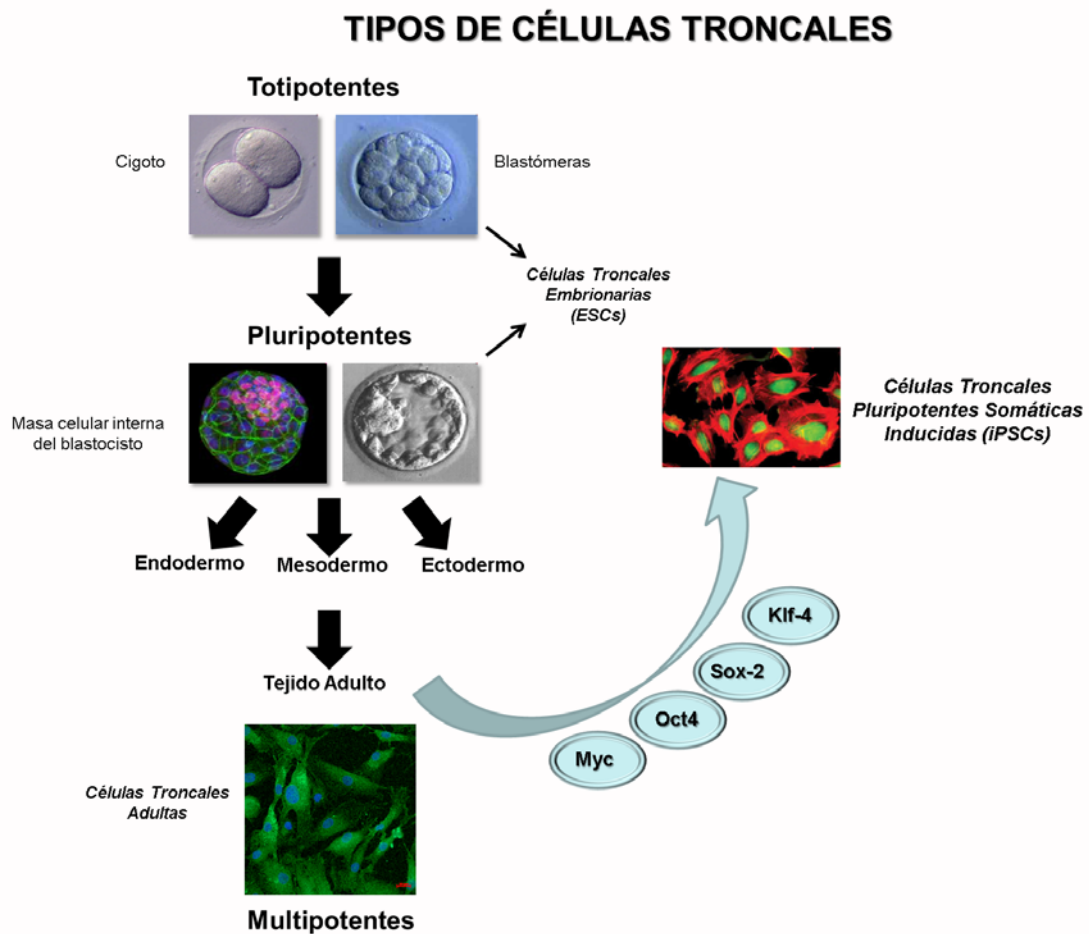


Figura 4: Tipos de células troncales y su potencial de diferenciación. Klf-4, Sox-2, Oct4 y Myc indican los genes introducidos en una célula adulta para dar a lugar a una célula troncal pluripotente somática inducida (iPSC).

1.2.1.1.2.1. Células troncales embrionarias (ESCs)

Estas células se diferencian en dos grupos: totipotentes y pluripotentes. Las ESCs totipotentes, más conocidas como células troncales totipotentes, poseen la capacidad de dar origen a todas las estructuras celulares que forman el individuo completo, incluidas las membranas extraembrionarias. Estas células proceden de un cigoto, embrión unicelular o de sus cuatro primeras blastómeras [56].

Las ESCs pluripotentes son aquellas células que proceden de la masa celular interna de un embrión en los cuatro o cinco primeros días después de la fecundación. En esta etapa, el embrión es conocido como blastocisto y, en uno de sus polos, contiene una

agrupación de células llamada masa celular interna, de donde se obtiene este tipo de ESCs. Estas células tienen el potencial de dar origen a todos los tipos celulares del individuo de las tres capas embrionarias que lo forman (ectodermo, mesodermo y endodermo), pero no de dar lugar a las estructuras que forman las membranas extraembrionarias [63].

Estos tipos celulares poseen como ventaja la inmortalidad y pueden, teóricamente, proporcionar una fuente ilimitada de células, por lo que tienen un interés importante en medicina regenerativa [64]. Sin embargo, pueden producir teratomas o terotocarcinomas en el individuo. Además, al ser de procedencia alogénica, existe un elevado riesgo de rechazo por medio del sistema del complejo mayor de histocompatibilidad [65].

Un factor a tener en cuenta en el uso de estas células en la medicina e investigación moderna es el papel ético y rechazo social que supone, ya que proceden de un embrión en sus primeros días de formación. 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.

Todos estos inconvenientes y dificultades han hecho que la investigación científica, basada en la ingeniería de tejidos, busque nuevas fuentes de células de origen troncal.

1.2.1.1.2.2. Células troncales adultas o postnatales

El término de células troncales adultas se utiliza para definir un tipo de células localizadas en el individuo en el periodo postnatal con potencial multipotente, esto quiere decir, que sólo pueden generar los

tipos celulares derivados de su misma capa embrionaria. Estas células se localizan en la mayoría de los tejidos de un individuo adulto, como función tienen el regenerar y renovar las células dañadas de los tejidos donde se encuentran localizadas [66].

La primera vez que fueron descritas estas células fue en los años 50 y fueron obtenidas del sistema hematopoyético de ratones y cobayas. Se vio que este tipo celular, procedente del estroma medular, poseía la capacidad de adherencia a frascos de cultivo y que al ser tratadas con factores de crecimiento, daban origen a un microambiente hematopoyético [67].

En estudios realizados recientemente se ha descubierto que este tipo celular, en determinadas condiciones, poseen la propiedad de la plasticidad, son capaces de dar lugar a células de distintos linajes [68-70], creando nuevas expectativas de futuro en la medicina regenerativa y en el tratamiento de enfermedades.

Como ventajas principales del uso de estas células podemos destacar la compatibilidad debido a que proceden del mismo individuo, además de la fácil obtención y la consecución de un número elevado de células por multiplicación *in vitro* [71]. Este tipo celular es menos tumorigénico que el procedente de las células embrionarias, pero la capacidad de renovación y multiplicación se reduce con la edad del individuo, limitándose el uso de estas células a tratamientos en individuos con edades no muy avanzadas [71].

1.2.1.1.2.2.1. Células troncales mesenquimales (MSCs)

Dentro del grupo de células troncales adultas se encuentran las células troncales mesenquimales, células que derivan de la capa embrionaria del mesoderma.

En la actualidad, varios grupos de investigación han centrado sus estudios en las células troncales mesenquimales (MSCs) como terapia para la medicina regenerativa debido a que estas células poseen una multipotencialidad y actividad inmunomoduladora importante [72-74]. Este tipo celular es capaz de multiplicarse *in vitro* de forma rápida [66], hasta lograr alcanzar una población adecuada para utilizarse en terapias celulares.

Las MSCs fueron descritas por primera vez por Friedenstein [75], estas mantienen un fenotipo indiferenciado *in vitro* y pueden dar lugar a distintos tipos celulares mesenquimales como osteocitos, condrocitos y adipocitos [76].

Se han identificado diferentes fuentes de MSCs en tejidos específicos tales como: membrana sinovial [77], músculo esquelético [66,78], médula ósea [76], sangre del cordón umbilical [73], líquido amniótico [79], tejido hematopoyético [67], tejido neural [80], epidermis [81], músculo cardíaco [82], páncreas [83], intestino [84], hígado [85], córnea [86], placenta [87] o tejido adiposo [88]. La función biológica que posee este tipo celular, al encontrarse en numerosos órganos y tejidos, es el de participar en la renovación celular de estos tejidos cuando son dañados.

La sociedad internacional para terapia celular define las *Multipotent Mesenchymal Stromal Cells* (MSCs) [89] como la denominación correcta para las células adherentes al plástico aisladas de médula ósea y otros tejidos. Estas células, en primer lugar, deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar. En segundo lugar, el 95% o más de la población de MSCs deben de ser positivas a los marcadores de superficie celular CD105, CD73 y CD90 analizados mediante citometría de flujo. Adicionalmente, estas células no deben expresar (porcentaje igual o

inferior al 2%) los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD31, CD43, CD56, CD68, CD79a o CD19 y HLA clase II. Y en tercer lugar, estas células deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones de diferenciación *in vitro* estándar [90].

No sólo estos marcadores de superficie están considerados como específicos en este tipo celular. Recientemente, Buhning y col. [91] describen un nuevo patrón de marcadores de superficie positivos para las MSCs en los que incluyen CD140b, CD340 y CD349 en conjunto con CD217.

Al igual que hemos descrito en el apartado anterior, este tipo celular también es capaz de diferenciarse hacia otros linajes celulares distintos de los que provienen de su misma capa mesodérmica, considerando la plasticidad celular otra característica más de estas células [92]. Se han descrito estudios donde queda patente el potencial de diferenciación *in vitro* de este tipo celular hacia otras células de su misma capa embrionaria o de otra distinta, como: adipocitos [93], células endoteliales [94], células hematopoyéticas [95], células musculares [96], células neuronales [97], osteoblastos [98], células cardíacas [99] y condrocitos [100].

Actualmente, las MSCs procedentes de médula ósea y de tejido adiposo son los dos tipos de células troncales más comúnmente utilizados en terapia celular para la regeneración de tejidos [101,102]. Las MSCs derivadas del tejido adiposo (ASC) en particular, son consideradas como una alternativa muy prometedora a las células procedentes de médula ósea (BMSC), por su abundante disponibilidad y excelente capacidad de expansión y proliferación [103].

Morfológicamente, las MSCs presentan una forma fusiforme con su núcleo celular localizado en la parte central. Se han descubierto hasta tres tipos distintos de morfología celular en cultivos *in vitro*: unas pequeñas, fusiformes y agranulares (RS-1), otras pequeñas y granulares (RS-2) y otras grandes y granulares (denominadas maduras) [104-106].

Las MSCs aisladas de distintos tejidos muestran similar caracterización fenotípica, pero se encuentran diferencias en sus propiedades de proliferación y potencial de diferenciación en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento [107]. En un estudio realizado con MSCs humanas extraídas de distintos tejidos adultos (médula ósea, periostio, tejido sinovial, músculo esquelético y tejido adiposo), se observó que la diferencia en su proliferación y potencial de diferenciación variaba entre los distintos tipos celulares, obteniendo una mayor capacidad condrogénica en las células procedentes del tejido sinovial, seguida de las procedentes de médula ósea y periostio [108].

Su aislamiento y caracterización fenotípica ha sido descrita en numerosas especies de vertebrados animales, aparte del humano, equino [109], bovino [110], ovino [111], porcino [112], canino [98] y murino [96].

La ventaja principal de las células troncales mesenquimales radica en que su obtención y cultivo no tiene los problemas éticos a los que sí están sometidas las células troncales de origen embrionario. Mientras que las desventajas principales del uso médico de estas células, es la anormalidad genética que presentan cada tipo de células cuando se compara con las células embrionarias y su potencial de regeneración limitado.

1.2.1.1.2.2.2. Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BMSCs)

Aunque este tipo celular fue descubierto por Friedenstein y col. [67] en los años 70, los que caracterizaron esta línea celular fueron Pittenger y col. [76] en los años 90. A partir de su caracterización, los investigadores han centrado sus estudios en este tipo celular como alternativa a otras células adultas o embrionarias en ingeniería de tejidos [113,114]. Por lo tanto, hasta la actualidad, este tipo de células mesenquimales obtenidas de la médula ósea del paciente adulto son las mejor caracterizadas y, en las cuales, se encuentran un mayor número de estudios realizados.

Las BMSCs se extraen principalmente de la cresta iliaca y se aíslan de los otros tipos celulares por medio de un gradiente de densidad por centrifugación, por el cual, se obtiene en torno a un 0,1% de BMSCs de la cantidad celular de partida [115]. Estas células presentan una morfología fibroblástica y la capacidad de adherirse al frasco de cultivo. Tienen una gran capacidad de multiplicación *in vitro* y mantienen, entre pases de multiplicación, su potencial de diferenciación hacia líneas celulares mesenquimales [116].

El principal inconveniente del uso de esta línea celular se centra en su obtención, ya que es un método invasivo y doloroso. También, el número de células obtenido en cada extracción es bajo y se requiere más tiempo para su multiplicación del que es necesario para las ESCs [113].

1.2.1.1.2.2.3. Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs)

En la actualidad, esta línea celular está generando un interés creciente en investigación debido a que se pueden obtener de forma más sencilla y menos dolorosa que las BMSCs y, tras la extracción de

tejido, el número de células que se obtiene es mayor que en las de médula ósea [117].

Cada gramo de tejido adiposo aspirado contiene aproximadamente 5.000 ASCs [118], por lo que, obteniendo una cantidad pequeña de tejido y gracias al alto potencial de proliferación que poseen estas células, el número de células obtenidas en pocos días es alto, pudiendo ser utilizadas en un breve período de tiempo como tratamiento para enfermedades [119,120].

Las ASCs presentan la misma morfología celular, rendimiento, inmunofenotipo, cinética de crecimiento, senescencia celular, capacidad de diferenciación y eficiencia de transducción genética que las BMSCs [114,121,122]. Además presentan un potencial de diferenciación *in vitro* hacia otros tipos celulares como: adipocitos [123], condrocitos [119,124], músculo esquelético y cardíaco [125], osteocitos [126], células neuronales [127] y vasos sanguíneos [128].

Entre las ventajas que poseen las ASCs frente a otro tipo de MSCs es que los depósitos adiposos de donde proceden son accesibles, abundantes y pueden ser repuestos proporcionando un reservorio de MSCs para cada individuo [129].

Estudios recientes han demostrado que las ASCs presentan una baja inmunogenicidad y son capaces de evitar la respuesta inmune [119].

Una de las desventajas del uso de estas células es que, con la edad del individuo se pierde el potencial regenerador, cambios morfológicos y disminución de la proliferación de las células [130]. Esto se convierte, por lo tanto, en un problema para el uso de estas células en medicina regenerativa en individuos de avanzada edad.

1.2.1.1.2.3. Células Troncales Pluripotentes Somáticas Inducidas (iPSCs)

En 2006 los premio Nobel Takahashi y Yamanaka [131], describieron por primera vez las células troncales pluripotentes somáticas inducidas (iPSCs). Este tipo celular presenta características semejantes a las ESCs, pero son producidas a partir de una célula diferenciada adulta. Las iPSCs son obtenidas a partir de una célula somática empleando una serie de factores genéticos de reprogramación. Hay dos métodos para la introducción de factores de reprogramación: sistemas integradores (por medio de retrovirus, lentivirus y lentivirus inducibles) o métodos no integradores (transfección de plásmidos, transgenes, proteínas recombinantes, mRNA sintético y vectores virales no integradores) [132]. Los factores genéticos de reprogramación más utilizados son: Oct4 (Factor de unión al octámero de transcripción 4), Sox2 (Región Y determinante del sexo), Klf4 (Kluppel Like Factor 4) y c-Myc (Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar). A partir de esta alteración genética, otros autores [133-135], han utilizado una combinación de factores genéticos y químicos para conseguir una población celular más acorde a sus estudios.

Las iPSCs se han obtenido a partir de diferentes tipos de células somáticas de un individuo adulto, procedente de la piel, hígado, tracto urinario, células prostáticas y estómago [136].

La morfología celular de esta nueva línea celular creada se asemeja a la de las ESCs y para caracterizarlas se suele analizar la presencia de marcadores de superficie como son SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen 4) y fosfatasa alcalina; además del análisis genético de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Nanog (gen homeodominio tipo NK-2) [137].

Desde su descubrimiento, las iPSCs han sido utilizadas en diferentes estudios, entre los que se encuentran estudios clínicos para modulación de enfermedades [138], para medicina regenerativa [139-142] e incluso para estudios de desarrollo de medicamentos [143,144].

Existen varias limitaciones y desventajas del uso de estas células en medicina regenerativa. La generación de iPSCs por medio de retrovirus o lentivirus, si no ha sido muy efectiva, puede llegar a causar aberraciones genéticas y formación de teratomas [145]. La sobreexpresión de los genes implicados en la formación de las iPSCs puede dar lugar a problemas como: la sobreexpresión de Oct4 que puede causar displasia en células epiteliales [146], de Sox2 que puede causar carcinoma de colon [147], o de c-Myc que puede producir varios tipos de cáncer [148].

Aunque las ESCs y las iPSCs presentan una gran capacidad de multiplicación y de pluripotencialidad, aún existen limitaciones para su uso en la medicina actual, ya sea por problemas en la regulación celular, por causas éticas o por problemas en su manipulación [62]. Por lo tanto, las MSCs son las más utilizadas y presentan un futuro muy prometedor para su uso en la clínica.

1.2.1.2. Biomateriales

Con el fin de implantar y transportar las células para la regeneración tisular en la ingeniería de tejidos, los biomateriales se utilizan como soportes idóneos para esta función. Los biomateriales forman el soporte para la proliferación de las células utilizadas, como molde que permita comenzar el proceso de producción de matriz extracelular, formando una estructura tridimensional adaptable a la lesión tisular que se quiera reparar [51].

Para desarrollar esta función, en la actualidad se están diseñando una gran variedad de biomateriales, tanto naturales como sintéticos, capaces de simular el microambiente tisular *in vivo*, para promover la viabilidad celular en el proceso de reparación o regeneración [149].

Los materiales utilizados como soporte celular no siempre presentan las características apropiadas para su uso, por ello, deben de cumplir varios requisitos para conseguir una regeneración exitosa. El principal requisito es que sean biodegradables y que en su degradación no produzcan compuestos tóxicos para el organismo, permitiendo que el crecimiento celular sea óptimo en toda la región tratada [150]. También, es necesario tener en cuenta la biocompatibilidad con los fluidos y tejidos circundantes [151], favoreciendo la vascularización de la zona para que se asemeje, en la medida de lo posible, al tejido nativo.

La variedad de biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos es muy amplia, aumentando cada periodo breve de tiempo, debido a las recientes investigaciones dentro de este campo. Para caracterizarlos, los biomateriales se suelen clasificar en biomateriales naturales (aquellos que poseen, como principal componente, una base proteica no sintetizada) y biomateriales sintéticos (aquellos que están compuestos por una combinación de proteínas naturales y otros compuestos, con el fin de obtener las características físico-químicas deseadas).

1.2.1.2.1. Biomateriales naturales

Los biomateriales naturales son muy utilizados en la actualidad en investigación y casos clínicos en ingeniería de tejidos, tanto en animales como en humanos. Generalmente, estos biomateriales contienen como base una proteína que forma parte de la matriz extracelular del cartílago, o bien, obtenida de plantas o algas, y otros

compuestos que le dan, como característica, mayor porosidad o mayor adherencia celular.

Los biomateriales naturales más utilizados son: matrices de colágeno, adhesivo de fibrina, agarosa, alginato, ácido hialurónico, citosano y celulosa.

Las matrices de colágenos, generalmente de tipo I ó III, se consideran un buen molde para la siembra de MSCs y condrocitos, tras un corto período de tiempo, este biomaterial, es degradado por colagenasas, favoreciendo la síntesis de nueva matriz extracelular en el daño osteocondral [152,153]. Estudios *in vivo* del uso de este biomaterial han mostrado buenos resultados de regeneración tisular tras 7 meses a partir de la implantación [154]. Sin embargo, una limitación asociada a este tipo de biomaterial es la inmunorreactividad asociada, debido a que se produce a partir de colágeno de otra especie animal, principalmente de origen bovino [155].

El adhesivo de fibrina se obtiene de la polimerización de fibrinógeno en presencia de trombina [156]. El uso de este biomaterial presenta buenos resultados de regeneración tisular *in vivo* con la utilización de condrocitos [157-160]. Al igual que las matrices de colágeno, este biomaterial presenta inmunorreactividad asociada.

Otro biomaterial utilizado es la agarosa, que presenta buenos resultados en la regeneración de defectos osteocondrales por medio de su implantación con condrocitos o MSCs y favorece la síntesis de colágeno y proteoglicanos [161]. Sin embargo, debido a su bajo poder de degradación y a que, al ser implantado el biomaterial sin células, se inhibe la reparación espontánea [162], no se han desarrollado muchos estudios *in vivo*.

El alginato, polisacárido lineal aislado de un alga, también se utiliza como biomaterial con buenos resultados en reparación tisular tanto *in vitro* [163] como *in vivo* [164].

El ácido hialurónico, componente de la matriz extracelular del cartílago, presenta buenos resultados cuando se utiliza como biomaterial, favoreciendo la síntesis de matriz extracelular por los condrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* [165]. Este biomaterial tiene la ventaja e inconveniente de que se degrada rápidamente por las hialuronidasas nativas [166,167] y presenta, también, el inconveniente de la biocompatibilidad [168].

Otros dos biomateriales que se utilizan en forma de hidrogel son el citosano y la celulosa. El citosano se combina con condroitín sulfato para su utilización *in vitro* [169] e *in vivo* [170]. La celulosa presenta buenos resultados de biocompatibilidad [171], aunque, actualmente, en estudios *in vivo* este biomaterial no es muy utilizado.

1.2.1.2.2. Biomateriales sintéticos

Debido a la gran aceptación que han tenido los biomateriales, tanto en medicina regenerativa como en estudios *in vitro*, muchas casas comerciales están diseñando y comercializando una serie de biomateriales sintéticos. Estos biomateriales se producen con las características adecuadas de porosidad, adhesión celular, fluidez y degradación. Estos materiales sintéticos se dividen en biodegradables y no biodegradables. Esta división de grupos va enfocada al destino y utilidad del biomaterial en la reparación del daño tisular.

El principal tipo de biomaterial sintético en el que se están centrando la mayor parte de investigaciones *in vivo* e *in vitro* son los hidrogeles. La base de su composición es un alto contenido en agua junto a otros nutrientes, metabolitos [172] y componentes biológicos desarrollados a partir de compuestos naturales como ácido hialurónico [173], alginato [174], agarosa [175] y elastina [176].

Estos tipos de materiales tienen la característica de que pueden ser inyectables reduciendo el daño en su implantación, siendo mínimamente invasiva [177]. Muchas de las ventajas que presentan los hidrogeles son la facilidad para la fijación y expansión celular [178], para la liberación de factores solubles [179,180] y para la mejora de las propiedades de los sistemas de liberación controlada [181,182]. Su polimerización, la porosidad y el entrecruzamiento (crosslinking), factor importante que favorece el crecimiento celular en el biomaterial, se inician por estímulos físicos como el pH, temperatura tisular, por agentes químicos añadidos por los laboratorios, fotopolimerización o mediante actividad enzimática [167].

Un molde tridimensional biodegradable muy utilizado es el ácido poliláctico, poliéster alifático que pertenece a un grupo alfa-hidroxi [183]. Este biomaterial es fácilmente degradado por hidrólisis [167], aunque, presenta el inconveniente que tras su degradación produce compuestos citotóxicos [184], que pueden inducir reacciones inmunológicas importantes [185]. Este biomaterial presenta buenas propiedades para ser utilizado en la regeneración tisular, como su lenta biodegradabilidad, su estructura rígida y la facilidad de adhesión celular; favoreciendo el crecimiento celular y la producción de matriz extracelular a partir de las células [186].

Los materiales Dacron y Teflon son polietilenos que presentan buenos resultados en la regeneración tisular espontánea en estudios *in vivo* [187]. Sin embargo, debido a su reacción inmunológica [188] no son considerados buenos candidatos para la regeneración del cartílago.

Las fibras de carbono son compuestos inertes que no inducen respuesta biológica. Este efecto hizo que se utilizasen como soporte en la regeneración tisular, aunque en estudios realizados se demostraron resultados muy variables [189].

Aunque en la actualidad existen en el mercado un gran número de biomateriales, tanto de origen natural como sintético, los resultados obtenidos en la mayor parte de ellos no están acordes a las expectativas de la ingeniería de tejidos. Por ello, se está intentando buscar una alternativa para utilizar moldes con características más similares al tejido nativo a reparar.

1.2.1.2.3. Matrices extracelulares naturales

La matriz extracelular (ECM) de los tejidos es un complejo, formado por moléculas altamente organizadas y factores de señalización incorporados [190]. Como consecuencia, una de las funciones principales de esta ECM es dar al tejido una estructura característica y un sustrato para la adhesión celular. Esta también contribuye a la migración, proliferación, diferenciación y supervivencia celular, lo cual es esencial para el desarrollo, homeostasis y reparación del tejido [190,191].

Los biomateriales utilizados en la reparación y regeneración tisular intentan recrear un ambiente y función semejante a la ECM del tejido a reparar. Sin embargo, los materiales y matrices sintéticas se producen a partir de materiales biológicos aislados, como son, el colágeno, fibrina o ácido hialurónico. Como consecuencia, actualmente, se ha impulsado el uso de ECM nativas como sustituto de los biomateriales comercializados. El uso de ECM de origen alogénico o xenogénico derivado de tejidos, está emergiendo como una forma natural de biomaterial [190,192-195]. Las ECM son, por lo tanto, la mejor manera de representar el microambiente celular y tisular nativo [196].

En investigación se están utilizando también diversas matrices descelularizadas, obteniendo buenos resultados en proliferación celular y diferenciación. Estos tipos de matrices utilizados como

sustitutos a los biomateriales comercializados, proceden de dermis descelularizadas [197], matriz nativa de tendón [198] o biomateriales obtenidos de matriz extracelular de cartílago [199].

Otro tipo de matrices utilizadas son las matrices derivadas de células (DCM) que se consideran una alternativa a las matrices derivadas de tejidos y se han utilizado satisfactoriamente en estudios recientes, tanto en aplicaciones pre-clínicas como clínicas [192,200-205]. Algunas de las ventajas del uso de DCM es que son producidas a partir de una fuente de células animales o humanas, simulando las propiedades y conformación de la matriz extracelular tisular nativa, y la posibilidad de ser utilizadas con células somáticas o células troncales para producir matrices con las propiedades deseadas [206].

Recientemente, se ha demostrado que las ECM derivadas de células troncales mesenquimales (matriz descelularizada procedente de células troncales, DSCMs) estimulan la proliferación de las MSCs y favorecen una correcta diferenciación osteogénica inducida por BMP-2 durante la expansión *in vitro* [207]. Estas propiedades sugieren que las DSCM pueden ser aplicables como sustrato celular efectivo para el transporte de MSCs en el campo de la medicina regenerativa [208]. Este tipo de DSCM favorece la proliferación, la adhesión celular, la migración y el potencial de diferenciación de las células troncales [208,209].

Al igual que los condrocitos articulares, fuera de su microambiente, las células troncales adultas pierden el potencial de desarrollo rápidamente [210] y tienden a diferenciarse o inducir la apoptosis [211]. Por lo tanto, uno de los mayores retos en la ingeniería tisular del cartílago y su regeneración es controlar el destino de los condrocitos articulares y las células troncales adultas en su ambiente natural. Recientemente, se ha descubierto que las DSCM reproducen un microambiente idóneo para las MSCs

favoreciendo su expansión celular, mejorando la capacidad de proliferación y favoreciendo el potencial condrogénico, induciendo la expresión de genes relacionados con los condrocitos en ausencia de medio de diferenciación [212]. Las MSCs responden a varias señales o estímulos procedentes de la interacción célula-matriz extracelular.

La capacidad de favorecer el potencial de diferenciación y de regeneración de las células troncales por medio del uso de DSCMs como biomaterial, supone una alternativa muy prometedora en el campo de la medicina regenerativa tisular.

1.2.1.3. Transfecciones

Uno de los principales problemas que se presentan en la ingeniería de tejidos es poder seguir los pasos de las células reparativas, tanto en un modelo *in vitro* como *in vivo*. Así mismo, la posibilidad de introducir e inducir la expresión de un gen en las mismas células multiplica las utilidades de estas en este campo. Estos procesos se realizan, en la actualidad, por medio de las transfecciones genéticas, tanto de DNA como de RNA, y con el uso de numerosos productos y técnicas comercializadas.

La transfección, técnica utilizada con el fin de insertar una secuencia genética en una célula evitando que sea degradada por nucleasas, ha ayudado a descubrir secuencias de regulación que son claves en la terapia génica, así como a marcar células por fluorescencia para poder localizarlas en sus estudios posteriores o conseguir mostrar la expresión de genes [213]. Esta técnica se ha realizado tanto *in vivo* [214] como *in vitro*, siendo mucho más efectiva en los ensayos *in vitro* [215].

La secuencia genética que se suele introducir en la célula tiene la estructura de plásmidos. Los plásmidos más utilizados para las transfecciones son aquellos que portan una proteína que emite una

señal luminiscente (verde GFP, roja RFP y amarilla YFP) o catalizan una reacción enzimática visible (LacZ). Actualmente, los estudios de transfecciones también son utilizados para insertar secuencias genéticas en terapia genética con el fin de modificar el funcionamiento celular y, de este modo, conseguir la expresión de un gen del que carece la propia célula [216]. Estos plásmidos están unidos a promotores capaces de inducir su expresión, ya que es común que estén activados en todos los tipos celulares; los más utilizados son: pEF1 α , Myc y CMV.

La proteína verde fluorescente (GFP) es una proteína que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. Fue descubierta en la medusa *Aequorea victoria* [217], y este gen ha sido clonado para utilizarlo en ensayos de biología molecular como marcador, en ingeniería tisular, fisiología, microbiología e ingeniería ambiental.

En la mayoría de las aplicaciones de la transfección, es suficiente que el gen transfectado se exprese transitoriamente. Como el DNA introducido en la transfección normalmente no se inserta en el genoma nuclear, el DNA exógeno se pierde cuando la célula entra en mitosis. Frecuentemente, se suelen realizar transfecciones estables, aquellas en las cuales el plásmido permanece mayor tiempo en la célula, insertándose en su cromosoma, y se pueden conseguir clones de las mismas. Debido a que la mayoría de los plásmidos insertados poseen una secuencia génica que da resistencia a alguna droga, gracias a estas transfecciones podemos separar clones utilizando técnicas sencillas como adicionar un compuesto químico, como la geneticina, al medio de cultivo [218].

La principal barrera que debe de superar el plásmido para poder penetrar dentro de la célula es la membrana celular. Por lo tanto, los

compuestos comerciales (vectores) para insertar en el interior de la célula el plásmido están destinados a modificar esta barrera. Dentro de los vectores existen vectores virales y vectores no virales.

Los vectores de transfección virales son virus modificados que se utilizan como transporte del material genético hacia el núcleo celular. Los vectores virales más utilizados son: adenovirus, adenovirus asociado, lentivirus, poxvirus, alfavirus, herpesvirus simple [219]. Debido a su elevado coste y a los riesgos que conlleva su utilización, la mayoría de los investigadores suelen utilizar los vectores no virales para sus investigaciones, siendo, estos últimos, los menos eficientes.

Los vectores no virales [220] comercializados se clasifican en químicos y físicos. Dentro de los químicos están los lípidos, polímeros, dendrímeros, polietilamina, péptidos y otras nanopartículas. Dentro de los físicos encontramos la electroporación, microinyección y los microproyectiles. Los protocolos para realizar la transfección basados en el uso de métodos físicos suelen tener mejores resultados en porcentaje de transfección y reducción de la muerte celular. La microinyección directa es utilizada, principalmente, en la transferencia de material genético a células embrionarias [221]. La electroporación se basa en la inserción del material genético por medio de pulsos eléctricos capaces de alterar levemente la membrana plasmática celular. Otro método físico menos conocido, son las partículas biolísticas que son usadas en cultivos celulares y en ensayos *in vivo*. Esta última técnica utiliza microproyectiles a gran velocidad capaces de atravesar la membrana plasmática [222].

Los métodos químicos, que en la actualidad son los más utilizados, son el DEAE-dextrano, el fosfato cálcico, la polietilamina y los productos lipofectantes. El DEAE-dextrano es un polímero catiónico que se une al material genético y es utilizado tanto para

transfecciones transitorias como para estables [223]. El fosfato cálcico es una técnica muy sencilla basada en la formación de coprecipitados, los cuales se insertan en las células; es utilizada principalmente en estudios *in vitro* [224]. La polietilamina, polímero de elevada carga positiva, presenta buenos resultados tanto *in vivo* como *in vitro* debido a su baja interferencia [225] en la actualidad también se están empleando derivados de la polietilamina [226].

Pero por su bajo coste, sencillez y eficiencia, los productos lipofectantes son los productos transfectantes que están siendo más utilizados. Estos productos se unen al material genético por cargas iónicas opuestas creando complejos DNA/liposoma o RNA/liposoma [227] y son endocitados de forma espontánea por la célula generando una baja citotoxicidad [228,229]. Muchos de estos nuevos vectores prometen una eficiencia de transfección alta, pero varía en los distintos tipos celulares [230].

Los cultivos primarios suelen ser más sensibles a las transfecciones con productos lipofectantes, aumentando el número de células muertas tras cada ensayo [231]. Por otro lado, muchos productos lipofectantes requieren para mejorar su eficiencia el uso de medios especiales carentes de suero [232]. Las células de cultivos primarios requieren un medio con suero para mantener su viabilidad, por lo tanto, el uso de productos lipofectantes en los cuales el uso de suero no afecta su eficiencia, reduce la muerte celular de las células durante el proceso de transfección causada por la ausencia de suero.

La Lipofectamine 2.000[®] es un producto transfectante muy utilizado por sus buenos resultados en transfección, obteniendo altos porcentajes de inserción del plásmido. El problema de este reactivo es su elevada toxicidad [233].

El uso del lipomediador catiónico SAFEctin[®] ha demostrado buenos resultados en transfección, descendiendo el número de células muertas debido a la baja toxicidad del producto [234]. Como ventaja presenta, que su uso permite la utilización de suero en el momento de la transfección, evitando la muerte de células afectadas por su ausencia, principalmente las obtenidas de cultivos primarios.

Uno de los objetivos de la terapia génica es poder aislar una línea celular con transfección estable y que no afecte las condiciones nativas del cultivo. La importancia de mantener la pluripotencialidad en las MSCs tras este proceso ha centrado el interés de muchos investigadores actualmente [103,235]. El número de estudios de caracterización tanto estructural como ultraestructural del fenotipo de las MSCs ha aumentado, ya sea de células no transfectadas como transfectadas [236].

1.2.2. Terapia convencional en enfermedades osteoarticulares

En la actualidad, el tratamiento de enfermedades osteoarticulares como la osteoartritis o la artritis reumatoide se centra en el uso de tres clases de fármacos: agentes anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), corticoides esteroideos y medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs). Tanto los NSAIDs como los corticoides presentan una acción para un periodo corto de tiempo, como resultado el paciente tiene que realizar más tomas del producto en un día. Sin embargo, el efecto de los DMARDs tiene una duración mayor, llegando a persistir su efecto durante semanas o meses. Generalmente, los reumatólogos suelen utilizar los DMARDs en el curso temprano de la enfermedad [237].

En los últimos años se ha incrementado el empleo de un grupo de medicamentos autorizados específicamente para el tratamiento de la artrosis y disponibles en el mercado desde hace tiempo: los fármacos de acción lenta, también llamados SYSADOA (Symtomatic Slow Action Drugs for Osteoarthritis). Se denominan de acción lenta en contraposición a los analgésicos tradicionales, cuyo inicio de acción es inmediato. El efecto de los SYSADOAS se produce varias semanas después de iniciar el tratamiento y se mantiene temporalmente después de retirarlo [238].

Uno de los fármacos SYSADOA que actualmente se comercializan, como tratamiento para la reducción de la inflamación en las enfermedades osteoarticulares, es el condroitín sulfato.

El condroitín sulfato (CS) es el mayor componente de la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos [239,240], que, habitualmente, se encuentra asociado a proteínas formando agregados de alto peso molecular denominados proteoglicanos. En los últimos años se utiliza mucho como anti-inflamatorio para las enfermedades osteoarticulares [241]. Aunque su efecto está siendo discutido, ya que, *in vitro* este compuesto presenta muy buenos resultados, pero *in vivo* algunos autores lo consideran anti-inflamatorio, otros afirman que ejerce un efecto suave y otros incluso que produce efectos pro-inflamatorios [242].

Las evidencias clínicas del efecto del CS como tratamiento para la osteoartritis han demostrado que reduce significativamente el dolor en los pacientes, mejorando la función articular [241,243,244] y reduciendo la inflamación [245]. La mayor parte de los estudios realizados con este compuesto se centran en analizar su eficiencia en procesos sintomáticos artrósicos de rodilla [244-246], aunque otros estudios demuestran que es eficaz en otras articulaciones como los dedos y muñecas [247,248].

Los efectos del CS en el tratamiento de la OA se deben a diversos mecanismos de acción que disminuyen la expresión de fosfolipasa-A2 (PLA2) [249], ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la disminución de la concentración de prostaglandina E₂ (PGE₂) en la articulación [250,251]. En otros estudios, también se ha descubierto que el CS reduce la concentración de citoquinas pro-inflamatorias como son: el TNF [252], IL-1 β [253], especies reactivas de oxígeno (ROS) [252] y la concentración de óxido nítrico [254].

El papel protector que juega el CS en la articulación se debe, por otro lado, al efecto que tiene en la disminución de las metaloproteasas activadoras de citoquinas pro-inflamatorias, teniendo un papel importante en la activación e inhibición de rutas metabólicas en los condrocitos.

El CS actúa a nivel de las rutas del NF- κ B, de la IL-1 y del TNF en los condrocitos articulares inactivándolas y reduciendo la expresión de MMP-3 [255], MMP-9 [250,251,253,256], MMP-13 [250,251,257], MMP-2 [250], MMP-14 [250], COX-2 [258,259], óxido nítrico sintetasa 2 (NOS-2), IL-1 y TNF [260] (Fig. 2).

Se ha descubierto, también, que el CS ejerce un efecto importante en la inactivación de la ruta metabólica de p38 MAP quinasas [261] inactivando la apoptosis celular.

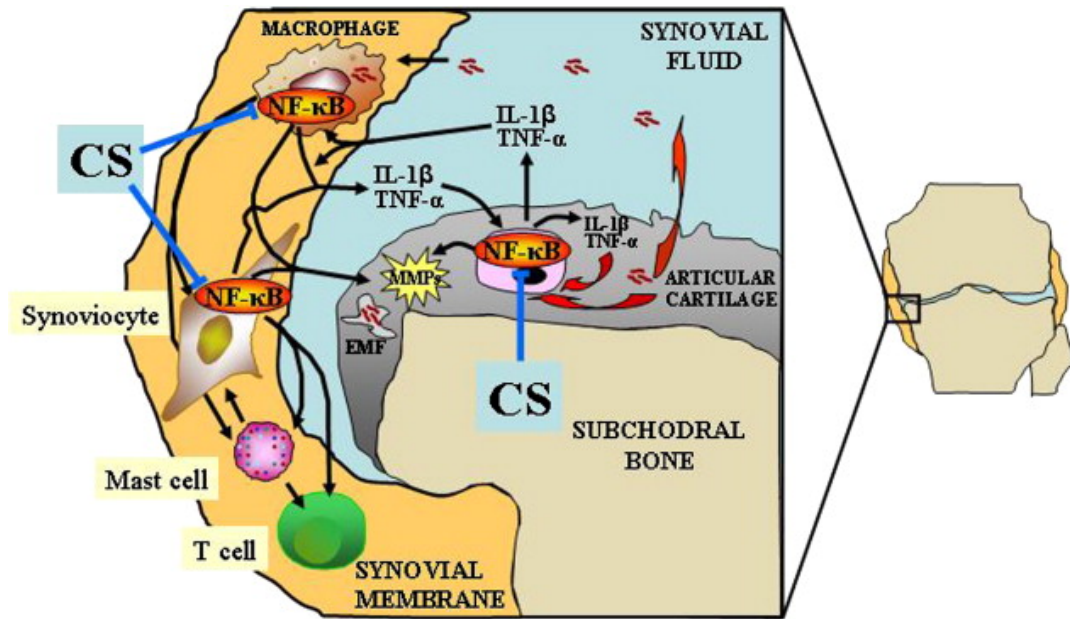


Figura 5: Esquema del efecto del condroitin sulfato en la inhibición de las rutas metabólicas pro-inflamatorias en el cartílago articular. Figura obtenida de [20].

1.2.3. Tratamientos biológicos

Debido a que los tratamientos convencionales dejan de tener efecto anti-inflamatorio reduciendo su actividad a lo largo del día, ya que la toma se tiene que realizar cada 8 horas, las investigaciones actuales han centrado su objetivo en conseguir un tratamiento definitivo y óptimo para estas enfermedades osteoarticulares. Esto ha dado como consecuencia el uso de tratamientos biológicos como dianas, para la inhibición de las rutas pro-inflamatorias que se producen en las enfermedades osteoarticulares.

Los tratamientos biológicos son una alternativa a los anti-inflamatorios no esteroideos y esteroideos en el tratamiento de la artritis reumatoide. Recientemente, se han creado nuevos agentes biológicos capaces de inhibir las señales de las citoquinas inflamatorias. Estos agentes se encuentran en diversas etapas de desarrollo, en las distintas fases de investigación o esperando ser aprobadas por las autoridades sanitarias mundiales [237].

Un primer grupo de tratamientos biológicos se centra en la inhibición de la actividad del TNF. Los anti-TNF suelen ser anticuerpos

destinados al bloqueo del TNF. Entre ellos se encuentran compuestos comerciales como: Infliximab[®] [262], Etanercept[®] [263], Adalimumab[®] [264], Certolizumab[®] [265] y Golimumab[®] [266]. Estos tratamientos comercializados presentan buenos resultados bloqueando la acción inflamatoria del TNF, aunque sus efectos secundarios son elevados, como la tolerancia inmunológica o reacciones alérgicas.

Otro grupo de tratamientos biológicos utilizados son los antagonistas del receptor de IL-1 β . Estos compuestos suelen ser moléculas recombinantes no glicosiladas de la IL-1RA. El único antagonista del receptor IL-1 β comercializado es Anakinra[®] [267]. Este tipo de tratamiento presenta una acción de menor duración y, por lo tanto, una eficiencia terapéutica moderada.

En los últimos años también se ha desarrollado un antagonista del receptor de IL-6. Este compuesto es un anticuerpo monoclonal que se une al receptor de IL-6 bloqueando la activación de la cascada de señales inflamatorias. El único compuesto comercializado de este tipo es el Tocilizumab[®] [268]. Este compuesto presenta efectos secundarios como enfermedades de las vías respiratorias y otras infecciones graves.

El último grupo de tratamientos biológicos son los anticuerpos monoclonales destinados a bloquear las células T y B [269]. Su uso presenta efectos secundarios como infecciones y dolores relacionados.

1.2.4. Terapia celular en las enfermedades osteoarticulares

Aunque los productos anteriormente citados presentan buenos resultados ante la patogenia de las enfermedades osteoarticulares, los efectos secundarios que producen en el organismo del paciente ha llevado a los investigadores a buscar nuevas alternativas.

Actualmente, las MSCs son consideradas como la alternativa definitiva para paliar estos problemas.

En los últimos años, la mayoría de las investigaciones se han centrado en la capacidad regeneradora de las MSCs, muy utilizadas en ingeniería de tejidos, como hemos comentado en el apartado correspondiente de ingeniería de tejido cartilaginosa, pero, aparte de esta cualidad, en estudios recientes se ha puesto de manifiesto que estos tipos celulares secretan factores solubles que influyen en el microambiente celular, modulando la respuesta inmune. El mecanismo del efecto inmunomodulador de las MSCs no está completamente descrito, sin embargo, estos factores pueden actuar directamente en el mecanismo intracelular de la célula dañada o indirectamente induciendo la secreción funcional de mediadores activos en las células vecinas a las células dañadas [270]. Las MSCs son capaces de atenuar el daño tisular inhibiendo la remodelación fibrótica y la apoptosis, promoviendo la angiogénesis, estimulando su propia proliferación y reduciendo el estrés oxidativo [271].

La patogenia de la artritis reumatoide está inducida por el efecto que causan las células T en la articulación. El poder inmunomodulador de las MSCs presenta la capacidad de inhibir la proliferación y la función inflamatoria de células inmunes sanguíneas como las células B y T [272] y de las células *natural killer* [273]. Otros estudios [274-279] han demostrado que tanto las MSCs como las MSCs diferenciadas hacia osteocitos, adipocitos y condrocitos, poseen la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos, células naïve y células de memoria T y las células T CD4⁺ y CD8⁺.

Numerosos mediadores solubles están implicados en la inhibición de la proliferación de las células T. Recientes estudios han demostrado que estos factores solubles son: PGE₂ [279], IL-6 [280], óxido nítrico [281], indolamina 2,3-dioxigenasa [282] e IL-10 [283], mediadores que son secretados por la presencia de TNF e IFN- γ

[284]. Estos factores secretados por las MSCs se encuentran en mayor cantidad cuando las células están en contacto con factores inflamatorios solubles como son: IL-10, IL-6, IL-2, IFN- γ y TNF [279]. Existen numerosas diferencias entre la secreción de factores inmunomoduladores en las distintas especies animales, por ejemplo, las MSCs de ratones secretan NO como supresor de la proliferación de las células T, mientras que las MSCs humanas secretan IDO [285].

Uno de los mediadores secretados por las MSCs que presentan un papel importante en la remodelación tisular son los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), los cuales regulan la expresión de MMPs tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas [286,287].

Un estudio con co-cultivos de MSCs con condrocitos artrósicos, mostró que la comunicación célula-célula y la secreción de factores por parte de los condrocitos, induce la diferenciación de las MSCs a condrocitos en ausencia de factores de crecimiento [288]. El papel de las MSCs puede prevenir la degradación del cartílago y favorecer su regeneración en pacientes afectados de OA. Otros estudios demuestran que las MSCs son capaces de alterar el fenotipo de los condrocitos cuando están las dos células mezcladas tanto en pellet como en co-cultivos [289-291].

Por otra parte, el uso de medios condicionados derivados de las MSCs presenta buenos resultados en la reducción de la inflamación [292]. En un estudio realizado con MSCs y condrocitos artrósicos de humano, se observó que tanto el medio condicionado como el co-cultivo inducen la diferenciación de las MSCs hacia condrogénesis. Sin embargo, el co-cultivo induce la desdiferenciación de los condrocitos, su proliferación y la reducción en la expresión de MMP-13 [293].

También se ha demostrado que el medio condicionado procedente de MSCs de humano inhibe la producción de TNF, CXCL-2,

IL-6, IL12p40 y IL-23 tras ser estimuladas con lipopolisacárido. Este efecto hace que aumente la expresión de PGE₂ [294,295].

Sin embargo, existen problemas en el uso de las MSCs como tratamiento para las enfermedades osteoarticulares. La edad del paciente donador y el estado de la enfermedad pueden influir en las características de las MSCs obtenidas, en los factores anti-inflamatorios que secretan y en el potencial de diferenciación [296-298]. Las MSCs expresan el complejo de histocompatibilidad I (MHC-I), pero no expresan el complejo de histocompatibilidad II (MHC-II) en sus marcadores de superficie. Tras la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica, las MSCs continúan expresando el MHC-I pero no el MHC-II, por lo que siguen manteniendo su potencial no inmunogénico [274]. Esta propiedad sugiere, que las MSCs puedan ser transplantadas de un paciente sano y más joven a un paciente enfermo sin que se produzca la reacción inmune y, como consecuencia, un rechazo de las células implantadas.

El potencial condrogénico y la secreción de factores anti-inflamatorios por parte de las MSCs, hacen que este tipo celular sea un buen candidato para el tratamiento de las enfermedades osteoarticulares. El efecto de las MSCs en el tratamiento de la osteoartritis se basa en dos vías, en la prevención de la degradación del cartílago y reducción de la inflamación por medio de los factores secretados, y por la diferenciación y contribución a la regeneración del cartílago dañado [299].

2. OBJETIVOS

Justificación

Durante el desarrollo de este trabajo, consecuencia de los resultados que íbamos obteniendo y profundización en el tema, así como distintas líneas de trabajo que han ido surgiendo derivadas de colaboraciones y nuevos proyectos, se nos han presentado planteamientos adicionales que no estaban en el inicio del proyecto. Por este motivo, para facilitar la lectura y comprensión del trabajo, consideramos necesario justificar previamente cómo ha sido el diseño del mismo.

En primer lugar en cuanto a las especies elegidas, en un principio consideramos de gran interés realizar los estudios en caballo puesto que es una especie fundamental en veterinaria, con un importante valor económico y por su tamaño y anatomía articular, los resultados obtenidos podrían ser trasladables a humana. Una vez comenzado el trabajo, nos surgió la posibilidad de obtener biopsias de cartílago y grasa de humano procedentes de pacientes del Hospital Universitario de León. Lo cual era sumamente interesante de cara a poder trabajar directamente con material humano y la aplicabilidad de los resultados, dada la alta prevalencia de las enfermedades osteoarticulares y el gasto que estas suponen en la sanidad pública.

También se han utilizado distintos tipos celulares, como control de todos nuestros experimentos hemos utilizado condrocitos tanto de caballo como humanos, puesto que nuestro interés se centró en conseguir una adecuada regeneración en el cartílago. En los estudios realizados en caballo se compararon distintas características de las MSCs procedentes de médula ósea (BMSCs) y de tejido adiposo (ASCs), el hecho de que no se hayan utilizado BMSCs en los ensayos de células humanas es simplemente por la dificultad de acceso a este tipo de muestra. En el caso de las células humanas, se realizaron

todos los experimentos con ASCs y condrocitos, no se pudo hacer estudio comparativo entre ambas poblaciones (ASCs y BMSCs).

Igualmente, las pruebas de transfección se llevaron a cabo en caballo porque nos interesaba conseguir una transfección estable en ambos tipos de MSCs y comprobar si existían diferencias entre ambas, con el fin de utilizarlas en un ensayo *in vivo*, lo que no era posible en humano.

En los últimos años la mayoría de las investigaciones se han centrado en la capacidad regeneradora de las MSCs, muy utilizadas en ingeniería de tejidos, pero, aparte de esta cualidad, en estudios recientes, se ha puesto de manifiesto que estos tipos celulares secretan factores que influyen en el microambiente celular modulando la respuesta inmune. El mecanismo inmunomodulador de las MSCs no está completamente descrito. Por ello consideramos muy interesante incluir como una parte del trabajo, distintos estudios evaluando el papel inmunomodulador de las MSCs, que está íntimamente relacionado y complementa el papel regenerador de estas células. Si es posible modular la inflamación a nivel articular es posible favorecer la regeneración.

Objetivo general

El objetivo general que nos planteamos en este trabajo, fue evaluar la capacidad regenerativa de las células troncales mesenquimales de caballo y la producción de matrices naturales de utilidad en la ingeniería del tejido cartilaginoso. Así como, establecer el papel inmunomodulador de las MSCs en enfermedades inflamatorias osteoarticulares. Para hacer todas las pruebas *in vitro*, tanto de producción de matrices naturales como de transfecciones, utilizamos células de caballo, mientras que para las pruebas de

inmunomodulación, utilizamos células procedentes de caballo y de humano.

Objetivos específicos

- Obtención y caracterización de condrocitos y células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo y médula ósea de caballo.
 - Identificación de los marcadores de superficie de las células troncales mesenquimales.
 - Análisis de la multipotencialidad de las células troncales mesenquimales.
- Obtención y caracterización de condrocitos y células troncales mesenquimales procedentes de tejido adiposo de humano.
 - Identificación de los marcadores de superficie de las células troncales mesenquimales.
 - Análisis de la multipotencialidad de las células troncales mesenquimales.
- Definir el mejor producto y protocolo de transfección para las MSCs de caballo.
- Aislamiento de líneas celulares de ASCs y BMSCs de caballo obtenidas con transfección estable por medio de geneticina y caracterización de su multipotencialidad.
 - Identificación de los marcadores de superficie.
 - Análisis de la multipotencialidad en presencia y ausencia de geneticina.
- Evaluar la ultraestructura celular de las MSCs de caballo con transfección estable y compararla con la de las MSCs de caballo no transfectadas.

- Producción y caracterización de matrices extracelulares derivadas de MSCs (DSCMs) de caballo tras ser inducidas por medio ascórbico y condrogénico.
- Análisis de la proliferación, viabilidad e inducción de la condrogénesis y osteogénesis de las MSCs de caballo, sembradas sobre las matrices extracelulares derivadas de MSCs (DSCMs).
- Análisis del perfil inmunomodulador de las MSCs de caballo.
- Análisis del papel anti-inflamatorio de las MSCs de caballo en crecimiento en co-cultivos y el uso de su medio condicionado sobre condrocitos inflamados.
- Análisis del papel anti-inflamatorio del condroitín sulfato y de las MSCs de humano sobre condrocitos inflamados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Para la realización de este trabajo hemos empleado dos especies de estudio: caballo y humano.

Los protocolos utilizados en todos los estudios fueron realizados de acuerdo a las Guidelines of the European Union Council (86/609/EU) y siguiendo la normativa española de regulación (BOE 67/8509-12,1988) sobre el uso de animales de laboratorio. Los siguientes experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de León.

Como modelo animal empleamos células obtenidas de 6 yeguas (*Equus ferus caballus*) de la raza Hispano-Bretón con edades entre 5 y 7 años y con pesos comprendidos entre los 300-400 kg. De estos animales se obtuvieron células troncales mesenquimales de médula ósea y de tejido adiposo subcutáneo, así como cartílago articular. La obtención de las muestras se realizó siguiendo los protocolos de bienestar animal (SECAL).

Las células procedentes de humano fueron aisladas de muestras de pacientes operados de artroplastias en el Hospital Universitario de León, previo consentimiento informado de los pacientes y con las siguientes edades: varón de 74 años, mujer de 67 años y mujer de 55 años. De dichos pacientes fueron tomadas muestras de la grasa infrapatelar y de cartílago articular.

3.2. OBTENCIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR, TEJIDO ADIPOSO Y MÉDULA ÓSEA

3.2.1. Obtención de cartílago articular de humano

Las muestras de cartílago articular fueron obtenidas durante cirugías de artroplastia total de rodilla (PTR), previo consentimiento del paciente, realizada en el Hospital Universitario de León.

Los fragmentos de rodilla resultantes fueron obtenidos de forma aséptica en el quirófano y transportadas al laboratorio a 4°C en medio de cultivo suplementado con un 2% de solución antibiótica-antimicótica.

3.2.2. Obtención de cartílago articular de caballo

Las muestras de cartílago articular fueron obtenidas de piezas anatómicas recogidas de caballos sacrificados en el Matadero de León.

El cartílago articular fue aislado cuidadosamente de las superficies articulares de los huesos del tarso. Una vez obtenidas, las muestras se transportaron en PBS con 2% de solución antibiótica-antimicótica.

3.2.3. Obtención de tejido adiposo de humano

Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas durante cirugías de artroplastia total de rodilla (PTR) realizadas en el Hospital de León.

Previamente a la intervención, se llevó a cabo la profilaxis antibiótica a los pacientes con cefazolina (1 g de cefazolina IV) antes de la anestesia. Los pacientes fueron anestesiados con anestesia subaracnoidea con el paciente en posición de sedestación, con punción en L₂-L₃ ó L₃-L₄, e inyección de 11-13 mg de bupivacaína hiperbárica 0,5% (B. Braun Medical®) y 10µg de fentanilo (B. Braun Medical®).

Se limpió y desinfectó la zona donde se iba a realizar la incisión quirúrgica para evitar contaminaciones. Se realizó una incisión parapatelar media y se extrajo la grasa intrapatelar prerrotuliana en condiciones asépticas. Las muestras se transportaron al laboratorio a 4°C en medio de cultivo suplementado con un 2% de solución antibiótica-antimicótica.

3.2.4. Obtención de tejido adiposo de caballo

Para la obtención de tejido adiposo, se procedió a la sedación de los animales con una combinación de anestésicos: Romofidina (Sedivet®) con una dosis de 0,04 mg/kg IV y Butorfanol (Torbugesic®) con una dosis de 0,015 mg/kg IV.

Se rasuró y limpió la región glútea dorsal y se realizó un bloqueo anestésico en "L" invertida infiltrando anestésico local (Lidocaína® 2%) en el tejido subcutáneo. Se realizó una incisión de 15 cm paralela a la columna vertebral y a 15 cm abaxial a la columna vertebral. Se separaron los bordes de la incisión y se recogió el tejido adiposo subcutáneo subyacente situado sobre la fascia glútea superficial, hasta completar una cantidad total de 15 g de tejido. Finalmente, la incisión se sutura en dos planos, el subcutáneo con material de sutura reabsorbible y la piel con material de sutura no reabsorbible.

3.2.5. Obtención de médula ósea de caballo

Se realizó un protocolo de sedación para caballos con una combinación de anestésicos: Romifidina (Sedivet®) con dosis de 0,04 mg/kg IV y Butorfanol (Torbugesic®) con dosis de 0,015 mg/kg IV. Ecográficamente se localizaron y se marcaron los espacios entre las esternebbras situados entre las cuatro esternebbras más caudales. Las punciones se realizaron a media distancia entre marcas, evitando la punción de la última esternebra por ser más fina y frágil.

A continuación, se rasuró y preparó, de forma estéril, una zona de 10 cm de ancho sobre el área ventral del esternón. Se infiltraron 5 mL de anestésico local (Lidocaína® 2%), a lo largo de los puntos de aspiración. Se prepararon 2 jeringas de 10 mL con 0,5 mL de heparina (5000 UI/mL). Se introdujo la aguja de Jamshidi® a través de la incisión y se avanzó hasta que se contactó con la superficie de

la esternebra. La médula ósea no fluye espontáneamente de la aguja, por lo que es necesaria una suave aspiración con una jeringa. La primera jeringa, precargada de heparina, se conectó 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 agitó 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 retiró totalmente y se introdujo, de la misma forma, en el segundo espacio más caudal al primero. Se rellenó la segunda jeringa precargada con 9,5 mL de muestra.

3.3. AISLAMIENTO Y MULTIPLICACIÓN CELULAR

3.3.1. Aislamiento de condrocitos

El aislamiento de cartílago articular se realizó con el mismo protocolo en las muestras de humano y de caballo.

Los fragmentos de cartílago obtenidos se trocearon asépticamente hasta obtener fragmentos más pequeños de tamaño aproximado 0,5 x 0,5 cm para facilitar el proceso de digestión de la matriz extracelular.

Se procedió a realizar la primera digestión de la matriz, en la cual, los fragmentos aislados se suspendieron en una disolución de tripsina al 0,25% en PBS manteniéndose en agitación durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, las muestras se sometieron a centrifugación a 1.200 rpm durante 10 minutos para eliminar el medio y proceder a la segunda digestión. Para ello al centrifugado obtenido se le añadió una disolución de colagenasa tipo II al 0,05% en DMEM durante 12 horas a 37°C en agitación. Para aislar las células se centrifugó 10 minutos a 1.200 rpm. El pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo DMEM con un 10% de SFB y 1% de

solución antibiótica-antimicótica (DMEMc) y se sembró en frascos de cultivo de 25 cm² (T25) para su multiplicación.

3.3.2. Aislamiento de ASCs

El proceso para obtener las células procedentes de tejido adiposo de caballo y las células procedentes de tejido adiposo de humano se desarrolla siguiendo los mismos pasos de aislamiento, obtenidos a partir de [300].

Se procedió a degradar el colágeno tipo I de la matriz extracelular del tejido adiposo obtenido. Este proceso se realizó utilizando como medio de digestión medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma[®]) conteniendo 0,075% de colagenasa tipo I (Sigma[®]).

El tejido adiposo obtenido se separó en pequeños fragmentos para reducir el tiempo de digestión y facilitar el proceso. Estos fragmentos se colocaron dentro de la solución de digestión y se mantuvieron en agitación durante 2 horas a 37°C.

Una vez disociadas las muestras se añade una solución de DMEMc en volumen igual a la solución de disociación con el fin de bloquear la actividad enzimática de la colagenasa. La suspensión celular se centrifugó 10 minutos a 1.200 rpm para separar la grasa que permanece flotando del pellet celular. Este pellet se denomina fracción estromal vascular (SVF) o lipoaspirado procesado. El pellet se resuspendió en medio de cultivo DMEMc.

3.3.3. Aislamiento de BMSCs

El aspirado de médula ósea se fraccionó sobre un gradiente de densidad Ficoll[®] mediante centrifugación. Se colocó en un tubo de 5 mL de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare[®]) y a continuación se añadieron 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 centrifugó a 1.200 rpm durante 20 minutos. Después de la centrifugación se observaron 3 capas: la superior compuesta por el plasma y las plaquetas, la capa intermedia compuesta por el Ficoll[®], y la inferior donde se depositaron los eritrocitos. Nuestro interés se centra en las dos capas superiores. Estas capas se recogieron con una micropipeta con cuidado para evitar recoger parte de la fase inferior. Posteriormente, se centrifugó a 1.000 rpm durante 15 minutos hasta conseguir un pellet que se resuspendió en 8 mL de PBS para lavarlo, con el fin de eliminar posibles impurezas.

Centrifugamos de nuevo a 1.000 rpm durante 15 minutos, eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en medio de cultivo DMEMc.

3.3.4. Multiplicación, tripsinización y criopreservación celular

Para obtener el número de células adecuado, las células se sembraron y multiplicaron en frascos T25 y T75 (Corning[®]), placas de 6 pocillos (Thermo Scientific[®]), placas de 24 pocillos (Thermo Scientific[®]) y placas de 96 pocillos (Falcon[®]), según las necesidades del experimento que se fuese a realizar. El medio utilizado en todos los cultivos fue DMEMc. El conteo celular se realizó utilizando una cámara de Neubauer y contrastando las células con azul Trypan (Sigma[®]).

Cuando se obtuvo una monocapa (por encima del 90% de confluencia en cultivo) las células se tripsinizaron utilizando el siguiente protocolo:

Después de eliminar el medio de cultivo se realizaron dos lavados de PBS con el fin de eliminar restos de SFB que pudiesen

inactivar la acción de la tripsina. Se añadió la mínima cantidad de disolución de tripsina que corresponde a cada frasco o placa de cultivo. Esta disolución de tripsina estaba formada por 0,05 g de tripsina 1:250 (DIFCO®) y 0,02 g de EDTA (Sigma®) por cada 100 mL de PBS. La disolución se mantuvo con las células durante 3 minutos a 37°C. Para neutralizar la actividad de la tripsina se añadieron 2-3 volúmenes de DMEMc. La suspensión se centrifugó 10 minutos a 1.200 rpm y el pellet se resuspendió en DMEMc y se resembró para su multiplicación.

Los pases máximos alcanzados en las líneas celulares no superaron: en las MSCs pase 10 y en condrocitos pase 3.

Para criopreservar las células, se realizó el mismo protocolo de criopreservación para todos los tipos celulares [301]. Las células recogidas por tripsinización se resuspendieron en medio de criopreservación que contenía 80% SFB (Sigma®), 10% DMEM (Sigma®) y 10% DMSO (Sigma®) con una densidad celular de 1×10^6 células/mL de medio de criopreservación. Las células fueron resuspendidas en el medio de criopreservación y congeladas en un gradiente lento de criopreservación introduciendo los crioviales protegidos con algodón hidrofóbico a -80°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo los viales se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs POR MEDIO DE MARCADORES DE SUPERFICIE

3.4.1. Caracterización de ASCs y BMSCs de caballo y de humano mediante marcadores de superficie por citometría de flujo

Se analizaron los marcadores de superficie específicos de células troncales mesenquimales CD73, CD90 y CD105 por medio de citometría de flujo. Los anticuerpos utilizados fueron los mismos para los ensayos realizados en caballos y en humanos. El protocolo para marcar las células para su análisis por citometría fue el siguiente:

Después de tripsinizar las células se resuspendieron 1×10^5 células obtenidas en 1 mL de tampón frío, el cual contenía 0,2% BSA (Sigma[®]) y 0,1% de azida sódica (Sigma[®]) en PBS (pH=7,4). Las muestras fueron centrifugadas 5 minutos a 1.200 rpm y posteriormente el pellet obtenido fue resuspendido en 50 μ L de tampón frío.

A cada suspensión celular se añadió 50 μ L de tampón frío y 50 μ L de dilución 1:100 en tampón frío del anticuerpo primario (mouse): CD73, CD90 y CD105 (PharMingen/BD Biosciences[®]). Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 4°C y posteriormente, se centrifugaron las muestras 5 minutos a 1.200 rpm para eliminar el resto de sobrenadante.

Se resuspendieron las células en 100 μ L de una dilución 1:50 del anticuerpo secundario biotinilado [rat antimouse IgG1 (Sigma[®])] en tampón frío y se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad.

Se eliminó el resto de sobrenadante por centrifugación a 1.200 rpm durante 5 minutos y al pellet se le añadió 100 μ L de una solución con estreptavidina marcada con Alexa 488nm o Alexa 647nm

dependiendo del experimento realizado. Se incubaron las células durante 20 minutos a 4°C protegidas de la luz.

Se realizaron dos lavados con un mL de tampón frío para eliminar restos y precipitados, seguidos de una centrifugación de 5 minutos a 1.200 rpm. El pellet obtenido tras los lavados se resuspendió en 1 mL de tampón frío.

Las muestras fueron analizadas por medio del citómetro de flujo Cyan ADP Dako® equipado con tres láseres con un recuento de 10.000 células por adquisición. Las longitudes de onda de excitación y emisión para los dos fluorocromos utilizados fueron: Alexa 488 (excitación 488 nm y emisión 530 nm) y Alexa 647 (excitación 650 nm y emisión 665 nm).

3.4.2. Caracterización de ASCs y BMSCs de caballo y de humano mediante marcadores de superficie por microscopía confocal

Esta técnica se empleó para determinar la presencia de los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 en los cultivos en monocapa de ASCs y BMSCs de caballo y de ASCs de humano por medio del análisis por microscopía confocal. Para ello se utilizaron como anticuerpos primarios: CD73, CD90 y CD105 (Abcam®). Estos anticuerpos fueron iguales tanto para caballo como para humano y los mismos que utilizamos en el ensayo de citometría de flujo del apartado anterior.

Las células fueron sembradas a una densidad de 10.000 células por pocillo en Chamber Slide® (Lab-Tek®) de 2 pocillos hasta obtener una confluencia superior al 90%.

En primer lugar, se realizaron 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se fijaron las muestras con paraformaldehído al 2% (Merck®) durante 15 minutos.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS con una duración de 10 minutos cada lavado y se llevó a cabo la permeabilización de las muestras con Triton X-100 (Sigma®) 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras 3 veces con PBT [PBS e Igepal CA-630 (Sigma®)] con una concentración 1:1, con una duración de 5 minutos cada lavado y otros dos lavados de 5 minutos cada uno con WB [Wash Buffer: 0,001% de Igepal, 3mg/mL de BSA (Albúmina de Suero Bovino) en PBS].

Se incubaron las muestras con el anticuerpo primario, con 10% de NGS (Sigma®) disuelto en WB, durante 24 horas a 4°C en agitación. Transcurrido el tiempo, se lavaron las muestras 3 veces con PBT durante 5 minutos cada uno y otros 2 lavados con WB de 5 minutos cada uno.

Se incubaron las células con una dilución 1:100 del anticuerpo secundario biotilado [rat antimouse IgG1 (Sigma®)] diluido en WB durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 5 veces con PBT con una duración de 5 minutos cada lavado.

Posteriormente, se incubaron las muestras con una solución estreptavidina marcada con Alexa 488nm o Alexa 647nm dependiendo del experimento realizado en WB, durante 24 horas a 4°C de temperatura ambiente en oscuridad.

Se llevaron a cabo los últimos lavados con PBT, 5 lavados 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, con el fin de teñir los núcleos celulares, seguido de 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno.

Se montaron las muestras en un portaobjetos con una gota de medio de montaje para sellar con un cubreobjetos.

Las muestras se analizaron por medio del 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. Las longitudes de onda de excitación y emisión para los dos fluorocromos utilizados fueron: Alexa 488 (excitación 488 nm y emisión 530 nm) y Alexa 647 (excitación 650 nm y emisión 665 nm).

3.5. TÉCNICAS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

3.5.1. Inducción de la condrogénesis

Para inducir la condrogénesis, las células fueron sembradas hasta alcanzar el 90% de confluencia. Alcanzado este porcentaje se reemplazó el medio de cultivo por medio de diferenciación condrogénica el cual estaba compuesto por:

- DMEM con elevada concentración de glucosa (PAA[®])
- 10 ng/mL Transforming Growth Factor β 1 Human (TGF β 1) (Sigma[®])
- 6,25 μ g/mL ITS+ liquid Media Supplemented (100x) (Sigma[®])
- 50 nM de 2 phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma[®])
- 1% solución antibiótica-antimicótica (100x) (Sigma[®])

Se mantuvieron las células con este medio reemplazándose cada 2-3 días a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y 5% CO₂ durante 15 días antes de analizar la diferenciación por medio de

tinciones histológicas. Como control negativo se tomaron las células MSCs sembradas con medio DMEMc.

3.5.1.1. Tinción con azul alcian

Para evaluar la diferenciación condrogénica utilizamos la tinción con azul alcian 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.

Para ello, se lavaron los cultivos con PBS durante 5 minutos para seguir con la fijación con paraformaldehído (Merck®) al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras con HCL (Paltex®) 0,1N durante 5 minutos y posteriormente, se tiñeron con azul alcian 8 GX (Sigma®) al 1% en HCL 0,1N (pH=1) durante toda la noche a temperatura ambiente.

Se lavaron 2 veces con HCL 0,1N durante 5 minutos cada vez y un último lavado con agua destilada con una duración de 5 minutos.

Posteriormente, se observaron las muestras al microscopio óptico.

3.5.1.2. Cuantificación de los Glicosaminoglicanos (GAG) en la condrogénesis

Antes de cuantificar la producción de GAG por las células diferenciadas, se realizó la recta patrón con condroitín sulfato diluido en agua destilada. Las concentraciones utilizadas fueron las indicadas en la tabla 1.

| | |
|--|----------------|
| Concentraciones de Condroitín sulfato | 250 µg/mL |
| | 125 µg/mL |
| | 62,5 µg/mL |
| | 31,25 µg/mL |
| | 15,625 µg/mL |
| | 7,8125 µg/mL |
| | 3,90625 µg/mL |
| | 1,952135 µg/mL |
| | 0 µg/mL |

Tabla 1: Concentraciones de condroitín sulfato utilizadas para realizar la recta patrón de cuantificación de los glicosaminoglicanos por medio del análisis colorimétrico a 600 nm.

Las matrices extracelulares de las muestras diferenciadas fueron digeridas por medio de la actividad de la proteinasa K a una concentración de 1mg/mL diluida en tampón Tris/EDTA (pH 7,6) durante 16 horas a 56°C. La actividad enzimática se detuvo sometiendo las muestras 10 minutos a 90°C.

Se diluyeron 10 µL de la muestra en 10 µL de una solución de 0,027 M de H₂SO₄, 0,375 % de Tritón X-100 y 4 M de guanidina HCl en agua destilada. A esta mezcla se le añadieron 100 µL de la solución de tinción compuesta por 0,25% de Tritón X-100, 0,018M de H₂SO₄ y 10% de dilución del colorante azul alcian (0,1g de azul alcian 8GS en 10 mL de 18mM de H₂SO₄). Incubamos la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugó a 16.000g durante 10 minutos a 4°C.

El pellet obtenido se resuspendió en 500 µL de una dilución de guanidina HCl 8M en agua destilada y se cuantificó su absorbancia a 600 nm en el lector de espectrofotometría multiplaca Multiskan GO (Thermo Scientific®).

Se cuantificó la cantidad total de DNA de las células diferenciadas con el fin de estandarizar la concentración de GAG en función de la cantidad de células. Se lisaron las células de cada muestra con 100µL de Triton X-100 al 0,5% en PBS durante 5 minutos a 37°C. Sobre este medio se añadieron 100µL de solución Pico-Green (99,5% de TE + 0,05% de reactivo Pico-Green). Se incubaron las muestras 5 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz y se cuantificó la fluorescencia en lector de fluorescencia de placas Synergy HT Bio-Tek® con fluorescencia de excitación a 480 nm y de emisión a 520 nm. La eficiencia de la condrogénesis se expresó como:

$$\text{Eficiencia de la condrogénesis} = \frac{\text{Concentración de GAG } (\mu\text{g})}{\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g})}$$

3.5.2. Inducción de la adipogénesis

Las células fueron sembradas hasta alcanzar el 90% de confluencia. Alcanzado este porcentaje se reemplazó el medio de cultivo por medio de diferenciación adipogénica el cual está compuesto por:

- DMEM con elevada concentración de glucosa (PAA®)
- 10% SFB (Sigma®)
- 1% solución antibiótica-antimicótica (100x) (Sigma®)
- 500 µM IBMX (isobutil-metil-xantina)(AppliChem®)
- 1 µM Dexametasona (Sigma®)
- 10 µM Insulina (Sigma®)

- 150 μ M Indometacina (Sigma[®])

Se mantuvieron las células con este medio remplazándose cada 2-3 días a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y 5% CO₂, durante 15 días antes de analizar la correcta diferenciación por medio de tinciones histológicas. Como control negativo se tomaron las células MSCs sembradas con medio DMEMc.

3.5.2.1. Tinción oil red O

Esta técnica se utilizó para determinar la presencia de lípidos y triglicéridos intracelulares en los cultivos celulares diferenciados. Las vacuolas lipídicas se tiñen de color rojo.

Para ello, tras lavar las muestras con PBS fueron fijadas con paraformaldehído (Merck[®]) al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se preparó la solución de trabajo de oil red O (Sigma[®]) la cual estaba formada por 0,5 g de oil red O diluidos en 100 mL de isopropanol (Sigma[®]) justo antes de ser utilizada para teñir, ya que el colorante precipita con facilidad. Se eliminó el fijador y, después de varios lavados con PBS, se añadió la dilución de colorante oil red O y se mantuvo 1 hora a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras varias veces con agua destilada para eliminar el exceso de tinción y algún precipitado que se pudiera formar.

Se eliminó el agua destilada y se analizó la coloración por medio de microscopía óptica.

3.5.2.2. Cuantificación colorimétrica del oil red O

Después de haber teñido las células con la tinción oil red O, se procede a cuantificar la tinción en cada muestra. Para ello, se incuban

las células con isopropanol al 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se cuantifica la colorimetría del medio resultante a 500 nm en el lector de espectrofotometría multiplaca Multiskan GO (Thermo Scientific®).

3.5.3. Inducción de la osteogénesis

Las células fueron sembradas hasta alcanzar el 90% de confluencia. Alcanzada esta confluencia se remplazó el medio de cultivo por medio de diferenciación osteogénico el cual está compuesto por:

- DMEM con una elevada concentración de glucosa (PAA®)
- 10 μ M 2 phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma®)
- 10 mM β glycerolphosphate disodium salt hydrate (Sigma®)
- 0,1 μ M dexametasona (Sigma®)
- 1% solución antibiótica-antimicótica (100x) (Sigma®)

Se mantuvieron las células con este medio remplazándose cada 2-3 días a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y 5% CO₂ durante 15 días, antes de analizar la correcta diferenciación por medio de tinciones histológicas. Como control negativo se tomaron las células MSCs sembradas con medio DMEMc.

3.5.3.1. Tinción von Kossa

Esta técnica se utilizó para determinar la presencia de depósitos de fosfato cálcico en los cultivos diferenciados. Los fosfatos cálcicos reaccionan con el nitrato de plata formando fosfato de plata dando color negro. Por otra parte, con esta tinción se obtiene una coloración rosa del citoplasma celular y de los núcleos, de color rojo.

Para ello, tras lavar las muestras con PBS fueron fijadas con paraformaldehído (Merk®) al 4% durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras con agua destilada y se tiñeron con nitrato de plata (Sigma®) al 1% en agua destilada incubándose 30 minutos a temperatura ambiente bajo luz ultravioleta.

Eliminado el exceso de colorante, se lavaron tres veces las muestras con agua destilada, cada lavado de 5 minutos de duración, y posteriormente, se añadió tiosulfato sódico (Sigma®) al 5% en agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se eliminó la solución de tiosulfato sódico y se realizaron 3 lavados con agua destilada de 5 minutos de duración cada uno. Se contrastaron los núcleos con Nuclear Fast Red (Sigma®) al 0,1% en sulfato de aluminio durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras 5 lavados con agua destilada de 5 minutos cada uno, se observaron las muestras al microscopio óptico.

3.5.3.2. Tinción rojo alizarín S

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.

Para ello, tras lavar las muestras con PBS fueron fijadas con paraformaldehído (Merk®) al 4% durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las muestras tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de fijador, después se añadió el colorante rojo alizarín S (Sigma®) 40 mM a pH 4,2 y se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se eliminó el exceso de colorante y se lavaron varias veces las muestras con agua destilada antes de ser analizadas con microscopía óptica.

3.5.3.3. Cuantificación colorimétrica de rojo alizarin S

Una vez teñidas las células con rojo alizarin S (Sigma[®]), se añadió una solución CPC al 10% en PBS al 10 mM (pH 7) hasta diluir los depósitos de calcio teñidos.

Se cuantifica la colorimetría a 550 nm en el lector de espectrofotometría multiplaca Multiskan GO (Thermo Scientific[®]).

3.6. TRANSFECCIONES, ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN Y AISLAMIENTO DE UNA LINEA CELULAR DE CABALLO MEDIANTE TRANSFECCIÓN ESTABLE

Las transfecciones se realizaron con el plásmido pEF1 α -GFP el cual produce la proteína verde fluorescente (ex=488 nm / em=530 nm). Para ello se transfectaron las MSCs de caballo con dos productos comercializados (Lipofectamine 2.000[®] y SAFectin[®]) y se aislaron las células GFP⁺ con el fin de mantener una población estable de células verde fluorescente para continuar con los experimentos.

3.6.1. Transfección con Lipofectamine 2.000[®]

Se sembraron ASCs y BMSCs de caballo en placas de 24 pocillos con una densidad de 75.000 células por pocillo y se incubaron 24 horas hasta alcanzar una confluencia superior al 90% en cada pocillo.

El producto lipotransfectante Lipofectamine 2.000 (Invitrogen[®]) se diluyó en medio DMEM (Sigma[®]) o en medio Opti-MEM (Gibco[®]) (el medio que recomienda la casa comercial para mejorar la eficiencia de transfección), en función del tiempo en el que las células permanecieron con el medio transfectante. Cuando las células fueron mantenidas con el medio lipotransfectante durante 24 horas el medio

de cultivo usado fue DMEM y cuando las células se mantuvieron durante 5 horas con el medio lipotransfectante se utilizó Opti-MEM[®] como medio diluyente. Se utilizó el medio Opti-MEM[®] ya que es el medio que recomienda la casa comercial para la transfección con este producto en tiempos cortos de cultivo.

Se utilizaron dos ratios [volumen de Lipofectamine 2.000[®] (μL) / cantidad de plásmido GFP (μg)] diferentes. El primer ratio utilizado fue el recomendado por la casa comercial 1:2,5 y el segundo ratio utilizado fue 1:5. Todos los experimentos realizados están indicados en la tabla 2.

3.6.2. Transfección con SAFEctin[®]

Se sembraron ASCs y BMSCs de caballo en placas de 24 pocillos con una densidad de 75.000 células por pocillo y se incubaron 24 horas hasta alcanzar una confluencia superior al 90% en cada pocillo.

El producto lipotransfectante SAFEctin (Deliverics[®]) fue diluido en medio DMEM (Sigma[®]) ya que, como indica la casa comercial, es posible diluir su producto lipotransfectante en el medio de cultivo original sin afectar sus propiedades transfectantes. Las células permanecieron con el medio transfectante 24 y 48 horas, tiempos recomendados por la casa comercial.

Se utilizaron dos ratios [volumen de SAFEctin[®] (μL) / cantidad de plásmido GFP (μg)] diferentes. Los ratios que se utilizaron fueron los recomendados por la casa comercial: el primero fue 1:5 y el segundo fue 1:6. Todos los experimentos realizados están indicados en la tabla 2.

| | Lipofectamine 2.000 [®] | | SAFEctin [®] | |
|-----------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| | <i>Ratio 1:2,5</i> | <i>Ratio 1:5</i> | <i>Ratio 1:5</i> | <i>Ratio 1:6</i> |
| 5 horas | Opti-MEM [®] | Opti-MEM [®] | - | - |
| 24 horas | DMEMc | DMEMc | DMEMc | DMEMc |
| 48 horas | - | - | DMEMc | DMEMc |

Tabla 2: Indica el medio de cultivo añadido con los diferentes ratios y tiempos empleados para la transfección con los dos productos lipotransfectantes.

3.6.3. Análisis de la eficiencia de la transfección

La eficiencia de transfección fue cuantificada mediante el análisis de su fluorescencia por citometría de flujo.

Tras ser realizada las transfecciones indicadas en los apartados 3.6.1 y 3.6.2, las células fueron tripsinizadas y después de centrifugarlas se resuspendieron en DMEM para analizar la fluorescencia lo antes posible.

En las muestras analizadas con el citómetro de flujo Cyan ADP Dako[®] equipado con tres láseres se realizó un recuento de 10.000 células por adquisición. La longitud de onda de excitación y emisión para analizar la proteína verde fluorescente (GFP) fue: excitación 488 nm y emisión 530 nm.

3.6.4. Aislamiento de las líneas celulares con transfección estable

El plásmido pEF1 α -GFP contiene, además de la secuencia correspondiente para la expresión de la GFP, también la secuencia para la expresión de proteína resistente a la droga geneticina (G418), facilitando de este modo el aislamiento de las células en las que se haya realizado una transfección estable.

Para aislar las líneas celulares GFP positivas (GFP⁺), se tomó como punto de partida las células transfectadas en las que se había obtenido una mayor eficiencia de transfección. Para ello, tras realizar la transfección correspondiente en placas de 24 pocillos, el medio transfectante fue eliminado y sustituido con medio DMEMc. Las células fueron mantenidas con este medio durante 24 horas para mejorar la viabilidad y conseguir su multiplicación. Pasadas las 24 horas, el medio fue sustituido por medio DMEMc suplementado con geneticina G418 (Sigma[®]).

Se calculó la concentración de G418 adecuada a la cual las células no transfectadas morían y las células transfectadas podían multiplicarse correctamente. Estas concentraciones fueron distintas para los dos tipos celulares: para ASCs fue de 500 µg/mL y para BMSCs fue de 450 µg/mL.

Las células se mantuvieron con el medio suplementado con G418 durante un mínimo de 15 días hasta poder aislar los clones GFP⁺. Tras analizar la fluorescencia, las células GFP⁺ fueron tripsinizadas y aisladas para su multiplicación. El medio de mantenimiento de la línea celular durante su multiplicación estaba compuesto por medio DMEMc suplementado con G418 a concentración de 200 µg/mL.

La fluorescencia final fue analizada con el citómetro de flujo Cyan ADP Dako[®] y microscopía de fluorescencia.

3.7. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para poder estudiar la ultraestructura celular y la distribución de los orgánulos tanto de las MSCs transfectadas de caballo como de las no transfectadas, se realizó microscopía de transmisión en ambas muestras.

3.7.1. Fijación de las muestras

Antes de la fijación de las muestras, las células fueron recogidas y cultivadas en forma de pellet. Esta técnica consiste en centrifugar un millón de células hasta obtener un pellet y cultivarlas de dicha forma con medio de cultivo. El cultivo en pellet se mantuvo durante dos días hasta obtener una muestra homogénea y fácil de manipular.

Obtenido el pellet se lavaron las muestras dos veces con PBS para eliminar los posibles residuos y después se fijaron las muestras con glutaraldehído al 2,5 % en PBS 0,1M durante 2 horas a 4°C. Se retiró el fijador y se lavó dos veces con PBS con una duración de 10 minutos cada lavado.

Posteriormente se realizó la post-fijación de las muestras, la cual se llevó a cabo por medio de tetróxido de osmio al 1 % en PBS durante 3 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, las muestras se lavaron tres veces con PBS con una duración de 10 minutos cada lavado.

3.7.2. Inclusión y deshidratación de las muestras

A continuación, se llevó a cabo la inclusión de las muestras en gelatina al 15 % en PBS. Se dejaron enfriar las muestras y se recortaron hasta obtener un cubo de 2 mm.

El siguiente paso es la deshidratación, la cual se realizó por medio de una serie creciente de etanol: 30%, 50%, 70% y 90% con una duración de 30 minutos cada inclusión a temperatura ambiente. Para terminar la deshidratación se realizaron 3 pases en etanol 96% de 30 minutos cada pase y otros tres pases en etanol absoluto también de 30 minutos cada uno.

Deshidratadas las muestras, se hicieron tres pases de una hora de duración cada uno en óxido de propileno a temperatura ambiente

y se infiltraron las muestras en óxido de propileno con resina epoxi 1:1.

El siguiente paso fue la infiltración de las muestras en resina Epon 812 pura durante 24 horas a temperatura ambiente. Se encapsularon las muestras en Epon puro y se polimerizaron a 60°C durante 24 horas.

3.7.3. Preparación de las muestras y visualización

Se realizaron cortes semifinos sucesivos de 1 μm de grosor hasta obtener el corte con la imagen más correcta para la visualización de las muestras. Estos cortes semifinos se realizaron utilizando un ultramicrotomo LKB V del Servicio de Microscopía de la Universidad de León. Los cortes resultantes se recogieron en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, que se colocaron sobre una placa a 65°C hasta su desecación. Se realizó una tinción con azul de toluidina al 0,5% en una solución de borato sódico en agua bidestilada al 1%.

Visualizadas las muestras y seleccionadas las zonas que más interesaban, se realizaron cortes ultrafinos que fueron contrastados siguiendo el método de doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. El acetato de uranilo se preparó mezclándolo con etanol al 95% a partes iguales con una solución saturada del colorante en agua bidestilada. El citrato de plomo se obtuvo de la mezcla de 1,3 g de nitrato de plomo cristalizado con 1,78 g de citrato sódico tribásico en 30 mL de agua destilada y se agitó la muestra durante 30 minutos antes de añadir 8 mL de hidróxido sódico 1 N y 9 mL de agua destilada.

La técnica de tinción se llevó a cabo en dos cámaras. En una de las ellas, se depositaron varias gotas de acetato de uranilo sobre el papel parafinado, y sobre ella se colocaron las rejillas y se mantuvieron durante 20-30 minutos en oscuridad. Transcurrido este

tiempo, las rejillas se lavaron en agua bidestilada por inmersión tres veces consecutivas y se dejaron secar al aire. En la otra cámara de tinción se depositaron de igual forma las gotas de citrato de plomo, sobre las cuales se insertaron las rejillas teñidas con acetato de uranilo una vez secas, y se mantuvieron durante 3-5 minutos. A continuación, se lavaron por inmersión en agua bidestilada 3 veces consecutivas y se dejaron secar al aire sobre papel de filtro.

Una vez secas, las rejillas se recogieron en un portarrejillas quedando listas para su visualización por el microscopio electrónico. Su examen se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1010 Japan[®]) empleando voltajes de 80 KV.

3.8. PRODUCCIÓN DE MATRICES EXTRACELULARES A PARTIR DE MSCs DE CABALLO

3.8.1. Producción de matrices extracelulares a partir de medio ascórbico

Se sembraron ASCs y BMSCs de caballo en placas de 24 pocillos a una densidad de 75.000 células por pocillo y se cultivaron con medio DMEMc hasta alcanzar una confluencia superior al 95%. Alcanzada la confluencia necesaria se retiró el medio de cultivo y se añadió el medio ascórbico necesario para producir las matrices extracelulares, compuesto por:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma[®])
- 10 % Suero Fetal Bovino (SFB, Sigma[®])
- 1 % solución antibiótica-antimicótica (Sigma[®])
- 50 µM de ácido ascórbico (Sigma[®])

El medio fue cambiado cada 2-3 días y se mantuvo durante 15 días hasta que las células formaron la matriz extracelular.

3.8.2. Producción de matrices extracelulares a partir de medio condrogénico

Se sembraron ASCs y BMSCs de caballo en placas de 24 pocillos a una densidad de 75.000 células por pocillo y se cultivaron con medio DMEMc hasta alcanzar una confluencia superior al 95%. Alcanzada la confluencia necesaria se retiró el medio de cultivo y se añadió el medio condrogénico necesario para producir las matrices extracelulares, compuesto por:

- DMEM con elevada concentración de glucosa (PAA[®])
- 10 ng/mL Transforming Growth Factor β 1 Human (TGF β 1) (Sigma[®])
- 6,25 μ g/mL ITS+ liquid Media Supplemented (100x) (Sigma[®])
- 50 nM de 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma[®])
- 1% solución antibiótica-antimicótica (100x) (Sigma[®])

El medio se cambió cada 2-3 días y fue mantenido durante 15 días hasta que las células formaron la matriz extracelular.

3.8.3. Aislamiento de las matrices extracelulares

Producidas las matrices extracelulares se procedió a eliminar las células para aislar la matriz libre de células (DSCM).

Para ello, se retiró el medio de cultivo y se lavó varias veces con PBS para eliminar los posibles restos que alterasen el aislamiento. Eliminado el PBS se añadió una dilución de Triton X-100 al 0,5 % con NH₄OH 20 mM en PBS y se incubaron las muestras durante 5 minutos a 37°C.

Tras observar que las células habían muerto y que las matrices no contenían células, se eliminó el resto de solución de aislamiento y

se lavaron varias veces con PBS (Figura 6). Se recogieron las matrices y se almacenaron en PBS con un 5% de solución antibiótica-antimicótica a 4°C durante un plazo máximo de 3 meses.

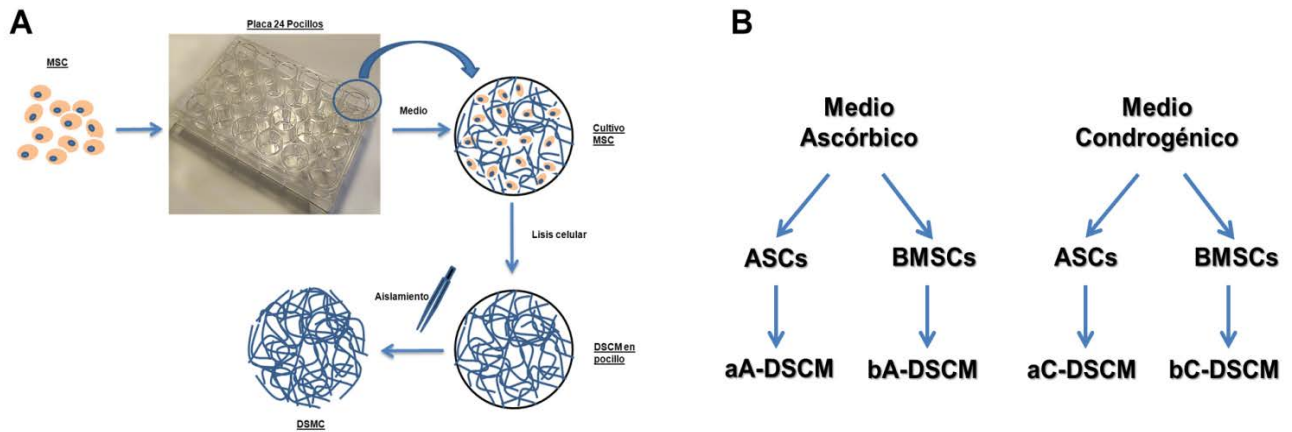


Figura 6: Esquema del proceso de producción y aislamiento de las matrices extracelulares derivadas de MSCs (DSCMs) de caballo (**A**). Nomenclatura asignada a las matrices celulares descelularizadas procedentes de ASCs y BMSCs (**B**).

3.8.4. Tratamiento de las DSCMs

Antes de utilizar las matrices en sucesivos ensayos, las muestras fueron tratadas con DNAsa para eliminar posibles restos de DNA resultantes de su aislamiento.

Para ello, las muestras se lavaron dos veces con PBS y se añadió una dilución de DNAsa I (EURx®) a concentración final de 100 unidades/mL de PBS con 10% de tampón de DNAsa I. Se incubaron las matrices con la disolución durante 10 minutos a 37°C.

Pasado el tiempo, se eliminó el resto de solución de DNAsa y se realizaron dos lavados de PBS antes de utilizar las matrices en otros ensayos.

3.9. CARACTERIZACIÓN DE LAS DSCMs

3.9.1. Tinción con azul alcian

Para caracterizar y visualizar las matrices extracelulares obtenidas se realizó una tinción con azul alcian. Esta técnica se utiliza para determinar la presencia de mucopolisacáridos ácidos en las matrices extracelulares. Se basa en la tinción de los grupos sulfóxido de los glicanos la cual muestra un color azul.

Se realizaron los mismos pasos de tinción indicadas para las muestras de cultivos diferenciados en el apartado 3.5.1.1

3.9.2. Análisis proteico por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-Page)

3.9.2.1. Aislamiento de matrices extracelulares de tendón y cartílago

Se utilizaron como controles del análisis proteico matrices extracelulares de tendón y cartílago de caballo. Ambos tejidos fueron obtenidos a partir de muestras procedentes del Matadero de León.

Antes de aislar las proteínas de las matrices se procedió a eliminar las células que formaban dichos tejidos mediante digestión. Los tejidos se dividieron en fragmentos lo más finos y pequeños posibles para facilitar la lisis celular. Las células fueron lisadas por medio del tampón de lisis (apartado 3.8.3). Los tejidos permanecieron sumergidos en este tampón 20 minutos a 37°C.

Eliminadas las células se procedió a triturar el tejido con un mortero al que se añadió nitrógeno líquido. Pulverizados los tejidos se procedió al aislamiento proteico.

3.9.2.2. Aislamiento de proteínas

El análisis proteico de las matrices extracelulares y de los controles de cartílago y tendón de caballo se realizó mediante SDS-Page.

Se aislaron las proteínas por medio de una extracción con buffer de lisis, que estaba compuesto por:

- Urea 7 M
- Thiourea 2M
- DTT 50 mM
- 2% CHAPS
- Tris 40 mM
- 1 Pastilla/10mL de Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets (Thermo Scientific®)
- A pH 8,8

Se introdujeron las muestras en esta disolución y se procedió a separar totalmente las proteínas por medio de: vortex durante 10 minutos, potter durante 3 minutos a 4°C y por último, con sonicador durante 10 minutos a 4°C.

3.9.2.3. Cuantificación de las proteínas totales (método de Bradford)

Se utilizó el método de Bradford para calcular las proteínas totales obtenidas a partir de la extracción proteica anteriormente citada y que tiene como finalidad ajustar la misma cantidad de proteína de todas las muestras.

De esta forma, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA, Sigma®) como proteína para realizar la recta patrón. Las concentraciones de BSA utilizadas se indican en la tabla 3.

| Concentración de BSA |
|----------------------|
| 1 µg/mL |
| 2,5 µg/mL |
| 5 µg/mL |
| 10 µg/mL |
| 15 µg/mL |
| 25 µg/mL |

Tabla 3: Concentraciones de albúmina sérica bovina utilizada para realizar la recta patrón del método de cuantificación proteica de Bradford.

La proteína total se disolvió en agua destilada hasta alcanzar un volumen de 800 µL de disolución, a la cual, se le añadió 200 µL de agente de Bradford (BioRad®).

Por otro lado, se hicieron diluciones de las muestras a cuantificar 1:100 y 1:200 con el extracto de proteína y agua destilada. A estas diluciones se les añadió el volumen correspondiente de agente de Bradford.

El agente de Bradford cuantifica la cantidad de proteína mediante colorimetría a 450 nm. Se cuantificó la cantidad de color por medio del lector de espectrofotometría multiplaca Multiskan GO (Thermo Scientific®).

Se ajustaron todas las muestras a una concentración final de 40 µg de proteína.

3.9.2.4. Polimerización del gel SDS-Page

Para la preparación del gel de poli(acrilamida) se realizaron las siguientes soluciones.

- Solución A: 30 g de acrilamida y 0,8 g de Bis-acrilamida en 100 mL de agua destilada
- Solución B: Tris-HCl 3M a pH 8,8
- Solución E: 2 g de acrilamida y 0,1 g de Bis-acrilamida en 20 mL de agua destilada
- Solución F: Tris- HCl 0,5M a pH 6,8

Realizadas las disoluciones citadas, se hicieron los geles. Éstos estaban compuestos por un gel separador, en la parte inferior del gel, y el gel acumulador o "stacking", en la parte superior.

Se utilizó el gel separador a una concentración de 7,5% de acrilamida. Para ello, se añadieron las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

- Solución A: 1,44 mL
- Solución B: 0,73 mL
- SDS al 10%: 58,5 μ L
- Agua destilada: 3,58 mL
- Persulfato amónico al 20%: 29,25 μ L
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etileno-diamina): 1,9 μ L

Una vez hecho el gel se incorporó con cuidado a la cámara que quedaba entre los dos cristales hasta 2 cm del borde del cristal y se añadió isopropanol para asegurar una polimerización horizontal. Polimerizado el gel, se eliminó el isopropanol y se lavó con agua para eliminar posibles restos.

Posteriormente se preparó el gel acumulador o "stacking" en la parte superior al separador. Este gel estaba compuesto por:

- Solución E: 0,625 mL
- Solución F: 0,5 mL
- SDS al 10%: 20,75 μ l
- Agua destilada: 0,927 mL
- Persulfato amónico al 10%: 12,5 μ L
- TEMED: 2,5 μ L

3.9.2.5. Preparación de las muestras

Para preparar las muestras se diluyeron a concentración 1:1 con la solución de ebullición (10 μ L de muestra + 10 μ L de solución de ebullición) la cual estaba compuesta por:

- Solución saturante de sacarosa: 96,25 μ L
- Solución F: 93,75 μ L
- Azul de Bromofenol al 0,1%: 10 μ L
- B-mercaptoetanol: 50 μ L
- SDS al 10%: 250 μ L

3.9.2.6. Desarrollo de la electroforesis

Se colocó el gel dentro de la cubeta y se llenó de tampón de electroforesis, compuesto por: 3 g/L de Tris-HCl, 14,4 g/L de Glicina y 1 g/L de SDS disuelto en agua destilada a pH 8,8. Seguidamente, se retiró el peine del gel y se cargaron 20 μ L de muestra en cada pocillo. Como marcador molecular se añadieron 8 μ L de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad®).

Se aplicó una intensidad de corriente de 80 V hasta que el frente (visible por la banda azul de bromofenol) se introdujo en el gel separador; después, se subió hasta una intensidad de 120 V y se esperó hasta que el gel llegase a la parte inferior.

3.9.2.7. Tinción del gel

Tras el desarrollo de la electroforesis, se separó el gel de los dos cristales y se eliminó el gel acumulador para realizar la tinción del gel.

Para ello, se sumergió en una solución de tinción de azul de Coomassie compuesta por:

- Azul de Coomassie al 10%
- Metanol al 50%
- Ácido acético al 10%
- Disuelto en agua destilada

El gel se mantuvo en la solución de tinción durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras ello, se eliminó el colorante y se añadió solución de desteñido compuesta por metanol al 50%, ácido acético al 10%, todo ello disuelto en agua destilada. El gel se destiñó durante 1 hora a 4°C en agitación.

3.9.3. Microscopía electrónica de barrido

Esta técnica se realizó para analizar la superficie de las matrices extracelulares con el fin de observar la disposición morfológica de las fibras proteicas.

Se lavaron las matrices extracelulares dos veces con PBS para eliminar restos sedimentados y se fijaron con glutaraldehído al 2,5% durante dos horas. Se eliminó el fijador y se lavaron tres veces con PBS, con una duración de 30 minutos cada lavado. Posteriormente, se procedió a la deshidratación de las muestras con gradiente creciente de etanol: 30%, 50%, 70%, 90% (tres pases por cada concentración) y etanol absoluto (tres pases) con 10 minutos de duración cada pase.

Deshidratadas las células, se procedió a realizar el desecado por medio de la desecadora Critical Point Dryer CPD 030 (Baltec[®]), donde se sustituyó el etanol por acetona para que, después, ésta fuese sustituida por CO₂ mediante 6 lavados a temperaturas de 0-10°C.

Se montaron las muestras secas sobre moldes especiales utilizando cintas de carbono conductoras para realizar el "sputtering". Esta técnica consiste en recubrir con un metal (oro) las muestras. Para ello, se utilizó el *sputter coatter SCS 004* (Balzers[®]) obteniendo una capa de recubrimiento de oro paladio de 300 Å.

Las muestras fueron examinadas en el microscopio electrónico de barrido JSM-6480 (JEOL[®]).

3.9.4. Inmunohistoquímica de proteínas extracelulares

El ensayo de inmunohistoquímica se realizó siguiendo los pasos indicados en el apartado 3.4.2.

Los anticuerpos primarios utilizados para caracterizar las matrices extracelulares se diluyeron en una dilución de trabajo 1:100. Los anticuerpos fueron los siguientes: colágeno tipo I (monoclonal mouse anti-collagen I, Sigma[®]), colágeno tipo II (polyclonal rabbit anti-collagen II, ABcam[®]), fibronectina β1 (monoclonal rabbit anti-fibronectin, ABcam[®]), brevicano/aggrecano (polyclonal rabbit anti-brevican/aggrecan, Bioss[®]) y ácido hialurónico (polyclonal sheep anti-hyaluronic acid, ABcam[®]).

Los anticuerpos secundarios utilizados a dilución 1:100 fueron: goat anti-mouse IgG (Invitrogen[®]) y goat anti-rabbit IgG (Invitrogen[®]). El anticuerpo secundario para el ácido hialurónico comercializado estaba marcado con Alexa 488: Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-sheep IgG (ABcam[®]); por lo que no se tuvo que añadir la estreptavidina marcada con Alexa 488.

3.10. ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

3.10.1. Eficiencia de adhesión celular sobre DSCMs

Sobre cada DSCM se sembraron las células con una densidad de 100.000 células en un volumen mínimo de medio de cultivo (60 µL) sin SFB, en placa de 24 pocillos. Se incubaron las células durante una hora a 37°C para favorecer la adhesión celular.

Pasado este tiempo, las DSCM fueron lavadas con PBS dos veces para eliminar las células no adheridas y se aislaron de la placa de cultivo.

Se lisaron las células con 100µL/DSCM de Triton X-100 al 0,5% en PBS para extraer el DNA durante 5 minutos a 37°C. Sobre este medio se añadieron 100µL de solución Pico-Green (99,5% de TE + 0,05% de reactivo Pico-Green). Se incubaron las muestras 5 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz y se cuantificó la fluorescencia en lector de fluorescencia de placas Synergy HT Bio-Tek® con fluorescencia de excitación a 480 nm y de emisión a 520 nm.

La eficiencia de adhesión celular (EA) se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$EA = \frac{\textit{Fluorescencia de adhesión DSCMs}}{\textit{Fluorescencia de adhesión de células sembradas}}$$

3.10.2. Análisis del promedio del área celular utilizada sobre DSCMs

Se sembraron las células a densidad de 100.000 células por cada tipo de DSCM en un volumen mínimo de medio de cultivo (60 µL) sin SFB en placa de 24 pocillos. Estas células fueron marcadas

previamente con fluorescencia verde por medio del producto calceína AM (Invitrogen®) siguiendo el siguiente protocolo:

- Se diluyó la calceína AM 80 veces en DMSO
- Se diluyeron las células en DMEM a densidad de 5×10^5 células por mL de medio
- Se añadieron 2 μ L de dilución de calceína AM por mL de medio con células resuspendidas
- Se incubaron las células a temperatura ambiente durante 20 minutos
- Centrifugamos las células 10 minutos a 12.000 rpm y se diluyó el pellet en medio sin SFB.
- Se sembraron las células sobre las DSCMs y se incubaron una hora a 37°C para favorecer la adhesión celular.

Pasada la hora se lavaron las muestras con PBS dos veces y se analizó la fluorescencia con el microscopio confocal Nikon® D1 equipado con 3 láseres, luz de transmisión y software EZ-C1 3.70.

Las imágenes obtenidas con células fluorescentes se utilizaron para estimar el área celular ocupada por las células con el programa informático NIH Image J Software®.

3.10.3. Análisis de la proliferación celular sobre DSCMs

Para medir la proliferación celular se cuantificó la cantidad total de DNA de las muestras por medio de un producto fluorescente que se une al DNA llamado Pico-Green (Life Technologies®).

Se sembraron las células sobre las DSCMs a una densidad de 100.000 células por matriz y se cultivaron a 37°C, 5% CO₂ durante 3, 5, 8 y 12 días. Pasado este tiempo los cuatro tipos de matrices extracelulares fueron digeridas con una mezcla de colagenasa tipo I

(0,075%) y colagenasa tipo II (0,05%) en DMEM. La digestión se realizó durante 1 hora a 37°C.

Digeridas las matrices, se centrifugaron las muestras hasta obtener el pellet celular y se procedió a extraer el DNA total para cuantificarlo.

Se lisaron las células con una disolución de Triton-X100 al 0,5% en PBS. Tras agitar vigorosamente las muestras se añadió una mezcla de fenol-cloroformo-isoamilo a proporciones 25:24:1 respectivamente. Se agitaron las muestras durante 3 minutos para mezclar todas las fases y se centrifugaron 20 minutos a 12.000 rpm. Se tomó la fase acuosa superior con mucho cuidado y se añadió 1/10 del volumen aislado de acetato sódico a 300mM en agua destilada. Mezclada la muestra por volteo, se añadió 1 mL de etanol absoluto frío. Las muestras permanecieron durante 1 hora a -20°C para facilitar la precipitación del DNA y se centrifugaron durante 20 minutos a 12.000 rpm. Se lavó el precipitado de DNA con 0,7 mL de etanol al 70% para eliminar impurezas y se centrifugó a 12.000 rpm durante 4 minutos. Eliminado el etanol se dejaron secar totalmente los pellets de DNA al aire antes de añadir 50 µL de solución TE 1X estéril (Tris-HCl 10mM pH=8 y EDTA 1mM).

Suspendido el DNA se añadió 50 µL de solución Pico-Green (99,5% de TE + 0,05% de Reagente Pico-Green). Se incubaron las muestras 5 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se cuantificó la fluorescencia en el lector de fluorescencia de placas Synergy HT Bio-Tek® con fluorescencia de excitación a 480 nm y de emisión a 520 nm.

3.10.4. Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad celular se analizó mediante MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma®),

compuesto amarillo que al insertarse en las mitocondrias activas produce tonalidades azules. Esta técnica se utilizó tanto para medir la viabilidad celular tras la transfección como para cuantificar la viabilidad celular de las MSCs sembradas sobre las DSCMs.

Cuando se medía la viabilidad de las células transfectadas: se sembraron las MSCs en placa de 96 pocillos a una densidad de 25.000 células por pocillo, cultivándose a 37°C, y se siguieron los protocolos de transfección indicados en los apartados 3.6.1 y 3.6.2.

Para cuantificar la viabilidad en las células sembradas sobre DSCMs se cultivaron las células sobre las matrices a una densidad de 100.000 células por matriz a 37°C, 5% CO₂ durante 3, 5, 8 y 12 días.

Pasados los tiempos de transfección y de crecimiento, se cambió el medio de cultivo por un medio que contenía DMEM sin rojo fenol y MTT al 10% (producto diluido a 5mg/mL en PBS). Este medio se mantuvo con las células durante 3 horas a 37°C. Los cristales de MTT se disolvieron con una solución solubilizadora compuesta por un 10% de Triton X-100 en isopropanol (0,1 M HCl).

Las muestras se analizaron cuantificando su absorbancia en el lector de espectrofotometría multiplaca Multiskan GO (Thermo Scientific®) a 570 nm.

3.11. TÉCNICAS DE MONOCULTIVOS, CO-CULTIVOS Y CULTIVOS CON MEDIOS CONDICIONADOS CON CÉLULAS DE CABALLO Y DE HUMANO

3.11.1. Monocultivos y co-cultivos de células de caballo

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos con una densidad de 100.000 células por cm². Los co-cultivos se realizaron con MSCs (ASCs o BMSCs) y con condrocitos de caballo con una concentración 1:1. Las células se incubaron durante 24 horas antes

de realizar los siguientes ensayos con el fin de obtener una confluencia superior al 90%.

Pasado este tiempo se añadió medio de cultivo DMEM (2mL/pocillo) con o sin rojo fenol dependiendo del ensayo a realizar.

Las muestras analizadas en este ensayo se muestran en la tabla 4.

| |
|---------------------------|
| Condrocitos |
| Condrocitos + TNF |
| ASCs |
| ASCs + TNF |
| BMSCs |
| BMSCs + TNF |
| Condrocitos + ASCs |
| Condrocitos + ASCs + TNF |
| Condrocitos + BMSCs |
| Condrocitos + BMSCs + TNF |

Tabla 4: Ensayos realizados con monocultivos y co-cultivos de condrocitos y MSCs de caballo donde TNF significa la adición de TNF, que será descrita en el apartado 3.11.3.

3.11.2. Monocultivos y co-cultivos en humano con y sin condroitín sulfato

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad de 100.000 células por cm². En los co-cultivos se sembraron ASCs y condrocitos de humano a una concentración 1:1. Las células

se incubaron durante 24 horas antes de realizar los siguientes ensayos con el fin de obtener una confluencia superior al 90%.

En alguna de las condiciones experimentales de los cultivos de humano se les añadió condroitín sulfato (CS, Bioibérica®). La concentración de condroitín sulfato utilizado es la recomendada por la casa comercial: 200 ng/mL [302].

Las muestras analizadas en este ensayo se muestran en la tabla 5.

| |
|--------------------------------------|
| Condrocitos |
| Condrocitos + TNF |
| Condrocitos + CS |
| Condrocitos + CS + TNF |
| ASCs |
| ASCs + TNF |
| ASCs + CS |
| ASCs + CS + TNF |
| Condrocitos + ASCs |
| Condrocitos + ASCs + TNF |
| Condrocitos + ASCs + CS |
| Condrocitos + ASCs + CS + TNF |

Tabla 5: Ensayos realizados con monocultivos y co-cultivos de condrocitos y MSCs de humano donde TNF significa la adición de TNF, que será descrita en el apartado 3.11.3, y CS significa la concentración de 200 ng/mL de condroitín sulfato añadida al medio de cultivo.

3.11.3. Inducción de la inflamación

Para inducir la inflamación fue añadido al medio de cultivo TNF a concentración de 25 ng/mL. Fueron utilizados dos tipos distintos de TNF en función de las células del ensayo: para ensayos realizados con células de caballo el TNF utilizado fue TNF equino de la casa comercial Kingfisher-Biotech® y para los ensayos con células de humano el TNF utilizado fue TNF de humano de la casa comercial PreproTech®.

Las células permanecieron con el medio pro-inflamatorio durante 12 horas antes de realizar los análisis que serán descritos posteriormente.

3.11.4. Medios condicionados

Los medios de ASCs y BMSCs de caballo con y sin TNF fueron tomados tras 12 horas de incubación con las células y almacenados a -80°C.

Se sembraron condrocitos de caballo en placas de 6 pocillos a una densidad de 100.000 células/cm² y se incubaron durante 24 horas hasta alcanzar una confluencia superior al 90%.

Posteriormente, se cambiaron los medios de cultivo por los medios condicionados obtenidos a partir de las MSCs. Este medio se mantuvo con las células durante 24 horas y se añadió TNF en los casos que fuesen oportunos. Las muestras analizadas fueron los siguientes:

Condrocitos + Medio ASCs**Condrocitos + Medio ASCs-TNF****TNF + Condrocitos + Medio ASCs****TNF + Condrocitos + Medio ASCs-TNF****Condrocitos + Medio BMSCs****Condrocitos + Medio BMSCs-TNF****TNF + Condrocitos + Medio BMSCs****TNF + Condrocitos + Medio BMSCs-TNF**

Tabla 6: Ensayos realizados con medios condicionados de MSCs de caballo en condrocitos de caballo donde TNF significa la adición de TNF, que fue descrita en el apartado 3.11.3 y medio MSCs-TNF indica que el TNF fue añadido al producir el medio condicionado.

3.12. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CO-CULTIVOS

La proliferación fue analizada mediante colorantes de superficie que tiñen cada tipo celular con un fluorocromo distinto.

3.12.1. Tinción verde

Se tiñeron con fluorescencia verde las células correspondientes de caballo y humano (ASCs y BMSCs en el caso de los cultivos con células de caballo, y condrocitos en el caso de cultivos con células de humano). El kit utilizado para la tinción fluorescente verde fue *Cell Trace CFSE kit* (Molecular Probes, Invitrogen®).

El vial del colorante se diluyó en 18µL de DMSO en oscuridad. Se centrifugaron las células y el pellet celular obtenido se diluyó en PBS a una concentración de 1×10^6 células por mL de PBS. Se añadió el

colorante a una concentración de 1µL de colorante por mL de PBS y se incubó a 37°C durante 20 minutos protegidos de la luz. Pasado el tiempo, se lavaron las células con cinco veces más de volumen de medio de cultivo. Se centrifugaron 10 minutos a 2.000g y se sembraron en monocultivo o co-cultivo según se indicó en el apartado 3.11.

A las 24 horas de cultivo se añadió TNF a las muestras que correspondían, y se analizó la proliferación celular a las 24, 36 y 48 horas utilizando citometría y microscopía confocal. Las células analizadas con citometría fueron tripsinizadas y diluidas en PBS para su análisis. La longitud de onda de excitación y emisión fue 492 y 517 nm respectivamente.

3.12.2. Tinción violeta

Se realizó el mismo protocolo que en apartado anterior con la diferencia de que se utilizó el kit *CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit* (Molecular Probes, Invitrogen®) y que el vial del colorante fue diluido en 20µL de DMSO.

Se analizó la proliferación celular a las 24, 36 y 48 horas con citometría y microscopía confocal. Las células analizadas en el citómetro fueron tripsinizadas y diluidas en PBS para su análisis. La longitud de onda de excitación y emisión fue 405 y 450 nm respectivamente.

3.13. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica se analizó para cuantificar la expresión tanto de genes de diferenciación condrogénica como para genes indicadores de inflamación.

3.13.1. Extracción de RNA

Para extraer el RNA de las células se utilizó el RNA extraction Kit (EURx[®]). Los pasos de aislamiento fueron los indicados por la casa comercial. Los posibles restos de DNA que pudieran quedar en la muestra fueron eliminados con una digestión con DNAsa [DNAsa I (EURx[®])] a concentración de 6 unidades de enzima por mL antes de lavar la muestra.

El DNA se precipitó con agua libre de nucleasas y se almacenaron las muestras en el congelador a -80°C. La pureza y la concentración se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop 1.000 (Thermo Scientific[®]).

3.13.2. Retrotranscripción del RNA

El RNA fue retrotranscrito a cDNA para evitar su degradación, ya que el cDNA es más estable que el RNA.

Se utilizó un μg de RNA para la actuación de la retrotranscriptasa [High Capacity cDNA reverse transcriptase (Applied Biosystems[®])]. La dilución estaba compuesta por: 2 μL de Buffer 10x, 0,8 μL de dNTPs Mix 25x (100mM), 2 μL de random primers 10x, 1 μL de MultiScribe[™] Reverse transcriptase y agua hasta completar un volumen final de 20 μL .

Se colocaron las muestras en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems[®]) y se programó la siguiente rampa de temperatura para la retrotranscripción: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C y completado el ciclo se redujo la temperatura hasta 4°C. Las muestras se almacenaron a -20°C.

3.13.3. Diseño de *Primers*

Los *primers* para realizar el análisis de la expresión génica fueron diseñados mediante el programa informático OLIGO 7[®] para todos los

genes excepto para COX-2 de caballo que fueron tomados de una referencia bibliográfica [303].

Se utilizaron las mejores condiciones de diseño de *primers* apropiadas para realizar PCR a tiempo real: longitud de 20-25 pares de bases, temperatura de hibridación en torno a 65°C, contenido en G+C (Guanina + Citosina) entre 45 y 55% y evitando la formación de dímeros y otras estructuras secundarias.

Los genes analizados fueron los siguientes:

- **ACT-β**: beta Actina
- **iNOS**: Óxido nítrico sintetasa inducible
- **IL-6**: Interleucina 6
- **COX-2**: Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
- **TGF-β**: Factor de crecimiento transformante beta
- **COL2A1**: Colágeno 2
- **SOX-9** : Región Y determinante recuadro 9
- **ACAN**: Agrecano
- **IDO-1**: Indolamina 1
- **MMP-13**: Metaloproteasa 13
- **TNF**: Factor de necrosis tumoral

Las secuencias de bases de los *primers* para los genes analizados están citadas en la Tabla 7 y 8, así como la referencia del gen donde fueron tomadas o la cita bibliográfica de la que procedió la secuencia de los *primers* de COX-2.

| Especie | Gen | Primers | Dirección | Referencia |
|-------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| CABALLO | <u>ACT-β</u> | 5'-CTGAACCCCAAGGCCAACCGCGAGA-3' | Forward | NM_001081838.1 |
| | | 5'-CGTCACCGGAGTCCATCACGATGCCAG-3' | Reverse | |
| | <u>iNOS</u> | 5'-CGTGCGTTACTCCACCAACAATGGCAAC-3' | Forward | NM_001081769.1 |
| | | 5'-CTTCCAGCCCAGGTGATGCACAG-3' | Reverse | |
| | <u>IL-6</u> | 5'-TCCAGAAGTAACCACCCCTGACCCAA-3' | Forward | NM_001082496.1 |
| | | 5'-AGGAAGGAATGCCCATGAACTACAAC-3' | Reverse | |
| | <u>COX-2</u> | 5'-CAGCATAAACTGCGCCTTTTC-3' | Forward | [303] |
| | | 5'-AGGCGGGTAGATCATTCCA-3' | Reverse | |
| | <u>TGF-β</u> | 5'-ATCGACATGGAGCTGGTGAAGCGGAA-3' | Forward | NM_001081849.1 |
| | | 5'-CTCAGGCTCGGGCTCCGTCT-3' | Reverse | |
| | <u>COL2A1</u> | 5'-AGGGCTCCAGAACATCACCTACCAC-3' | Forward | NM_001081764.1 |
| | | 5'-CCCTCAGCCCGGATCTCCACGTCA-3' | Reverse | |
| <u>ACAN</u> | 5'-CAGAGCCATCTCCACGCGCTACACC-3' | Forward | XM_001917528.2 | |
| | 5'-GTCCTCACGCCGGAAACTCATCCTT-3' | Reverse | | |

Tabla 7: Secuencia de los *primers* diseñados para caballo y la referencia del mRNA.

| Especie | Gen | Primers | Dirección | Referencia |
|---------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|-------------|
| HUMANO | <u>ACT-6</u> | 5'-CCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCT-3' | Forward | NM_001101.3 |
| | | 5'-CTGCTGTACCTTCACCGTTCCAGT-3' | Reverse | |
| | <u>IL-6</u> | 5'-ATAACCACCCCTGACCCAA-3' | Forward | NM_000600.3 |
| | | 5'-CCATGCTACATTTGCCGAA-3' | Reverse | |
| | <u>iNOS</u> | 5'-AACGTTGCTCCCATCAAGCCCTT-3' | Forward | NM_000625.4 |
| | | 5'-AGCAGCAAGTTCATCTTTCACCCACT-3' | Reverse | |
| | <u>IDO-1</u> | 5'-CATCCTGATTCTGCAAGCC-3' | Forward | NM_002164.5 |
| | | 5'-TCTGCTATGATAAAATGTGCTCT-3' | Reverse | |
| | <u>MMP-13</u> | 5'-CCAGAACTTCCAACCGTATTGATGC-3' | Forward | NM_002427.3 |
| | | 5'-TGCCTGTATCCTCAAAGTGAACAGC-3' | Reverse | |
| | <u>TGF-6</u> | 5'-CTCCGCAAAGACTTTTCCCAGACCT-3' | Forward | NM_000660.5 |
| | | 5'-CCACGGAAATAACCTAGATGGGCGGAT-3' | Reverse | |
| | <u>TNF</u> | 5'-CCTGAAAACAACCTCAGACGCCACA-3' | Forward | NM_000594.3 |
| | | 5'-TCCTCGGCCAGCTCCACGTCCC-3' | Reverse | |
| | <u>SOX9</u> | 5'-CCAGCCCCACCATGTCCGA -3' | Forward | NM_000343.1 |
| | | 5'-AGTCGTAGCCTTTGAGCACCT -3' | Reverse | |
| | <u>ACAN</u> | 5'-CTGCCCAACTACCCGGCCAT -3' | Forward | NM_001135.3 |
| | | 5'-TGCGCCCTGTCAAAGTCGAG -3' | Reverse | |
| | <u>COL2A1</u> | 5'-CCCATCTGCCCAACTGACC-3' | Forward | NM_001844.4 |
| | | 5'-CACCTTTGTCACCACGATCCC-3' | Reverse | |

Tabla 8: Secuencia de los *primers* diseñados para humano y la referencia del mRNA.

3.13.4. PCR a tiempo real (PCR cuantitativa)

La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante PCR a tiempo real. Se utilizó un marcador fluorescente verde y una polimerasa del kit SYBR Green (EURx[®]) con las siguientes cantidades:

- SG qPCR Master Mix con una concentración 1x
- Forward Primer 0,3 – 0,5 μ M
- Reverse Primer 0,3 – 0,5 μ M
- Solución ROX 400 nM
- UNG (uracil-N-glicosilasa) 0,25 U/reacción
- 600 ng de cDNA
- Se añade agua libre de DNAsas hasta un volumen final de 25 μ L

Las muestras se analizaron por duplicado en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems[®]) y se utilizó para la replicación y análisis el equipo Step One Plus real-time PCR system RT-PCR system (Applied Biosystems[®]).

Se cuantificó la expresión génica por medio de la determinación del ciclo umbral (C_T) obtenido mediante el producto de amplificación de la PCR. A partir de este dato, se calculó la expresión relativa de los genes por medio de la expresión logarítmica $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La cuantificación relativa fue calibrada con el gen endógeno (*Housekeeping*) ACT- β tanto en los ensayos realizados con células de caballo como para los realizados con células de humano.

3.14. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) DE PROSTAGLANDINA E₂

La concentración de prostaglandina E₂ en los medios obtenidos del monocultivo, co-cultivo y medios condicionados se calculó mediante la técnica de ELISA.

Para calcular la concentración prostaglandina E₂ presente, se utilizó el kit de la casa comercial Enzo Life Science Inc. (Farmingdale, NY, USA). En este ensayo se utilizó medio de cultivo sin rojo fenol (Gibco®) y no se le adicionó suero fetal bovino ni antibiótico para eliminar posibles falsos positivos.

Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti-PGE₂ IgG durante 24 horas a 4°C. Tras 24 horas se eliminó el sobrenadante y se lavaron tres veces los pocillos. Las muestras se cultivaron con la solución sustrato pNpp 1 hora a 37°C. Se paró la reacción con solución *stop* y se cuantificó la absorbancia a 570nm en el lector de espectrofotometría multiplaca Multiskan GO (Thermo Scientific®).

Se calculó la mejor dilución de medio para realizar el ensayo, se utilizaron las siguientes diluciones: medio de cultivo puro, dilución 1:10 y dilución 1:20.

3.15. CUANTIFICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

La cuantificación del óxido nítrico presente en los medios de cultivo se realizó mediante el uso del agente Griess (Griess Reagent, Sigma®).

Antes de cuantificar el óxido nítrico producido tras la inflamación, se realizó la recta patrón del óxido nítrico utilizando nitrato en las siguientes concentraciones:

| Concentración de Nitrato (μM) |
|--|
| 70 |
| 35 |
| 17,5 |
| 8,75 |
| 4,375 |
| 2,1875 |
| 0 |

Tabla 9: Concentraciones utilizadas para realizar la recta patrón con el fin de cuantificar la concentración de óxido nítrico producido tras la inflamación.

Estas concentraciones de nitrato fueron diluidas en agua destilada. Se mezcló un volumen de la dilución de la recta patrón o un volumen de muestra con un volumen del agente Griess.

Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente protegido de la luz, se cuantifica por colorimetría a 540 nm en el lector de espectrofotometría multiplaca Multiskan GO (Thermo Scientific®).

3.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los experimentos se realizó utilizando 3 o 4 réplicas ($n=3$; $n=4$) según cada experimento. El número de réplicas será indicado en el apartado de resultados para cada experimento. Los resultados serán expresados como la media acompañada de su desviación estándar.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático IBM® SPSS Statistics versión 21. Previa comparación de las medias, se analizó si los valores seguían una distribución normal. Esto se realizó por medio del análisis de estadísticos descriptivos con el análisis de *Kolmogoro-Smirno*.

La comparación de las medias de los diferentes grupos fue determinada por medio del análisis T de Student (*t-test*) cuando se comparaban dos grupos muestrales y por medio de ANOVA seguida

por un análisis Tukey *post-hoc* cuando se comparaban varios grupos muestrales.

Las diferencias significativas fueron consideradas cuando p era igual o inferior a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3.17. CUADRO EXPLICATIVO DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA

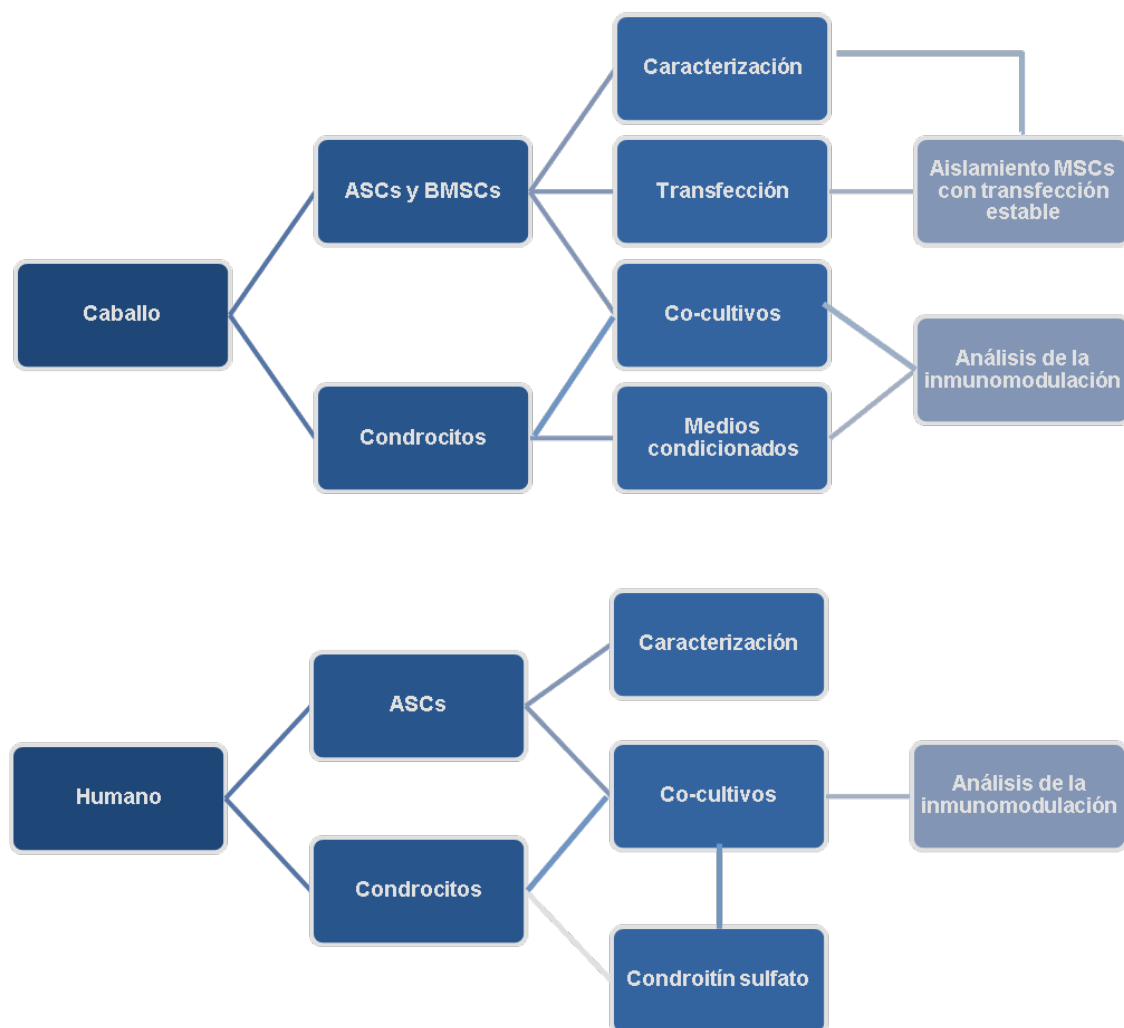


Tabla 10: Esquema detallado de la metodología realizada en el presente trabajo, especificando las especies animales, las células utilizadas y los ensayos realizados.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN DE MSCs Y CONDROCITOS DE CABALLO

4.1.1. Obtención de MSCs de caballo

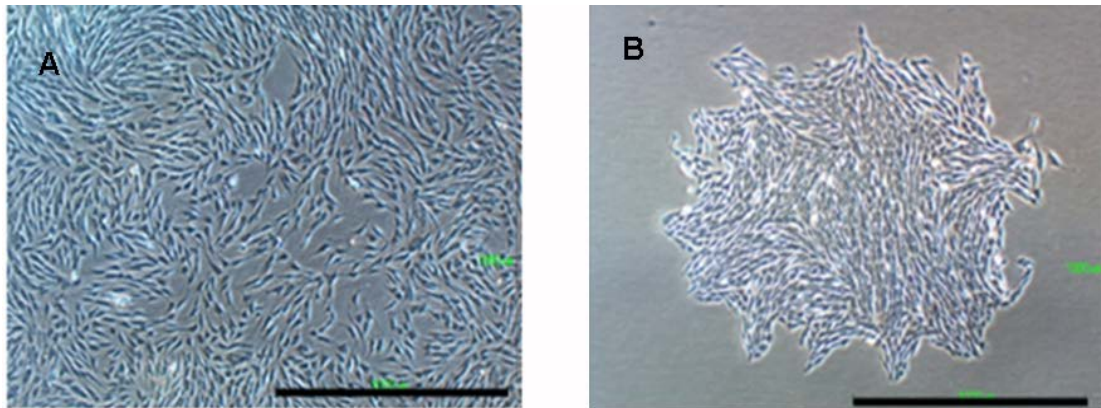
Después de la extracción del tejido adiposo se procedió al aislamiento de las células del tejido. Las células troncales mesenquimales de tejido adiposo (ASCs) fueron obtenidas mediante la digestión de la matriz extracelular con colagenasa tipo I durante dos horas de digestión. Tras la centrifugación de las muestras, los adipocitos maduros formaban una capa en la parte superior permitiendo eliminarlos de forma sencilla evitando que las ASCs, localizadas en el pellet, tuviesen residuos lipídicos. Pasadas dos horas tras la siembra de las ASCs, se pudieron diferenciar dos tipos de células: adherentes (ASCs) y no adherentes (eritrocitos y otros tipos de células sanguíneas). El día siguiente de la siembra, se procedió a lavar las células adheridas con PBS para eliminar cualquier resto procedente de la digestión y, de este modo, eliminar las células no adherentes.

El aspirado de médula ósea se realizó en la última esternebra del animal bajo sedación y control ecográfico. Las células se aislaron mediante un gradiente de densidad con el producto Ficoll[®]. Aisladas las células, se pudieron observar restos de células no adherentes que fueron eliminadas mediante lavados con PBS los días posteriores.

Las ASCs y BMSCs presentan morfologías similares (fibroblásticas), aunque se observaron diferencias en su crecimiento los días siguientes al aislamiento celular. Este crecimiento se produjo de dos maneras: las ASCs proliferaban homogéneamente hasta confluir en monocapa, mientras que las BMSCs mostraron un crecimiento más lento en forma de clones o colonias celulares aisladas que terminaron confluyendo en monocapa (Fig. 7 A-B). Tras el primer pase (de pase 0 a pase 1), las células de ambos tipos

celulares pierden este comportamiento creciendo con el mismo patrón.

En cuanto al crecimiento en función de los días, se observó que ambos tipos celulares tienen un elevado crecimiento en los primeros días de cultivo. El crecimiento celular es más notable en los primeros días en las ASCs, igualándose en el día 7 con las BMSCs, las cuales presentan un crecimiento relativamente más lento. A partir del día 8 las células presentan una disminución del crecimiento debido a la confluencia en monocapa (Fig. 7 C).



C Curva de crecimiento de MSCs de caballo

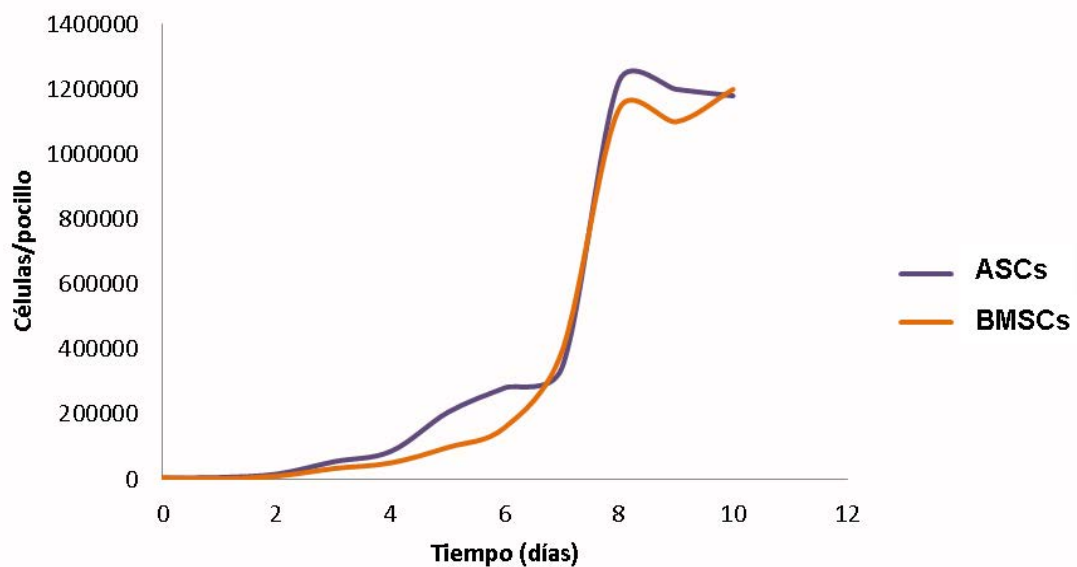


Figura 7: Morfología de las MSCs de caballo en fase 0, tras 5 días de proliferación celular: **A.** ASCs de caballo **B.** BMSCs de caballo. Escala: 1.000µm. **C.** Curva de crecimiento de MSCs de caballo en fase 0 en función de los días de cultivo en placa de 24 pocillos.

4.1.2. Obtención de condrocitos de caballo

Tras obtener la articulación del tarso de animales sacrificados en el matadero, se aislaron finas láminas del tejido cartilaginoso articular en las condiciones asépticas. La matriz extracelular se digirió con tripsina y colagenasa tipo II para aislar los condrocitos. Después de dos horas de cultivo, se pudo observar la presencia de células adherentes y no adherentes. Las no adherentes fueron eliminadas días posteriores por medio de lavados con PBS.

El número de células obtenido tras la digestión del tejido, fue inferior al recogido en las MSCs. El crecimiento de los condrocitos fue similar al crecimiento de las BMSCs de caballo, formando colonias (Fig. 8 A). La morfología fue distinta a la de las MSCs, siendo la de este tipo celular más redondeada y con menor apariencia fibroblástica.

En cuanto al crecimiento de este tipo celular en función de los días (Fig. 8 B), se pudo observar que la curva de crecimiento era comparable a la de las MSCs de caballo, obteniendo el crecimiento exponencial a partir del día 3. La población celular redujo su crecimiento en el día 7, ya que fue el momento en el que se llegó a la confluencia del pocillo.

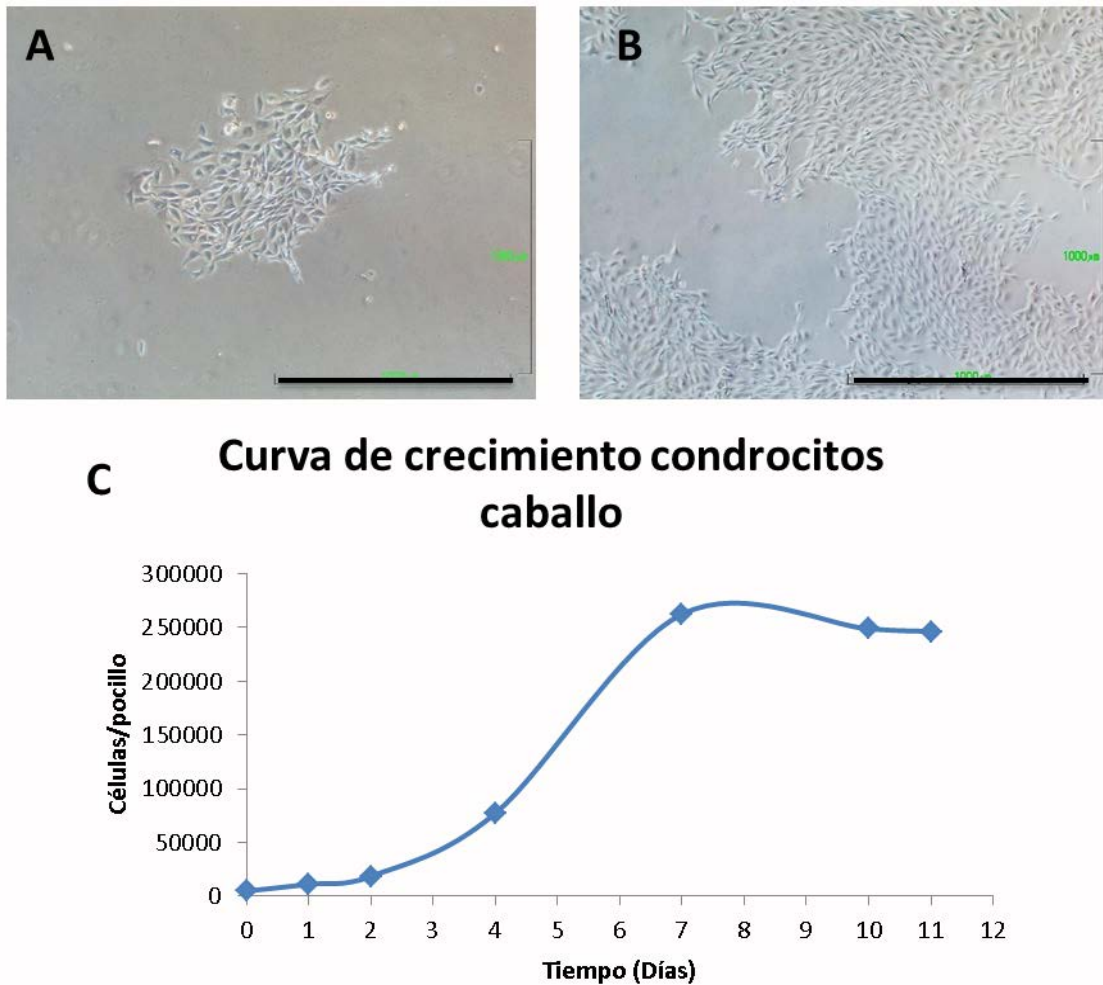


Figura 8: Morfología de los condrocitos de caballo en pase 0, en el segundo día tras la siembra (A) y tras 5 días de proliferación celular (B). Escala: 1.000 μ m. Curva de crecimiento de condrocitos de caballo en pase 0, en función de los días de cultivo en placa de 24 pocillos (C).

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs DE CABALLO

4.2.1. Caracterización de las MSCs de caballo por medio de marcadores de superficie

Tanto las ASCs como las BMSCs de caballo fueron caracterizadas mediante el análisis de los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 específicos de células troncales mesenquimales. De esta manera, la caracterización de las MSCs equinas mediante inmunofluorescencia, confirma que la expresión de los marcadores de superficie concuerda con los esperados de las MSCs.

Los marcadores de superficie fueron analizados mediante microscopía confocal y por citometría de flujo, esta última técnica fue utilizada para cuantificar el porcentaje de células positivas para los marcadores citados de la población celular.

Al analizar los marcadores de superficie por citometría de flujo, se obtuvieron porcentajes positivos para los marcadores CD90 y CD105 pero no para el marcador CD73. Esto fue debido a que el marcador CD73 no era específico de équido. Las células positivas obtenidas para cada marcador fueron: para CD73, 10,25% en ASCs y 6,06% en BMSCs; para CD90, 96,39% en ASCs y 97,22% en BMSCs; y para el marcador CD105, 93,97% para ASCs y 97,40% para BMSCs (Fig. 9).

Sin embargo, los resultados de microscopía confocal muestran fluorescencia positiva para los tres marcadores de superficie (Fig. 9).

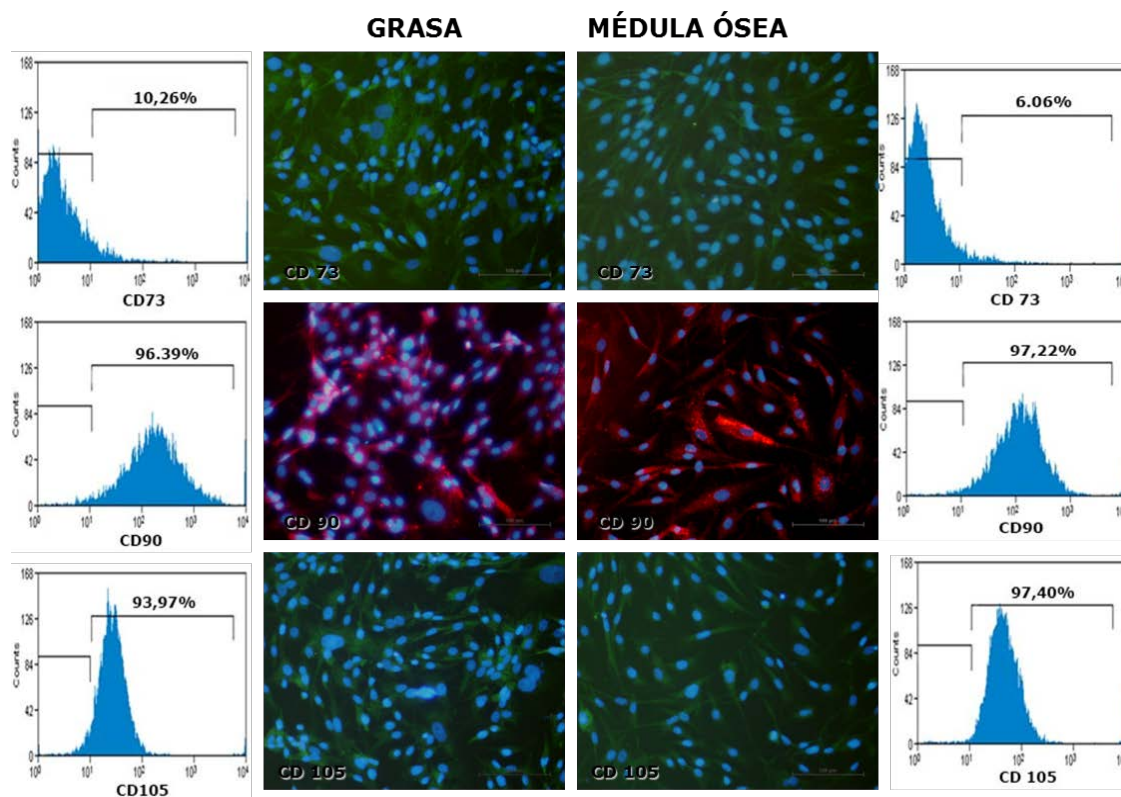


Figura 9: Análisis de los marcadores de superficie específicos CD73, CD90 y CD105 en ASCs y BMSCs de caballo, por medio de citometría de flujo y microscopía confocal.

4.2.2. Pruebas de multipotencialidad de las MSCs de caballo

Otra prueba de caracterización de las MSCs es el análisis de su multipotencialidad hacia varios tipos celulares. En nuestro caso, los tipos celulares en los que diferenciamos las MSCs fueron hacia líneas osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas.

La diferenciación condrogénica tras 15 días de cultivo en micromasa se confirmó por medio de dos técnicas: tinción con azul alcian e inmunofluorescencia indirecta frente a agrecano. Los resultados obtenidos con tinción azul alcian fueron positivos en los dos tipos celulares, observando la formación de nódulos tras la diferenciación, que se teñían de color azul intenso indicando la presencia de glicosaminoglicanos (GAG) en la matriz extracelular formada (Fig. 10 A-B). Tras el cultivo y diferenciación de las MSCs en pellet, se analizó la presencia de agrecano en la matriz extracelular por medio de inmunofluorescencia. El resultado fue también positivo en ambos tipos celulares, observando fluorescencia verde correspondiente al agrecano de la matriz extracelular (Fig. 10 C-D).

Después de 15 días en cultivo, la diferenciación adipogénica se comprobó utilizando la tinción oil red-O. Los resultados ponen de manifiesto la presencia de vacuolas lipídicas teñidas de rojo en ambos tipos celulares (Fig. 10 E-F).

Para evaluar la diferenciación osteogénica de las MSCs de caballo se utilizaron dos tinciones histológicas: tinción rojo alizarin S y tinción de von Kossa. En ambos tipos celulares los resultados fueron positivos para las dos tinciones analizadas. En la tinción rojo alizarin S, se observaron nódulos formados en la matriz extracelular y células teñidas de rojo, indicando la presencia de depósitos cálcicos en la misma matriz extracelular (Fig. 10 G-H). En cuanto al análisis con

von Kossa, los depósitos de calcio se tiñeron con una coloración negra y las células anexas de tonalidad rojiza (Fig. 10 I-J).

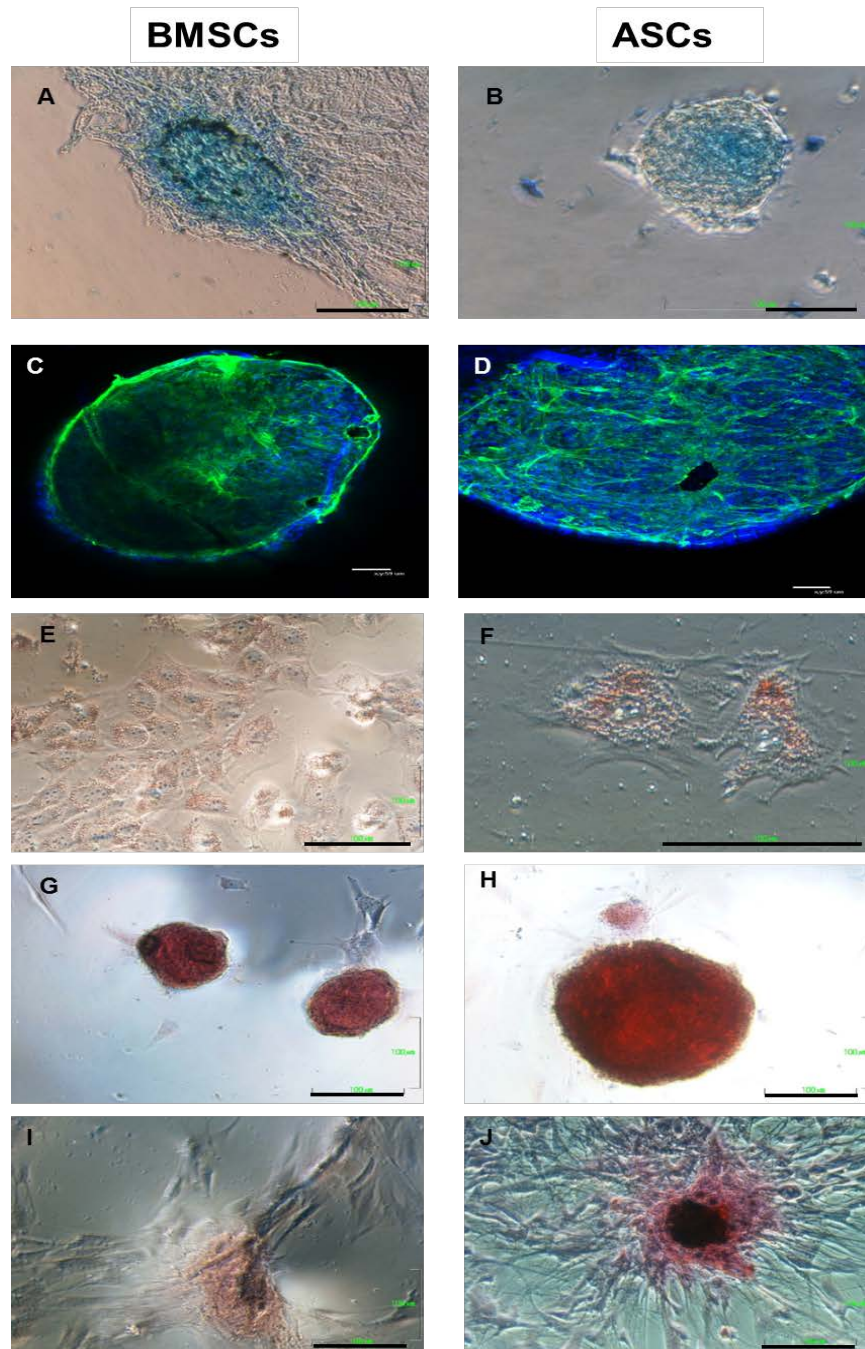


Figura 10: Análisis histológico e inmunofluorescencia de las diferenciaciones de MSCs de caballo. Diferenciación condrogénica: nódulos teñidos con azul alcian en ASCs (A) y BMSCs (B) y presencia de agregcano detectada por inmunofluorescencia en ASCs (C) y BMSCs (D). Diferenciación adipogénica: presencia de depósitos lipídicos teñidos con oil red-O en ASCs (E) y BMSCs (F). Diferenciación osteogénica: tinción de depósitos cálcicos teñidos con rojo alizarin-S en ASCs (G) y BMSCs (H) y con tinción de von Kossa en ASCs (I) y BMSCs (J).

4.3. OBTENCIÓN DE ASCs Y CONDROCITOS DE HUMANO

4.3.1. Obtención de ASCs de humano

Obtenido el tejido adiposo se procedió a extraer las células troncales mesenquimales mediante digestión de su matriz extracelular con colagenasa tipo I. Tras dos horas de digestión se realizó una centrifugación para, posteriormente, sembrar el pellet celular obtenido. El día siguiente de la siembra, se procedió a lavar las células adheridas para eliminar cualquier resto procedente de la digestión y las células no adherentes.

El crecimiento celular en los primeros días tras la siembra fue de forma aislada (Fig. 11 A-B), confluyendo en monocapa a partir del quinto día de cultivo.

En cuanto al crecimiento en función de los días se observó que, a diferencia de las MSCs de caballo, las MSCs humanas tenían un crecimiento más lento obteniendo la confluencia celular a partir del día 10 de crecimiento (Fig. 11 C).

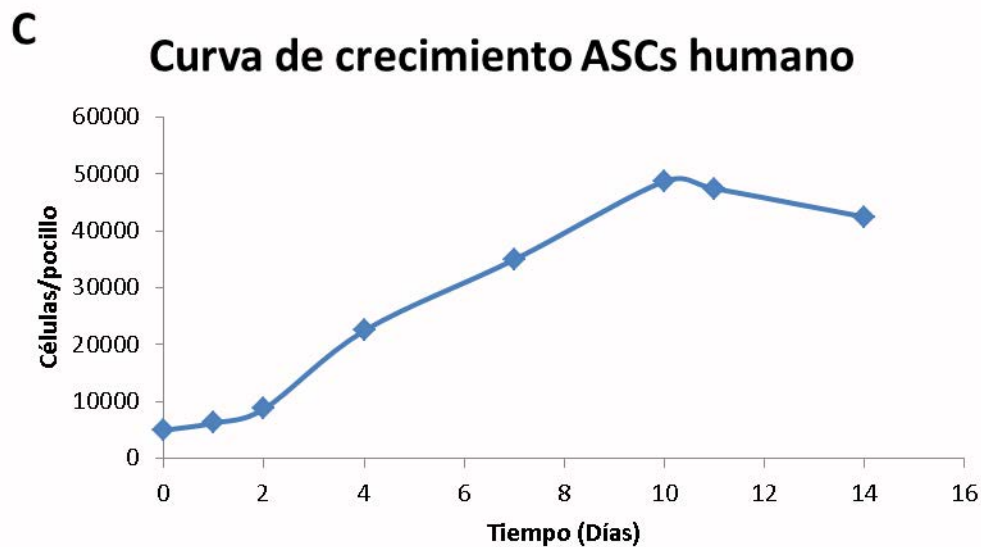
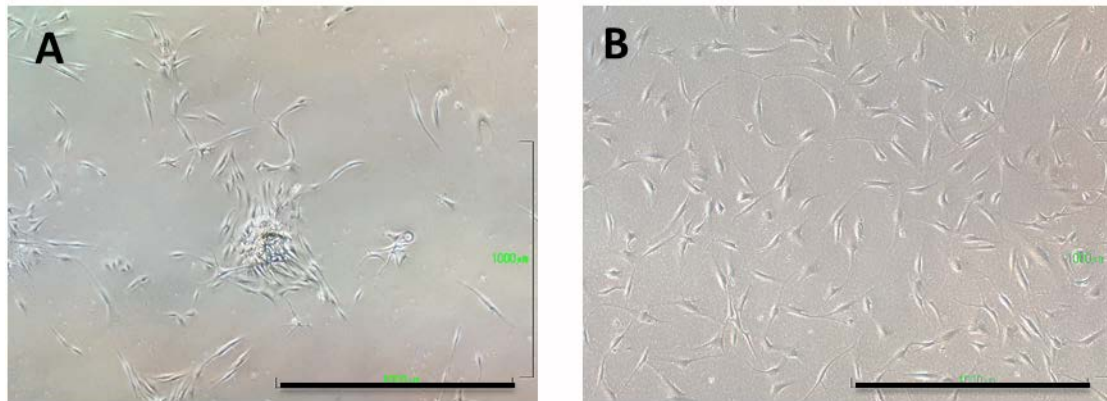


Figura 11: Morfología de MSCs de humano en fase 0, en el segundo día de cultivo (A) y tras 6 días de cultivo (B). Escala: 1.000µm. Curva de crecimiento de MSCs de humano en fase 0, en función de los días de cultivo en placa de 24 pocillos (C).

4.3.2. Obtención de condrocitos de humano

Obtenido el tejido por medio de cirugía, se procedió a digerir su matriz extracelular con tripsina y colagenasa tipo II. Digerida la matriz extracelular, se sembraron las células para su multiplicación. Las no adherentes fueron eliminadas días posteriores por medio de lavados con PBS.

Los primeros días después de la siembra, las células aparecían con morfología redondeada (Fig. 12 A), cambiando a una morfología fibroblástica tras 6 días de siembra (Fig. 12 B).

En cuanto al crecimiento de este tipo celular en función de los días (Fig. 12 C), se pudo observar que estas células crecían de forma más lenta que las descritas anteriormente. La confluencia máxima se obtuvo a partir del día 13 después de la siembra.

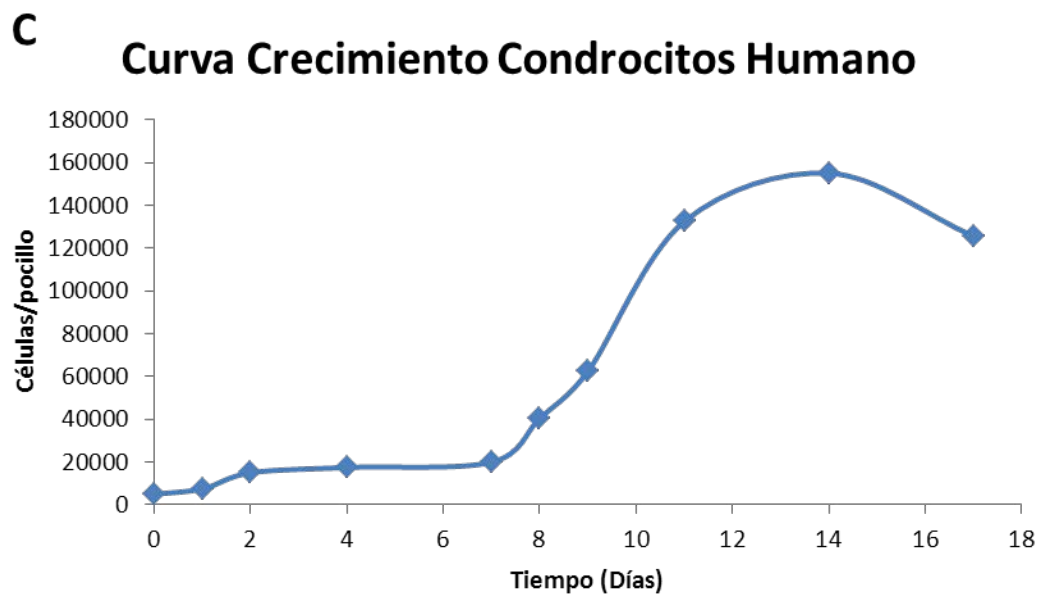
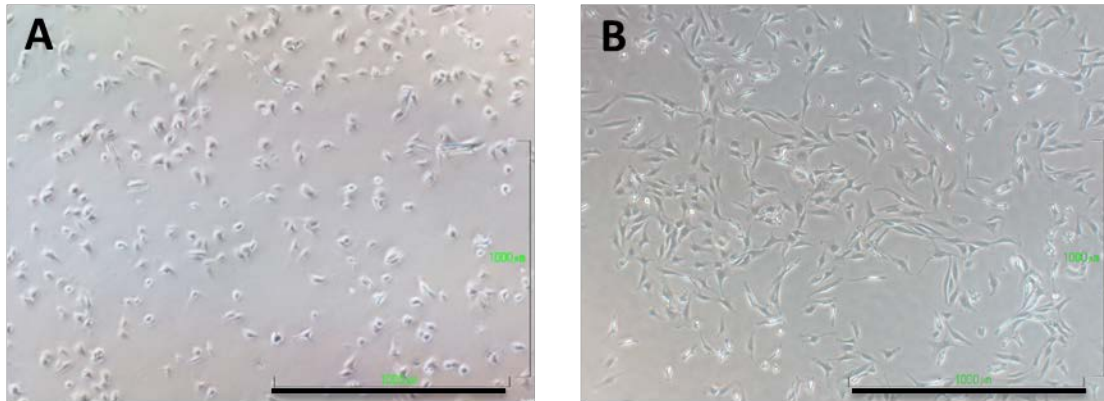


Figura 12: Morfología de los condrocitos de humano en pase 0, en el segundo día de cultivo (A) y tras 6 días de proliferación celular (B). Escala: 1.000µm. Curva de crecimiento de los condrocitos de humano en pase 0, en función de los días de cultivo en placa de 24 pocillos (C).

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS ASCs DE HUMANO

4.4.1. Caracterización de las ASCs de humano por medio de marcadores de superficie

Las ASCs de humano fueron caracterizadas mediante el análisis de los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, específicos de las células troncales mesenquimales. Estos marcadores de superficie fueron analizados mediante técnicas de inmunohistoquímica observados con microscopía confocal y cuantificados por citometría de flujo.

Analizados los marcadores de superficie por medio de citometría de flujo, los resultados obtenidos fueron positivos para todos los marcadores analizados. Los porcentajes obtenidos para CD90, CD73 y CD105 fueron superiores al 98% mediante el análisis por citometría de flujo (Fig. 13). También, el análisis por medio de microscopía confocal mostró fluorescencia positiva para todos los marcadores de superficie.

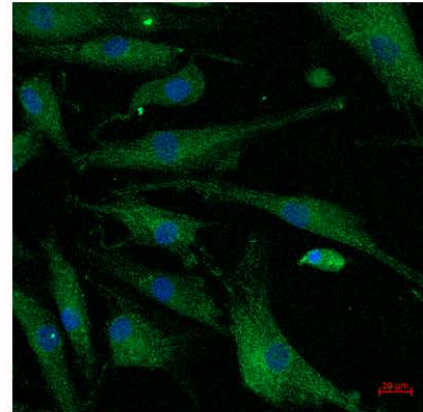
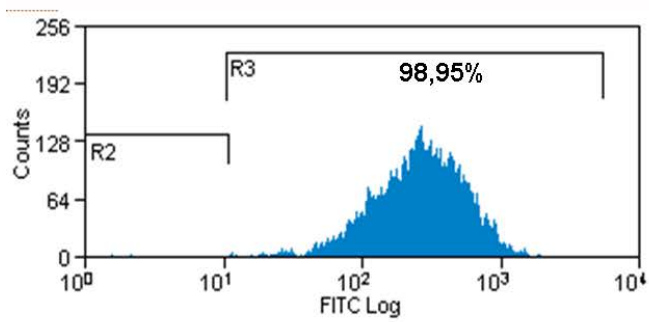
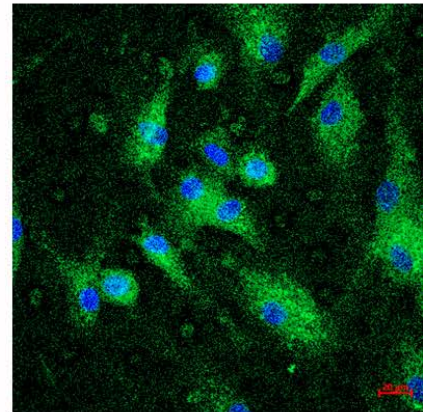
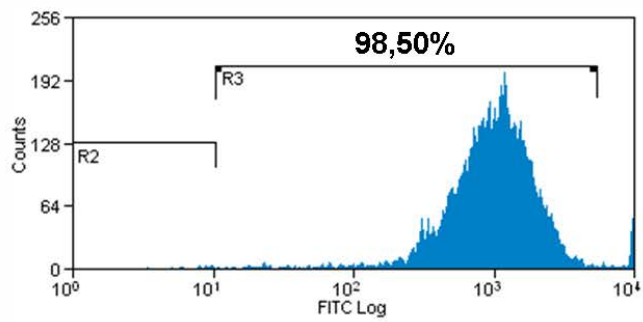
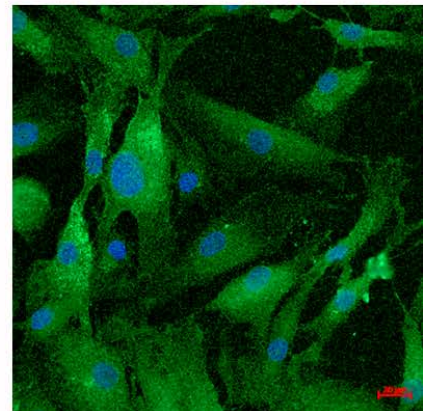
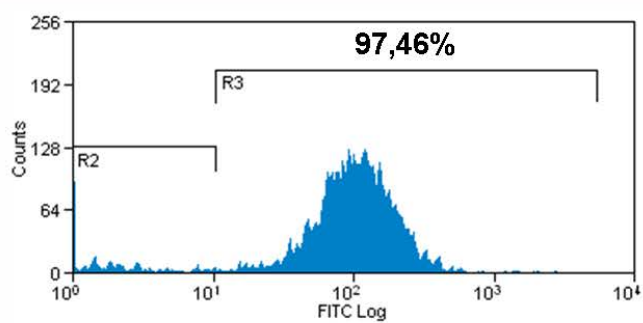
CD90**CD73****CD105**

Figura 13: Análisis de los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 en las ASCs de humano por medio de citometría de flujo (histograma) y microscopía confocal.

4.4.2. Pruebas de multipotencialidad de las ASCs de humano

Para evaluar la multipotencialidad de las MSCs, las diferenciamos hacia condrocitos, osteocitos y adipocitos.

En las ASCs cultivadas en medio de diferenciación adipogénica durante 15 días, se evidenció la adipogénesis por medio de la tinción oil red-O. Los resultados ponen de manifiesto la presencia de depósitos lipídicos teñidos de rojo en forma de pequeñas vacuolas intracelulares (Fig. 14 A). También hay que reseñar que el tamaño de la célula aumentó hasta duplicar o incluso triplicar su tamaño habitual.

La diferenciación condrogénica tras 15 días de cultivo en micromasa fue analizada por medio de dos técnicas: tinción azul alcian e inmunofluorescencia indirecta para comprobar la presencia de colágeno tipo II. Los resultados obtenidos para la tinción azul alcian fueron positivos, observando cómo los nódulos formados tras la diferenciación se teñían de color azul, indicando la presencia de glicosaminoglicanos (GAG) en la matriz extracelular producida (Fig. 14 B). También se analizó la presencia de colágeno tipo II en la matriz extracelular de las células diferenciadas mediante inmunofluorescencia indirecta. El resultado fue también positivo, obteniendo fluorescencia verde del colágeno en la matriz extracelular (Fig. 14 D).

La diferenciación osteogénica de las ASCs de humano se analizó mediante la tinción rojo alizarin S. Los resultados obtenidos con esta tinción rojo alizarin S fueron positivos, observándose nódulos teñidos de rojo, indicando la presencia de depósitos calcificados en la misma matriz extracelular (Fig. 14 C).

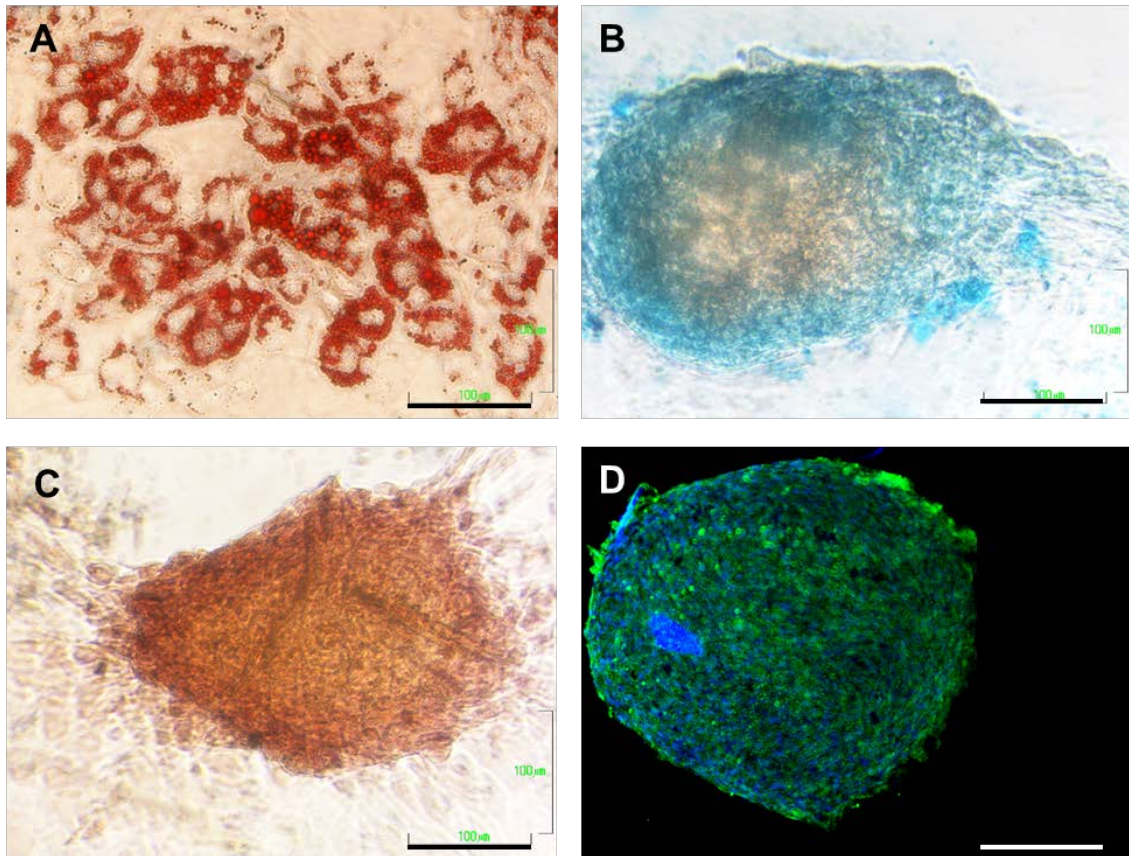


Figura 14: Análisis histológico e inmunofluorescencia de las diferenciaciones de las ASCs de humano. Diferenciación adipogénica: presencia de depósitos lipídicos teñidos con oil red-O (**A**). Diferenciación condrogénica: nódulos teñidos con azul alcian (**B**) y presencia de colágeno tipo II por inmunofluorescencia (**D**). Diferenciación osteogénica: tinción de depósitos cálcicos con rojo alizarin-S (**C**).

4.5. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN

Con el fin de aislar líneas de MSCs de caballo GFP⁺ para futuros estudios, se procedió a realizar una transfección estable tanto de las ASCs como de las BMSCs utilizando dos productos lipotransfectantes distintos.

4.5.1. Eficiencia de transfección en ASCs de caballo

Se realizaron las transfecciones con los dos productos lipotransfectantes (Lipofectamine 2.000[®] y SAFEctin[®]) y, posteriormente, se analizó la eficiencia de transfección analizando la fluorescencia verde que emitía la GFP por citometría de flujo.

Cuando se utilizó Lipofectamine 2.000[®] como producto transfectante, las células se cultivaron con el medio transfectante 5 y 24 horas. Cuando el tiempo de transfección fue de 24 horas el medio de cultivo utilizado fue DMEM que contenía SFB, para favorecer, de este modo, la proliferación celular y la viabilidad ya que se trata de un cultivo primario. Los porcentajes de transfección obtenidos para los distintos ratios (cantidad de plásmido/cantidad de producto lipotransfectante) fueron: para ratio 1:2,5 un 4,17% y para ratio 1:5 un 6,00% de células transfectadas (Fig. 15 A).

En cambio, si el medio de transfección utilizado era Opti-MEM[®], carente de SFB y permanecía con las células 5 horas, los resultados obtenidos fueron: 4,42% en ratio 1:2,5 y un 6,15% en ratio 1:5 de células transfectadas (Fig. 15 A).

Cuando el producto lipotransfectante utilizado fue SAFEctin[®], las células se cultivaron con el medio transfectante 24 y 48 horas y, en ambos casos, el medio utilizado contenía SFB ya que este producto permite su utilización, según indica la casa comercial. Al transfectar las células durante 24 horas los porcentajes de transfección obtenidos fueron: 1,91% para ratio 1:5 y 0,87% para ratio 1:6 (Fig. 15 A).

Si el medio de transfección con el producto transfectante SAFEctin[®] permanecía 48 horas con las células, se alcanzaban porcentajes de 0,21% para ratio 1:5 y 0,28% para ratio 1:6 (Fig. 15 A).

4.5.2. Eficiencia de transfección en BMSCs de caballo

Al realizar las transfecciones con el producto Lipofectamine 2.000[®] diluido en medio transfectante conteniendo DMEM con SFB y la duración de la transfección de 24 horas, los porcentajes de células

fluorescentes fueron: 6,16% para ratio 1:2,5 y 3,59% para ratio 1:5 (Fig. 15 A).

Utilizando Lipofectamine 2.000[®], medio Opti-MEM[®] sin SFB y eliminando el medio transfectante a las 5 horas, el porcentaje de células transfectadas fue: 3,64% para ratio 1:2,5 y 3,79% para ratio 1:5 (Fig. 15 A).

Cuando utilizamos el medio transfectante con SAFectin[®] durante 24 horas, los porcentajes de células transfectadas fueron: 0,86% para ratio 1:5 y 1,75% para ratio 1:6 (Fig. 15 A). Si el medio de transfección se cambiaba a las 48 horas el porcentaje de células transfectadas fue de: 0,25% para ratio 1:5 y 0,37% para ratio 1:6 (Fig. 15 A).

4.6. ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS TRANSFECTANTES

4.6.1. Lipofectamine 2.000[®]

El efecto de la toxicidad en las MSCs de caballo utilizando este producto fue notable, reduciendo el porcentaje de células vivas. Utilizando este producto y cambiando el medio a las 5 horas, el porcentaje de células vivas obtenido fue de un 79,1% en ratio 1:2,5 y un 70,5% en ratio 1:5 en el caso de las ASCs de caballo, y un 58,5% en ratio 1:2,5 y un 46,4% en ratio 1:5 en el caso de las BMSCs de caballo (Fig. 15 B).

Si el medio transfectante permanecía 24 horas con las células, la viabilidad no se reducía tanto como a las 5 horas. Los resultados obtenidos fueron de un 79,4% en ratio 1:2,5 y un 65,3% en ratio 1:5 de células vivas, en las ASCs de caballo. Mientras que en BMSCs los porcentajes fueron un poco superiores a los obtenidos tras 5 horas de

transfección, siendo de 63,3% en ratio 1:2,5 y 61,5% en ratio 1:5 (Fig. 15 B).

4.6.2. SAFectin®

En cuanto a SAFectin®, la viabilidad se incrementó, reduciendo los efectos de toxicidad hasta alcanzar valores de viabilidad superiores al 90%. Los porcentajes para las ASCs de caballo tras 24 horas de transfección fueron: 93,1% en ratio 1:5 y un 82,1% en ratio 1:6. Sin embargo, para las BMSCs el efecto fue distinto, logrando una viabilidad de 76,6% en ratio 1:5 y un 61,9% en ratio 1:6 (Fig. 15 B).

Cuando el medio se mantuvo con las células 48 horas, los valores de viabilidad alcanzados fueron del 74,6% en ratio 1:5 y del 73,0% en ratio 1:6 en el caso de las ASCs y un 83,3% en ratio 1:2,5 y un 81,1% en ratio 1:5 en el caso de las BMSCs (Fig. 15 B).

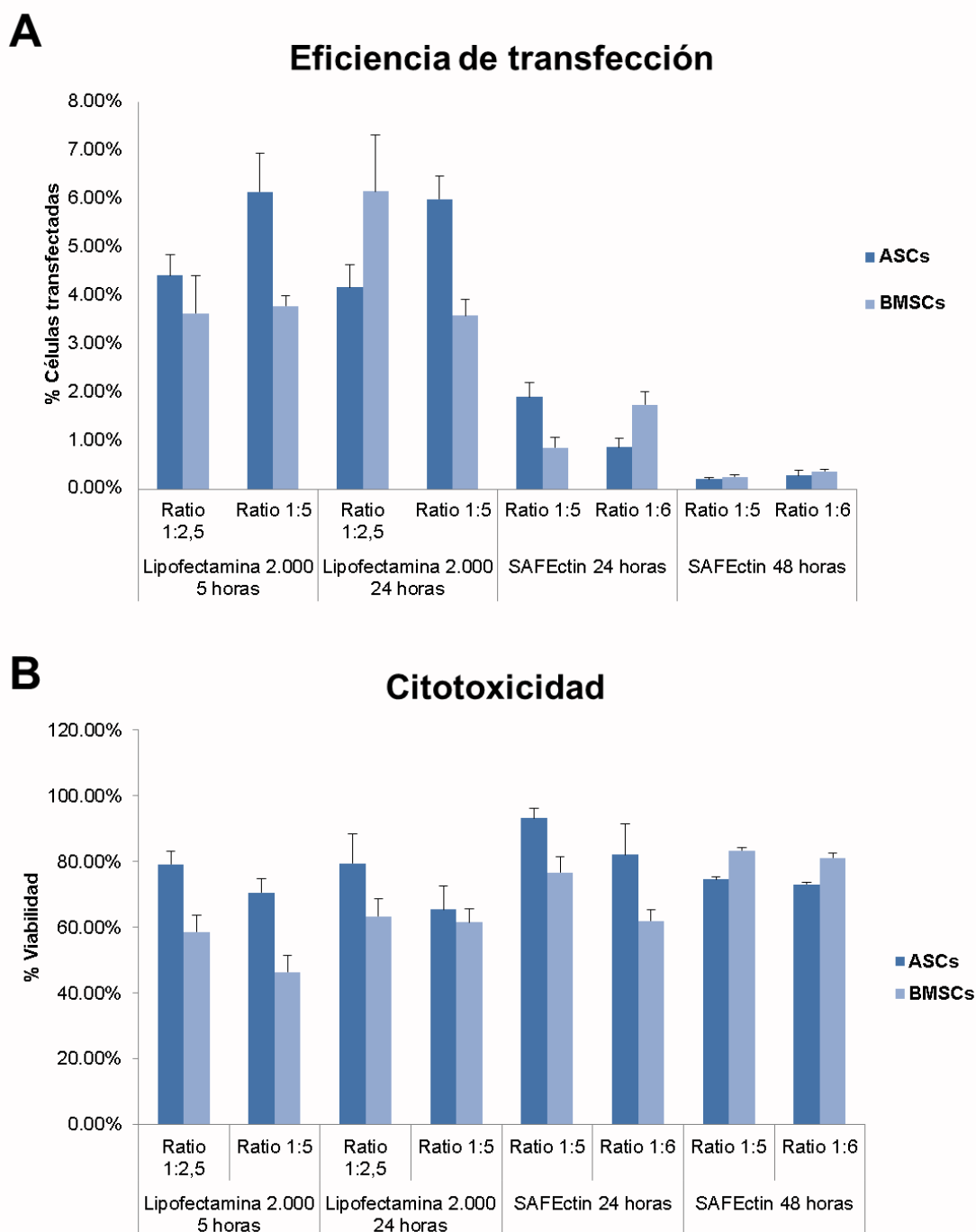


Figura 15: Eficiencia de transfección (A) y citotoxicidad (B) en las ASCs y BMSCs de caballo utilizando los productos transfectantes Lipofectamine 2.000® y SAFEctin®.

4.7. PÉRDIDA DIARIA DE LA FLUORESCENCIA

Una vez transfectadas las células con ambos productos, analizamos la pérdida de fluorescencia a lo largo de ocho días de

cultivo en los dos tipos celulares. Este análisis se realizó en placas de 24 pocillos y fue cuantificado por medio de citometría de flujo.

Se realizaron las transfecciones con Lipofectamine 2.000[®] ratio 1:2,5 y con SAFectin[®] ratio 1:5 durante 24 horas, ya que fueron los ratios y tiempos en los cuales se obtuvieron mejores resultados de transfección.

Después del segundo día de haber sido transfectadas las células, el porcentaje de células fluorescentes se redujo en ambos tipos celulares (Fig. 16 A). En el caso de las BMSCs de caballo, el número de células aumentó tras el tercer día de la transfección y en el caso de las ASCs de caballo tras el quinto día, aunque en este tipo celular, el porcentaje alcanzado no fue igual al obtenido tras la transfección.

Los resultados del citómetro mostraron que las células con fluorescencia positiva, a medida que pasaban los días, se iban acumulando en la zona con intensidad de fluorescencia más baja.

Cuando se analizaban las células bajo microscopía de fluorescencia, se pudo comprobar que tanto el crecimiento como la morfología de las células transfectadas eran similares a la de las células no transfectadas (Fig. 16 B).

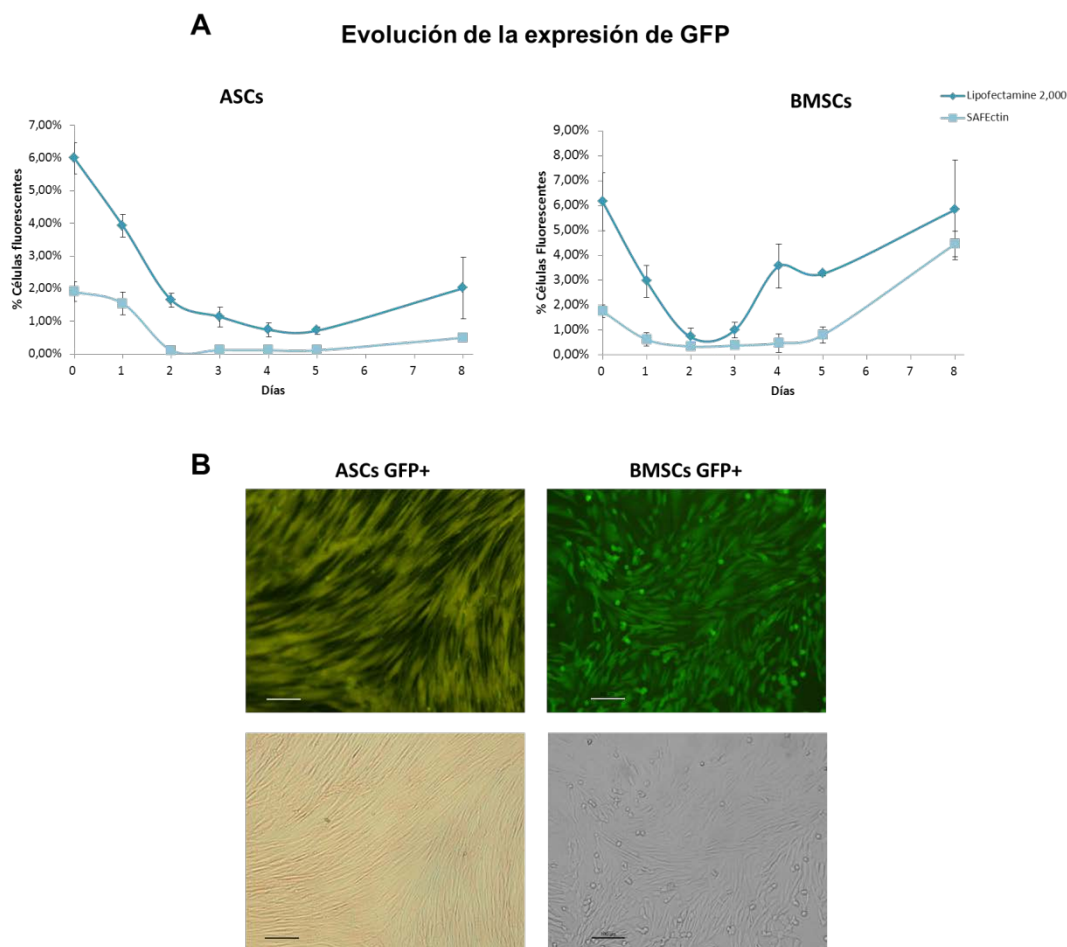


Figura 16: Evolución de la expresión de GFP (**A**) cuantificado por citometría de flujo en ASCs y BMSCs de caballo. Crecimiento de las colonias de células transfectadas (**B**) analizado bajo microscopía de fluorescencia. Escala = 100 μ m.

4.8. AISLAMIENTO DE LAS MSCs GFP⁺ DE CABALLO

Se calculó la menor concentración de Geneticina G418 a la cual las células transfectadas se podían aislar de las no transfectadas, evitando que se redujese la multiplicación celular. Dicha concentración se calculó en un gradiente creciente de 100 a 700 μ g/mL de G418 en medio de cultivo con SFB.

A concentraciones bajas de G418, tenía lugar la multiplicación tanto de las células transfectadas como de las no transfectadas. Por el contrario, a concentraciones altas, las células no transfectadas sufrían apoptosis celular mientras que las transfectadas redujeron su crecimiento e incluso se produjo la muerte celular.

La concentración de G418 utilizada para la selección, fue distinta para las ASCs y BMSCs, siendo 500µg/mL y 450µg/mL respectivamente.

Se aislaron los clones de MSCs GFP⁺ que presentaban una fluorescencia más intensa por medio de tripsinización selectiva. La fluorescencia emitida por la población celular GFP⁺ aislada, se cuantificó por citometría de flujo en cada pase celular. El medio de cultivo se mantuvo con las concentraciones de G418, indicadas anteriormente, hasta que el porcentaje de la población de MSCs GFP⁺ fue superior al 95%. Obtenido este porcentaje, se cambió el medio de selección a un medio de cultivo de mantenimiento que contenía 200µg/mL de G418.

Tras el aislamiento de las líneas celulares, se pudo observar cómo la línea celular ASCs GFP⁺ crecía a un ritmo similar al de las ASCs, mientras que las BMSCs GFP⁺ redujeron notablemente su multiplicación impidiendo conseguir un número alto de células para su criopreservación.

4.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE Y DE LA MULTIPOTENCIALIDAD DE LAS MSCs GFP⁺ DE CABALLO

Obtenido el número de células GFP⁺ de ambos tipos celulares con un porcentaje superior al 95%, se procedió a analizar el perfil de las MSCs con el fin de analizar si habían perdido o no su multipotencialidad.

4.9.1. Análisis de la expresión de los marcadores de superficie

Se analizó la expresión de dos marcadores de superficie CD90 y CD105 por medio de inmunofluorescencia y su cuantificación por

citometría de flujo. Se utilizó como fluorocromo Alexa 647 nm para evitar que se solapase la fluorescencia con la de las células GFP⁺.

Los porcentajes obtenidos superaban en ambos casos el 90% de células positivas para los marcadores (Fig. 17). Como excepción, se pudo observar que las ASCs GFP⁺ para el marcador CD90, presentaron un porcentaje significativamente ($p \leq 0,05$) más alto que en la población no transfectada.

En el caso de las BMSCs GFP⁺, el porcentaje de células positivas al marcador de superficie CD105 se vio significativamente ($p \leq 0,05$) reducido en comparación con la población no transfectada. Pero en todos los casos la expresión de ambos marcadores fue muy alta.

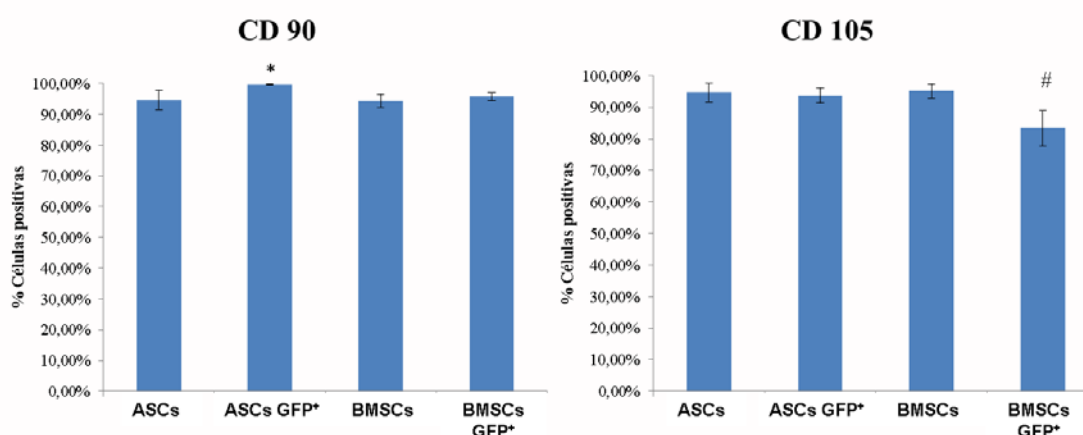


Figura 17: Análisis de los marcadores de superficie CD90 y CD105 en las ASCs, ASCs GFP⁺, BMSCs y BMSCs GFP⁺ de caballo por medio de citometría de flujo cuantificada con Alexa 647. * $p \leq 0,05$ comparadas con ASCs. # $p \leq 0,05$ comparadas con las BMSCs.

4.9.2. Análisis de la multipotencialidad

4.9.2.1. ASCs GFP⁺

Tras multiplicar las ASCs GFP⁺ para obtener una población celular suficiente para realizar las diferenciaciones, se sembraron en placas de 24 pocillos y se cambiaron los medios por los de las tres diferenciaciones: adipogénica, osteogénica y condrogénica. Se analizó

también si influía o no la presencia de G418 en la inducción de las diferenciaciones, a una concentración de 200µg/mL para mantener la expresión de GFP.

Después de 15 días de diferenciación, se realizaron las tres tinciones específicas de cada diferenciación y se analizó la expresión de GFP por medio de citometría de flujo, con el fin de analizar la evolución de la fluorescencia tras la diferenciación.

En la diferenciación adipogénica se pudo observar la presencia de depósitos lipídicos teñidos de rojo en ambos casos, con o sin G418 en el medio de diferenciación (Fig. 18 A). Esto indica que la diferenciación en las ASCs GFP⁺ fue positiva y equivalente a la del control de ASCs.

En la diferenciación osteogénica se pudo observar la presencia de nódulos de matriz osteogénica teñidos con la tinción von Kossa de color negro, indicando la presencia de depósitos cálcicos en la misma matriz (Fig. 18 A). Tanto las ASCs GFP⁺ diferenciadas con medio sin G418 como con medio con G418, tuvieron una diferenciación comparable a las ASCs.

En las células (ASCs y ASCs GFP⁺) sembradas con el medio condrogénico se observó, después de 15 días, una eficiente diferenciación condrogénica, puesta de manifiesto con la tinción de azul alcian que teñía de color azul los GAGs en los nódulos formados.

Analizando la expresión de GFP por citometría de flujo tras las tres diferenciaciones (Fig. 18 B), se pudo comprobar cómo la expresión sufría una ligera disminución en las tres diferenciaciones, siendo más notable en la diferenciación adipogénica, llegando a disminuirse un 10% la expresión GFP⁺. Comparando la pérdida de la fluorescencia con y sin G418 en el medio de diferenciación, se

observó que la expresión de GFP se reducía en las tres diferenciaciones cuando se añadía G418 en el medio. Esta diferencia llega a ser muy significativa ($p \leq 0,005$) en la condrogénesis.

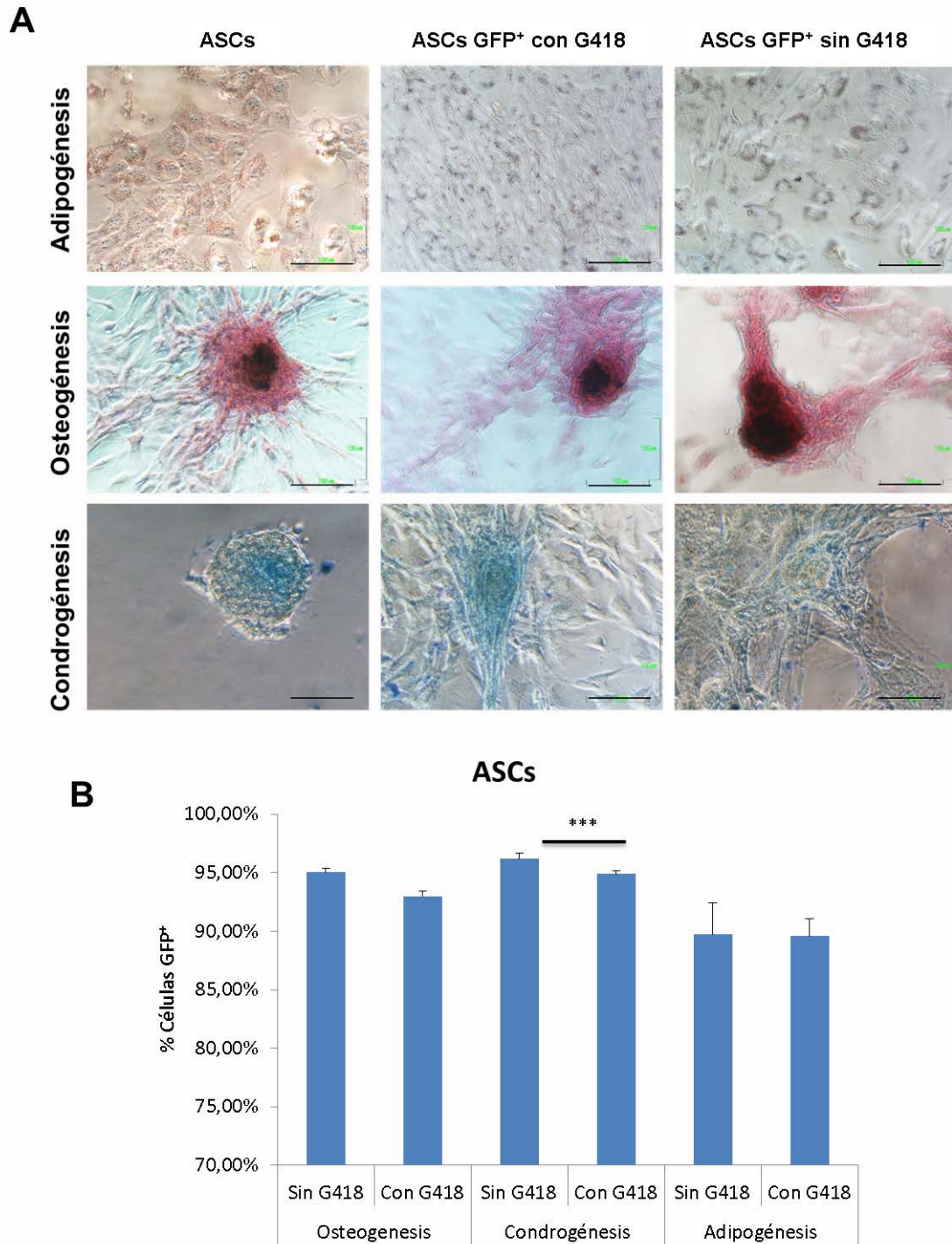


Figura 18: Análisis de la multipotencialidad de ASCs y ASCs GFP⁺ por medio de tinciones histológicas (**A**) y el análisis de la fluorescencia por citometría de flujo (**B**) tras 15 días de diferenciación. Escala = 100µm. *** $p \leq 0,005$.

4.9.2.2. BMSCs GFP⁺

Una vez aisladas las BMSCs GFP⁺ no se logró obtener el número necesario de células para poder sembrarlas en placas de 24 pocillos para su diferenciación, por lo tanto, se tuvieron que sembrar en placas de 96 pocillos con menor superficie. Se cambiaron los medios de mantenimiento por los de diferenciación: adipogénica, osteogénica y condrogénica. Se analizó también si influía o no la presencia de G418 en el proceso de diferenciación, a una concentración de 200µg/mL para el mantenimiento de la expresión de GFP.

Después de 15 días de diferenciación se realizaron las tres tinciones específicas de cada diferenciación y se analizó la expresión de GFP por medio de citometría de flujo, con el fin de analizar la evolución de fluorescencia tras la diferenciación.

En la diferenciación adipogénica se pudo observar la presencia de depósitos lipídicos teñidos de rojo en ambos casos, con o sin presencia de G418 en el medio de diferenciación (Fig. 19 A). Esto indica que la diferenciación en las BMSCs GFP⁺ fue positiva y equivalente a la del control de BMSCs, con la diferencia que había menor número de BMSCs GFP⁺ debido a la baja proliferación celular de esta línea celular.

En la diferenciación osteogénica no se observó la presencia de depósitos de calcio ni de formación de matriz extracelular. Únicamente se pudo comprobar que la morfología celular cambiaba de fibroblástica a redondeada (Fig. 19 A).

Lo mismo ocurrió en la diferenciación condrogénica tras 15 días de diferenciación. No hubo presencia de matriz extracelular teñida de azul con azul alcian, pero sí se comprobó el cambio morfológico de las células de una morfología fibroblástica a triangular (Fig. 19 A).

Analizando la expresión de GFP en las tres diferenciaciones (Fig. 19 B), se pudo comprobar cómo la expresión solamente se reducía en más de un 10% en la diferenciación condrogénica. Comparando la pérdida de la fluorescencia con y sin G418 en el medio de diferenciación, se observó que la expresión de GFP se reducía en las diferenciaciones osteogénica y condrogénica. La expresión de GFP se redujo en la diferenciación osteogénica cuando el medio de cultivo contenía G418, sin embargo, en la diferenciación condrogénica ocurría lo contrario, siendo significativa ($p \leq 0,01$) la diferencia entre las células cultivadas sin y con G418 en el medio condrogénico.

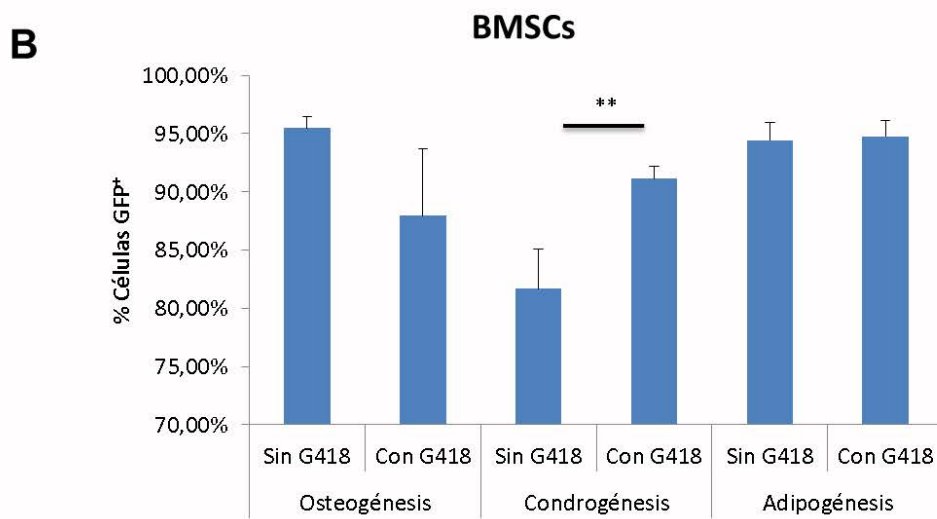
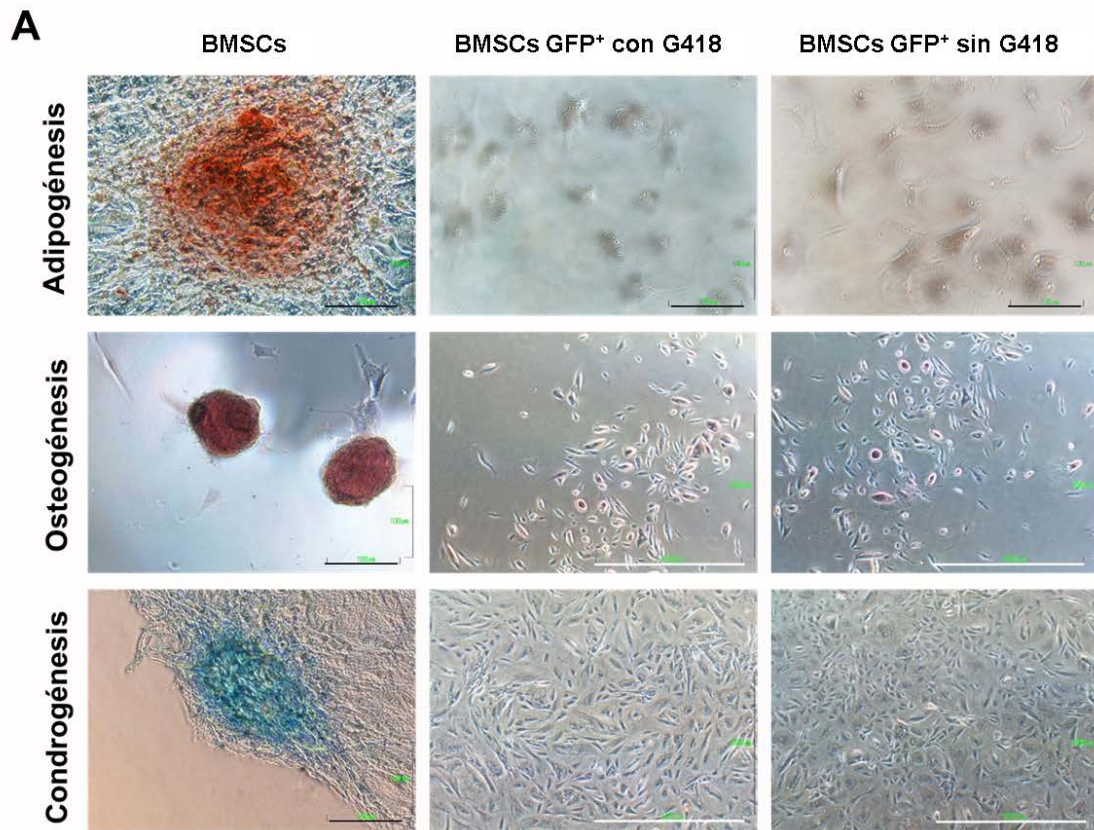


Figura 19: Análisis de la multipotencialidad de BMSCs y BMSCs GFP⁺ por medio de tinciones histológicas (**A**) y el análisis de la fluorescencia por citometría de flujo (**B**) tras 15 días de diferenciación. Escala negra = 100µm; escala blanca = 1.000µm. ** p<0,01.

4.10. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MSCs Y MSCs GFP⁺ DE CABALLO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Analizando los distintos tipos celulares con microscopía electrónica de transmisión se observaron diferencias morfológicas entre células transfectadas y no transfectadas. A bajos aumentos (6.000x) las ASCs y BMSCs presentan morfologías similares (Fig. 20 A y C) con un núcleo irregular, el cual presenta gran concentración de cromatina asociada a la membrana nuclear, y con un nucléolo muy patente. Los orgánulos celulares están bien desarrollados y se observan en todos los tipos celulares, sin embargo, las vesículas lipídicas son los orgánulos predominantes tanto en las ASCs como en las BMSCs.

Las ASCs GFP⁺ presentaban una morfología semejante a las ASCs (Fig. 20 A y B) mostrando la misma disposición de cromatina perinuclear y la presencia de un nucléolo bien marcado. La presencia de vacuolas lipídicas fue también muy notable y comparable a las presentes en las ASCs.

Por el contrario, las BMSCs GFP⁺ presentan diferencias morfológicas comparadas con los otros tres tipos celulares (Fig. 20 D). El núcleo que presentan contiene una baja concentración de cromatina tanto perinuclear como en el nucléolo. En cuanto a la presencia de orgánulos, la más representativa es la del retículo endoplasmático rugoso, ocupando prácticamente todo el volumen celular. Se observa una baja acumulación de vesículas lipídicas comparadas con los otros tipos celulares.

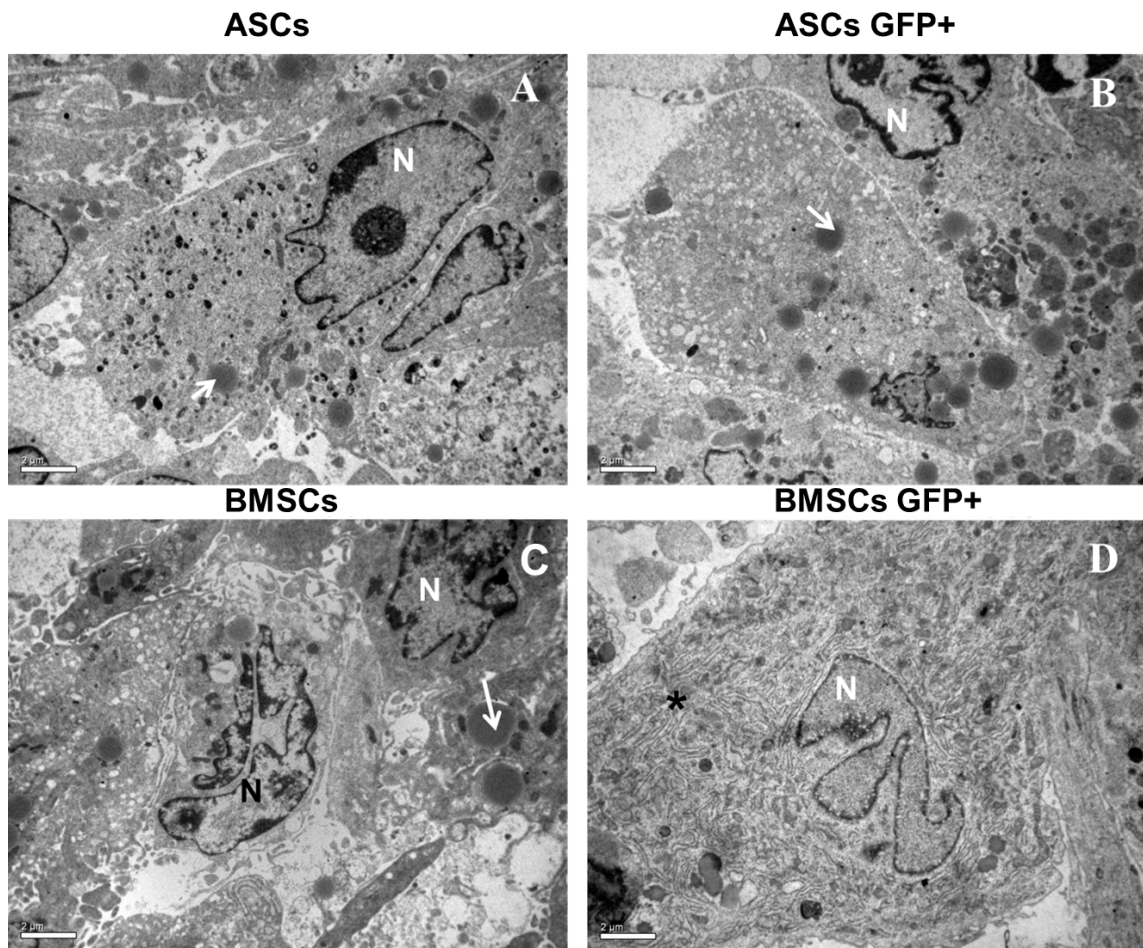


Figura 20: Imágenes del microscopio electrónico de transmisión de las MSCs (**A, C**) y MSCs GFP⁺ (**B, D**) a bajos aumentos (6.000x). Todas la células muestran un núcleo irregular (**N**), vacuolas lipídicas (**flecha**) y retículo endoplasmático rugoso más desarrollado en las BMSCs GFP⁺ (**asterisco**). Escala = 2μm.

Con más aumentos (15.000x y 25.000x) se pudo observar que el citoplasma de los cuatro tipos celulares era rico en orgánulos celulares (Fig. 21 y 22). El citoplasma de las ASCs y ASCs GFP⁺ contenía muchas vesículas lipídicas densas y alrededor de ellas se disponían mitocondrias (Fig. 21 A y B y 22 A y B). Sin embargo, en el citoplasma de las BMSCs y BMSCs GFP⁺ el orgánulo más representativo era el retículo endoplasmático, reduciéndose la presencia de vacuolas lipídicas y de mitocondrias (Fig. 21 y 22). Este retículo endoplasmático presentaba numerosos ribosomas asociados a él, indicando una alta expresión proteica (Fig. 21 F y 22 H). El retículo endoplasmático fue más representativo en las BMSCs GFP⁺,

ocupando prácticamente todo el citoplasma y presentando una morfología más irregular y dilatada (Fig. 22 H).

El cuanto a la morfología del núcleo, las MSCs GFP⁺ presentaban un nucléolo desnaturalizado (menos intensidad), indicando mayor actividad nuclear. La heterocromatina perinuclear se puso de manifiesto con mayor aumento en todos los tipos celulares excepto en las BMSCs GFP⁺ (Fig. 21 D y H).

También se observaron el aparato de Golgi y otros orgánulos en los cuatro tipos celulares, pero en menor cantidad que los orgánulos anteriormente citados. Por otra parte, los cuatro tipos de MSCs presentaban vesículas de pinocitosis alineadas en la proximidad de la membrana plasmática (Fig. 21).

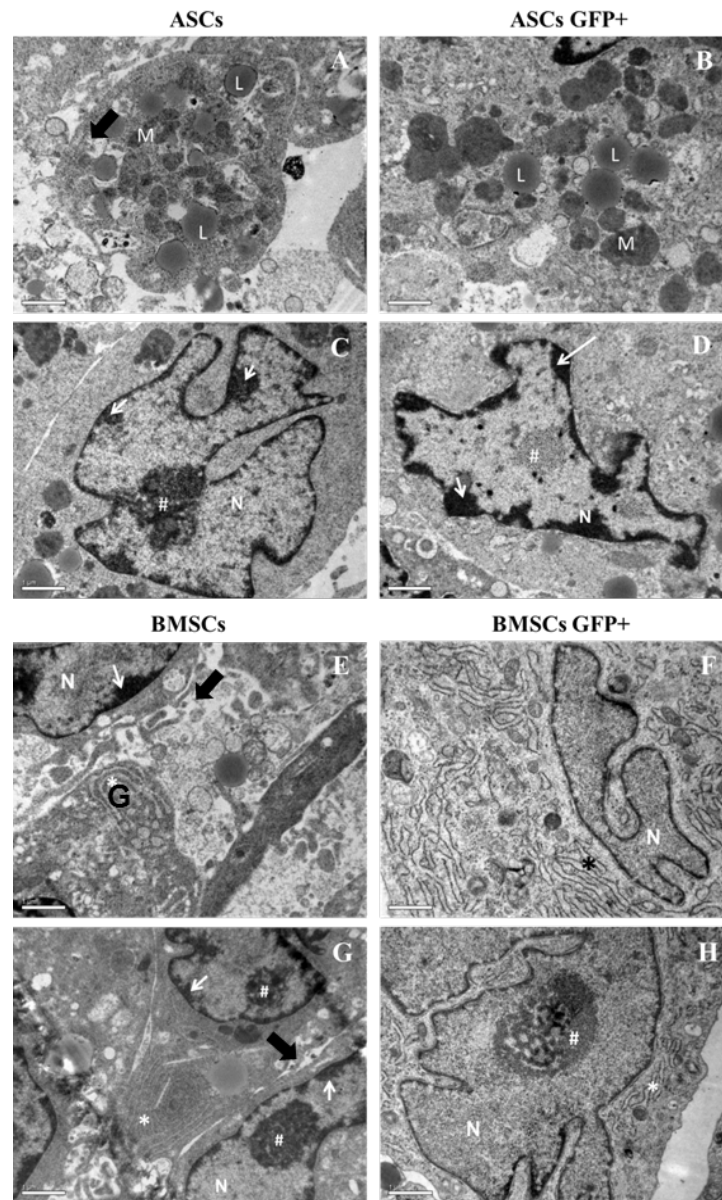


Figura 21: Imágenes del microscopio electrónico de transmisión de las ASCs (**A, C**), ASCs GFP⁺ (**B, D**), BMSCs (**E, G**) y BMSCs GFP⁺ (**F, H**) a 15.000x. En el núcleo (**N**) está representado el nucléolo (**#**) y la cromatina perinuclear (**flecha fina**). Otros orgánulos representativos son: mitocondrias (**M**), vacuolas lipídicas (**L**) y retículo endoplasmático (**asterisco**). Las vesículas de pinocitosis se localizaron cerca de la membrana plasmática (**flecha gruesa**). Escala = 1 μ m.

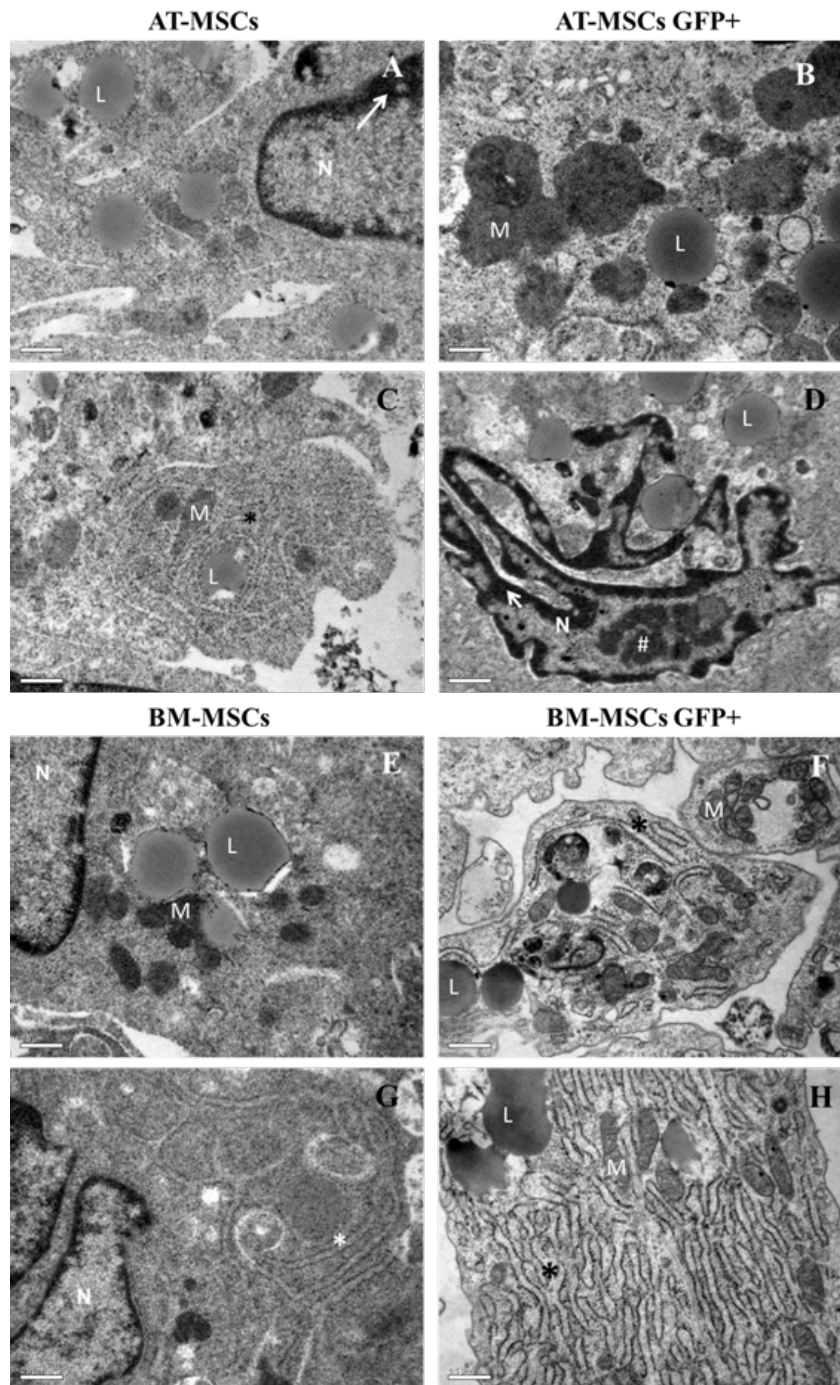


Figura 22: Imágenes del microscopio electrónico de transmisión de las ASCs (**A, C**), ASCs GFP⁺ (**B, D**), BMSCs (**E, G**) y BMSCs GFP⁺ (**F, H**) a 25.000x. Se muestra la ultraestructura de los orgánulos con más detalle: mitocondrias (**M**), vacuolas lipídicas (**L**) y retículo endoplasmático (**asterisco**). Escala = 0,5µm.

4.11. CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSCs (DSCMs)

4.11.1. Producción de las DSCMs

Las matrices extracelulares fueron producidas por las MSCs en placas de 24 pocillos mediante la adición de los medios de cultivo correspondientes. Tras 15 días en cultivo, se aislaron las matrices extracelulares y se lavaron con PBS para su posterior uso o almacenamiento. Estas matrices presentaban una apariencia gelatinosa de color blanco.

Para observarlas mejor y poder caracterizarlas, se tiñeron con azul alcian, tinción que tiñe los glicosaminoglicanos (GAG). Las DSCMs se tiñeron de un azul intenso (Fig. 23), indicando la presencia de GAG en su composición. Se observaron diferencias entre las matrices derivadas de medio ascórbico y las matrices derivadas de medio condrogénico. Las primeras se replegaban cuando se extrajeron del pocillo (Fig. 23 A y B) disminuyendo el área total de la matriz, mientras que las derivadas de medio condrogénico se mantenían más uniformes, con una superficie más parecida al área donde fueron producidas (Fig. 23 C y D), lo cual facilitaba su manejo. Las matrices derivadas de medio condrogénico eran más compactas y resistentes que las derivadas de medio ascórbico.

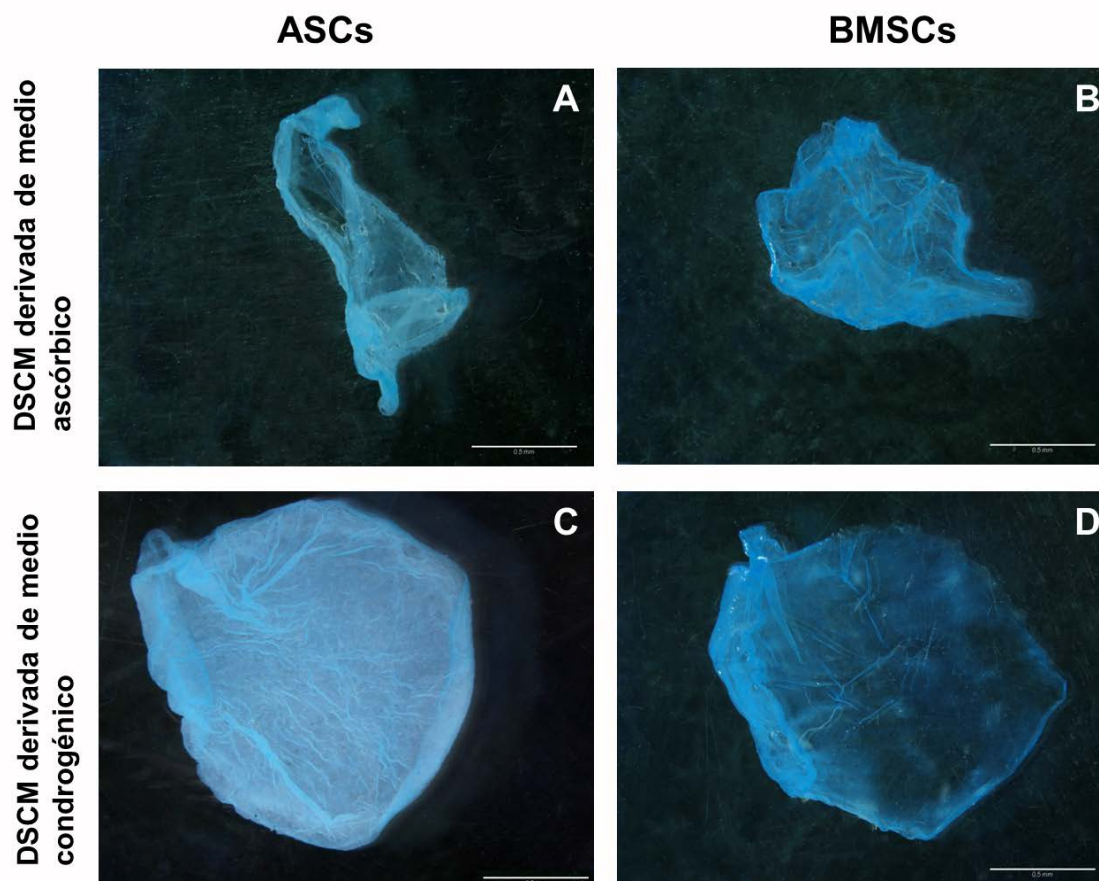


Figura 23: Imagen macroscópica de las DSCMs derivadas de medio ascórbico (**A, B**) y medio condrogénico (**C, D**) producidas por MSCs de caballo teñidas con azul alcian. Escala = 0,5mm

4.11.2. Análisis por microscopía de barrido de las DSCMs

Se analizó la estructura de los filamentos proteicos de las matrices extracelulares mediante microscopía electrónica de barrido. Como resultado se observó que todas las DSCMs creadas, presentaban una disposición fibrilar compacta sin presencia de células.

Se encontraron diferencias entre los dos tipos de matrices. Las matrices derivadas de medio ascórbico poseían una disposición proteica más irregular que las derivadas de medio condrogénico (Fig. 24). Las matrices derivadas de medio condrogénico presentaban una estructura más homogénea. Esta disposición hace que las DSCMs

derivadas de medio condrogénico presenten una mayor porosidad, dando lugar a oquedades que se observan claramente en las figuras 24 C, D, G y H.

No se encontraron muchas diferencias en las matrices producidas por un tipo celular u otro (ASCs o BMSCs). Únicamente, las DSCMs producidas por ASCs presentaban fibras proteicas más visibles con el microscopio electrónico y de mayor tamaño (Fig. 24 B y D).

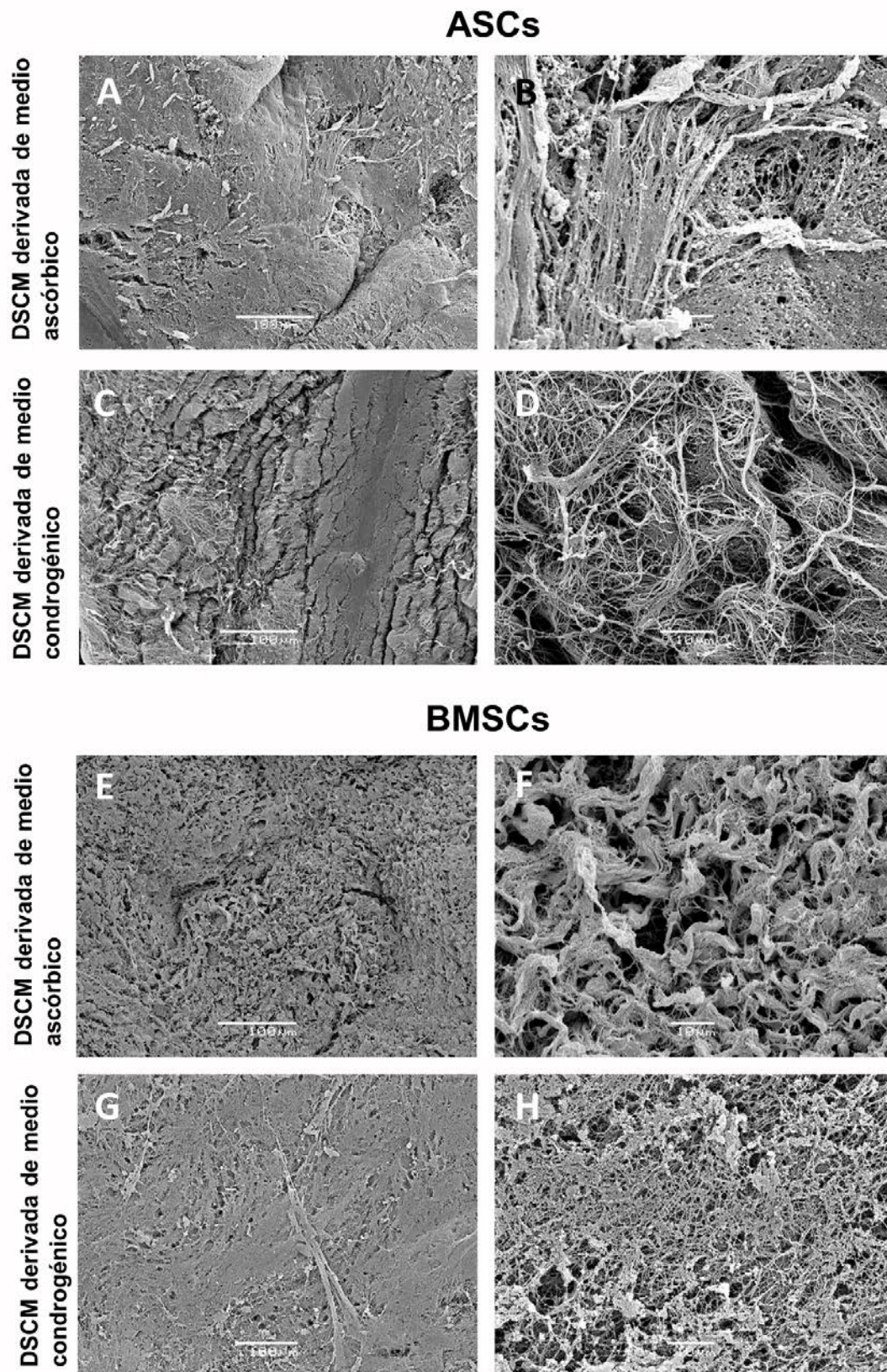


Figura 24: Caracterización de las DSCMs producidas por ASCs (A-D) y BMSCs (E-H) de caballo con microscopía electrónica de barrido. A, C, E, G escala = 100 µm. B, D, F, H escala = 10 µm.

4.11.3. Caracterización proteica de las DSCMs

4.11.3.1. SDS-PAGE

El análisis proteico realizado utilizando SDS-Page, reveló un perfil proteico en el que abundaban las proteínas de alto peso molecular, superior a 37 kD de peso molecular (Fig. 25).

La imagen del gel pone de manifiesto que el perfil proteico del SFB era diferente al de las DSCMs. En el SFB únicamente presentaba una mayor cantidad de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 50 y 75 kD. Por lo tanto, las proteínas producidas por las MSCs en las DSCMs eran diferentes a las del SFB. El perfil proteico de las DSCMs producidas por las MSCs fue muy similar al que presentaban los controles de DSCMs de cartílago y tendón, confirmando que la composición proteica de las primeras es muy similar a la de los controles.

Tanto en las matrices extracelulares de tendón y cartílago como en la de los cuatro tipos de DSCMs producidas, se encontró una importante cantidad de proteínas localizadas en dos bandas comprendidas entre los pesos moleculares 37 y 50 kD. Como diferencia entre las matrices derivadas de medio ascórbico y las matrices derivadas de medio condrogénico se observaron tanto en aA-DSCM como en bA-DSCM la presencia de varias bandas entre los pesos moleculares 100 y 150 kD, mientras que en aC-DSCM y bC-DSCM aparecieron únicamente dos bandas (Fig. 25).

La cantidad de proteínas con pesos moleculares iguales o superiores a 250 kD fue alta en todas las matrices extracelulares analizadas (Fig. 25).

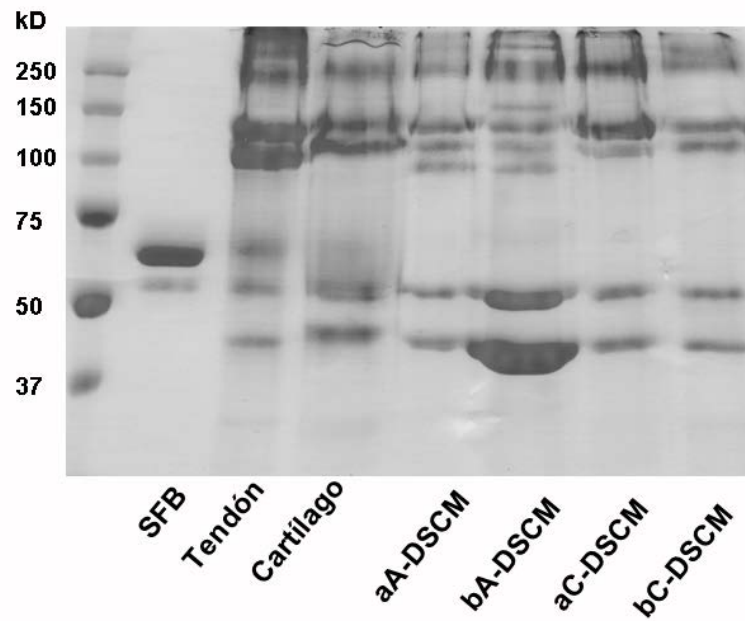


Figura 25: Análisis proteico por SDS-Page. Fueron analizadas las DSCMs derivadas de medio ascórbico producidas por ASCs (aA-DSCM) y por BMSCs (bA-DSCM) de caballo, y las DSCMs derivadas de medio condrogénico producidas por ASCs (aC-DSCM) y por BMSCs (bC-DSCM). Como controles del patrón proteico se utilizaron muestras de SFB, tendón de caballo y cartílago de caballo.

4.11.3.2. Inmunohistoquímica

Para completar la caracterización de las DSCMs se analizó la presencia de colágeno tipo I, colágeno tipo II, fibronectina, agregano y ácido hialurónico por inmunofluorescencia (Fig. 26).

Las matrices extracelulares derivadas de medio ascórbico producidas tanto por ASCs como por BMSCs fueron positivas para colágeno I, colágeno II y fibronectina. Por el contrario, la fluorescencia fue muy baja o nula para el agregano y el ácido hialurónico, considerando, de este modo, la ausencia o baja expresión de estas proteínas en este tipo de matrices extracelulares.

Sin embargo, en las matrices extracelulares derivadas de medio condrogénico, el resultado fue positivo para todas las proteínas analizadas en las matrices producidas, tanto por ASCs como por

BMSCs, indicando que su origen era distinto al de las DSCMs derivadas de medio ascórbico.

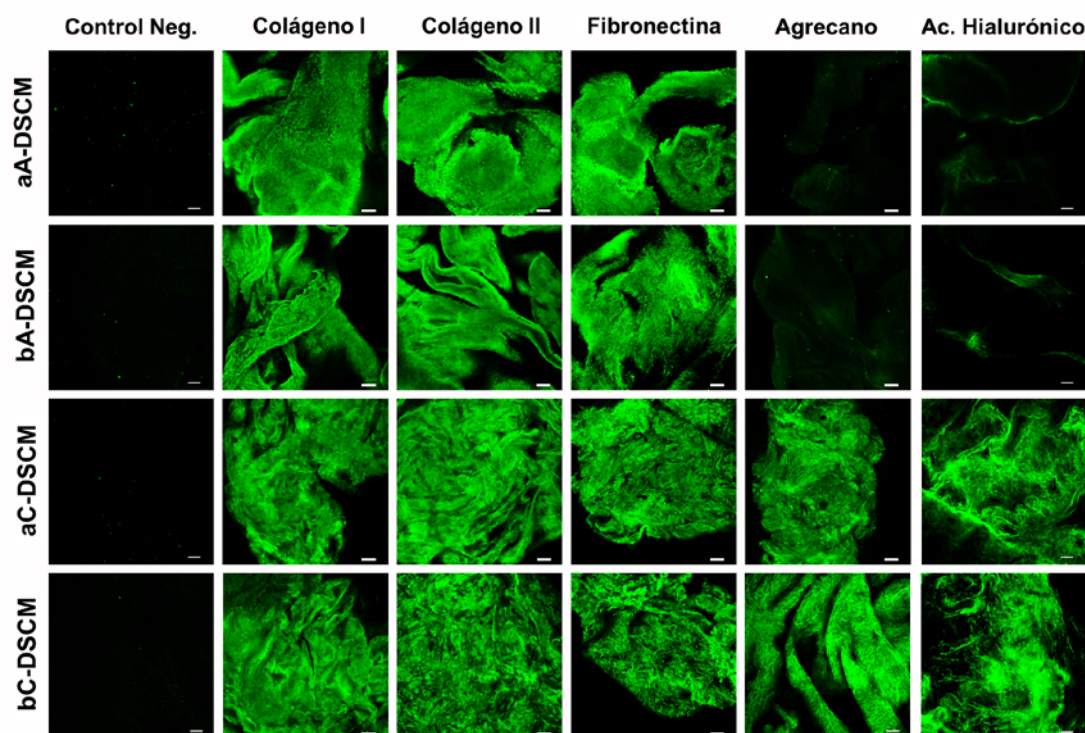


Figura 26: Análisis de la presencia en las distintas DSCMs de colágeno tipo I, colágeno tipo II, fibronectina, agregano y ácido hialurónico por inmunofluorescencia. Bar = 100µm

4.12. SIEMBRA, PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD DE LAS MSCs DE CABALLO SOBRE LAS DSCMs

4.12.1. Eficiencia de la adhesión celular

Después de una hora de la siembra de las MSCs sobre las DSCMs, se cuantificó la eficiencia de adhesión celular. Los resultados obtenidos (Fig. 27 A) no mostraron diferencias significativas en la siembra sobre los 4 tipos celulares. El valor del ratio de eficiencia de adhesión obtenido se encontraba entre 0,5 y 0,6 en todos los casos y en ambos tipos celulares (ASCs y BMSCs).

4.12.2. Análisis del área celular utilizada sobre las DSCMs

Las células se tiñeron con calceína-AM y se sembraron sobre las DSCMs. Después de 1 hora tras la siembra, se analizó el área utilizada en las imágenes obtenidas con el microscopio confocal (Fig. 27 C y D).

En ambos tipos celulares se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,005$) en la siembra sobre las aA-DSCMs comparadas con el resto de matrices extracelulares. Esto fue debido a que estas matrices se repliegan fácilmente en el momento de la siembra, a diferencia del resto de DSCMs. Esto da como consecuencia que el área de siembra se reduzca y sea menor que el de las otras DSCMs analizadas (Fig 27 B).

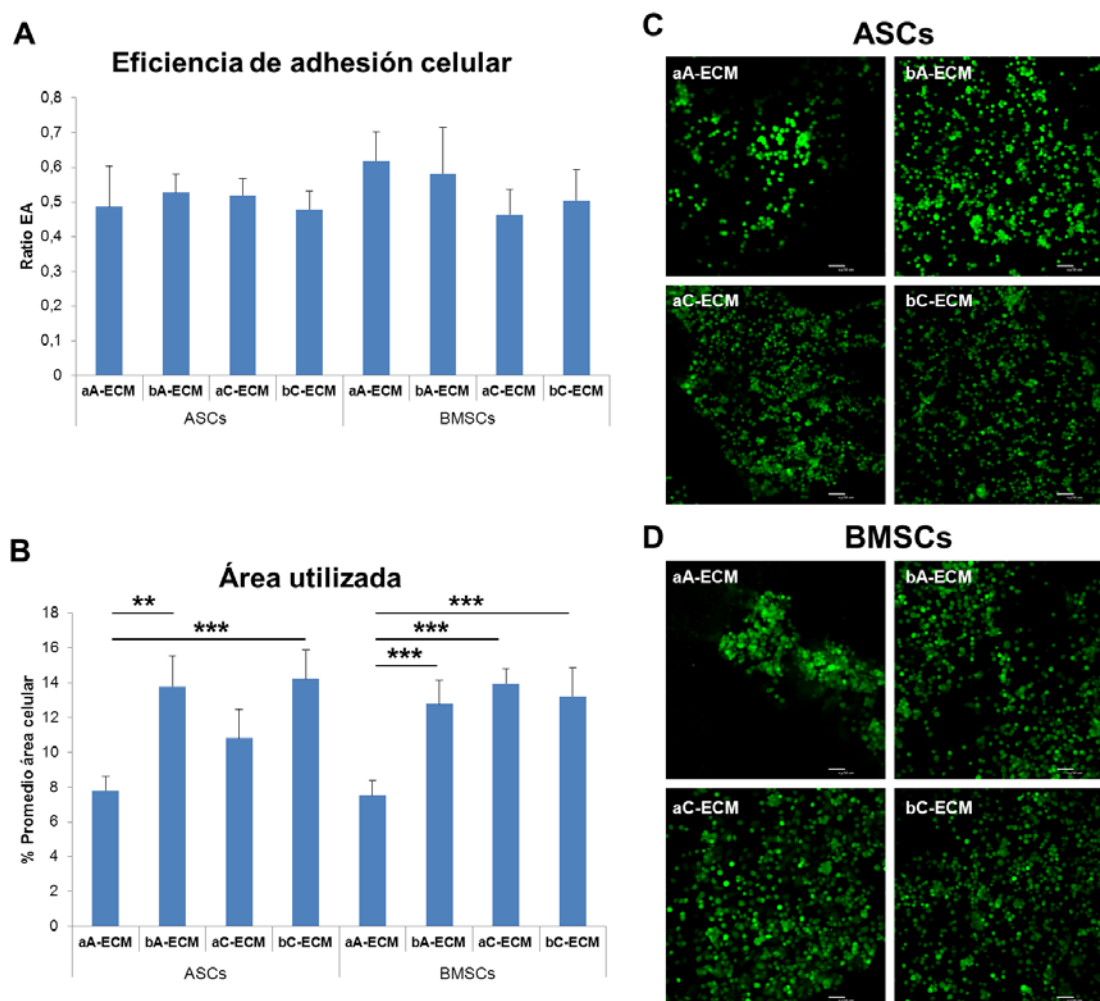


Figura 27: Cuantificación del ratio de eficiencia de adhesión celular de las MSCs sembradas sobre las DSCMs (**A**). Análisis del área de siembra utilizada por las MSCs sembradas sobre DSCMs por cuantificación por medio de NIH Image J (**B**) e imágenes del área de DSCM utilizada por las ASCs tras la siembra (**C**) y de las BMSCs tras la siembra (**D**). ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$.

4.12.3. Proliferación celular

Se analizó la proliferación celular de las MSCs de caballo durante 12 días de crecimiento sobre los cuatro tipos de matrices extracelulares, cuantificando el DNA total extraído de las muestras.

En las ASCs se obtuvieron diferencias significativas en la proliferación sobre los cuatro tipos de matrices extracelulares (Fig. 28 A). En el día 3 la proliferación fue mayor en las matrices extracelulares derivadas de medio ascórbico en comparación con el crecimiento sobre las derivadas de medio condrogénico ($p \leq 0,01$ y

$p \leq 0,005$). En el día 5, el crecimiento sobre las matrices extracelulares se iguala en todos los casos, excepto sobre las aC-DSCMs, obteniendo un crecimiento más lento. En el día 8, se empiezan a notar mayores diferencias de crecimiento entre los cuatro tipos de matrices, obteniendo mejores resultados sobre las A-DSCMs y C-DSCMs producidas por BMSCs. En el día 12, se reduce el crecimiento de las ASCs en los cuatro tipos de matrices, mientras que en las BMSCs hay una proliferación elevada sobre las aA-DSCMs y aC-DSCMs.

En cuanto a la proliferación de las BMSCs sobre las matrices extracelulares, también se encontraron diferencias significativas en el crecimiento celular en función de los días (Fig. 28 A). En el día 3, se encontraron diferencias en el crecimiento, siendo mayor sobre las matrices extracelulares derivadas de medio ascórbico que sobre las derivadas de medio condrogénico. Como ocurre con las ASCs, el crecimiento de las BMSCs sobre las aC-DSCMs es más lento y progresivo obteniendo la mayor proliferación el día 12. El crecimiento sobre los otros tipos de DSCMs aumenta en los primeros días de proliferación reduciéndose en el día 12.

Se pudo observar, en el crecimiento de ambos tipos celulares, cómo a partir del día 5 de crecimiento, las DSCMs derivadas de medio ascórbico se replegaban formando un nódulo. Esto no ocurría en el crecimiento sobre las DSCMs derivadas de medio condrogénico.

4.12.4. Viabilidad celular

La viabilidad celular fue analizada mediante cuantificación colorimétrica producida por el compuesto MTT durante 12 días.

La viabilidad de las ASCs aumentó en los días 5 y 8 en todos los tipos de DSCMs, excepto cuando crecían sobre las bA-DSCMs,

reduciendo su viabilidad a partir del día 8. La viabilidad fue mayor en las DSCMs derivadas de medio condrogénico, observándose diferencias significativas en esos días en el crecimiento en los distintos tipos de matrices extracelulares (Fig. 28 B). En el día 12 la viabilidad celular se redujo en todos los tipos de DSCMs, dato que concuerda con el obtenido en el análisis de la proliferación celular, donde también se vio reducida.

La viabilidad celular de las BMSCs creciendo sobre los cuatro tipos de DSCMs fue más constante, manteniéndose uniforme en función de los días (Fig. 28 B). Únicamente hubo diferencias significativas en la viabilidad celular en los días 3 y 12.

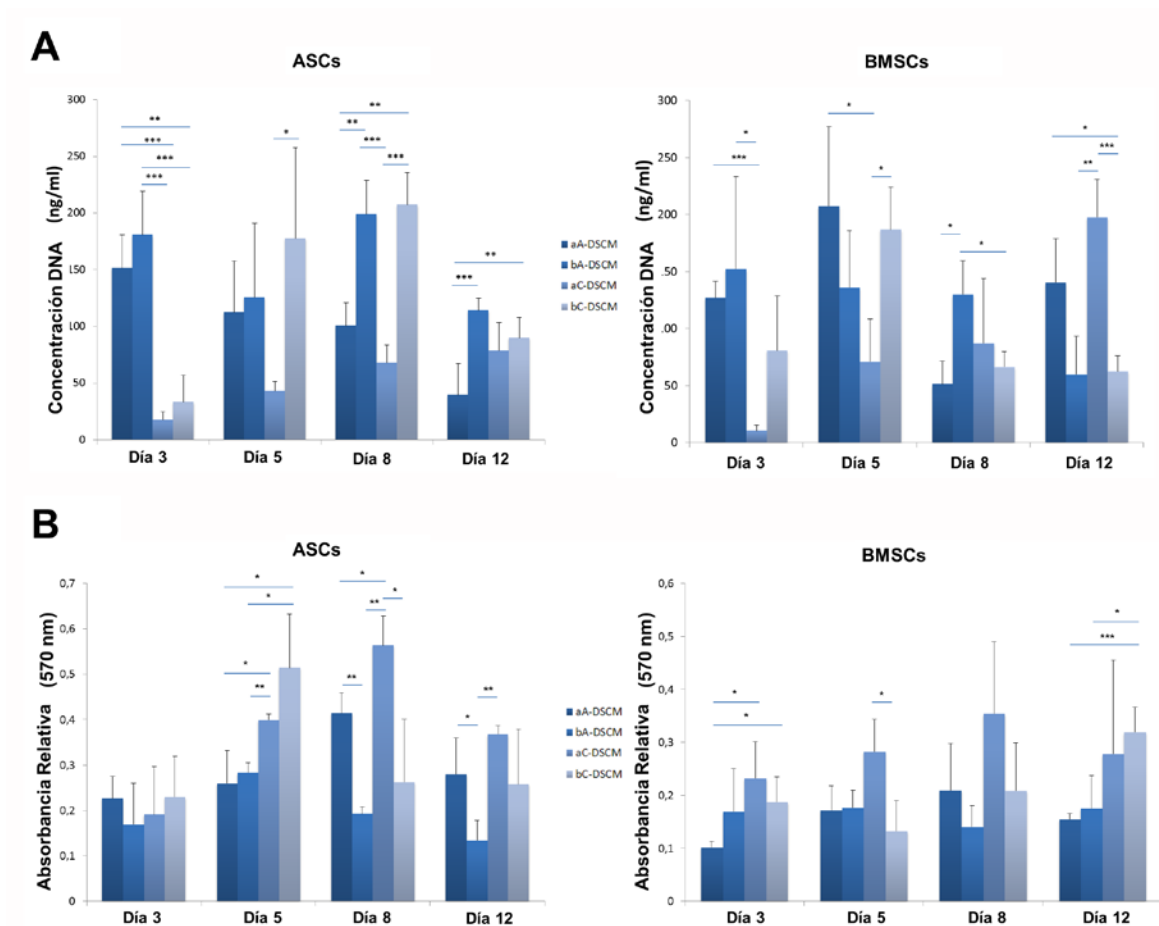


Figura 28: Proliferación celular cuantificada por medio de la cantidad de DNA total con Pico-Green (A) y cuantificación de la viabilidad por absorbancia a 570 nm (B) de ASCs y BMSCs creciendo sobre las DSCMs. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$.

4.13. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE CONDRÓGENESIS EN LAS MSCs CRECIENDO SOBRE DSCMs.

Con el fin de analizar cómo el contacto matriz-célula induce la activación de los genes de condrogénesis, se estudió como influían las DSCMs en la expresión de estos genes mediante PCR a tiempo real, en ausencia de medio inductor de la condrogénesis (Fig. 29). Los resultados de la cuantificación de la expresión génica fueron estandarizados con la expresión de los mismos genes por las MSCs cultivadas sin las DSCMs en función de los días.

La expresión de colágeno tipo II (COL2A1) aumentó significativamente en los días 5 y 8 en las ASCs, obteniendo niveles de hasta 25 veces más de expresión relativa del gen que en el control ASCs. En el caso de las BMSCs, la mayor expresión de colágeno tipo II se obtuvo en el día 3 después de la siembra, alcanzando niveles de hasta 35 veces más de expresión relativa del gen, reduciéndose su expresión en los días sucesivos.

En el caso del agrecano (ACAN), la expresión génica también aumentó en las ASCs en los días 5 y 12 de cultivo sobre las DSCMs siendo su expresión muy significativa ($p < 0,005$) comparada con el control, con excepción de las células sembradas sobre aA-DSCMs, en las cuales la expresión de agrecano no aumentó de forma significativa. Sin embargo, el perfil de expresión del agrecano en las BMSCs no siguió el mismo patrón de expresión que el del colágeno tipo II. La expresión de este gen aumentó a partir del día 8, siendo muy elevada en el día 12 de cultivo, especialmente en las aA-DSCM y bC-DSCM.

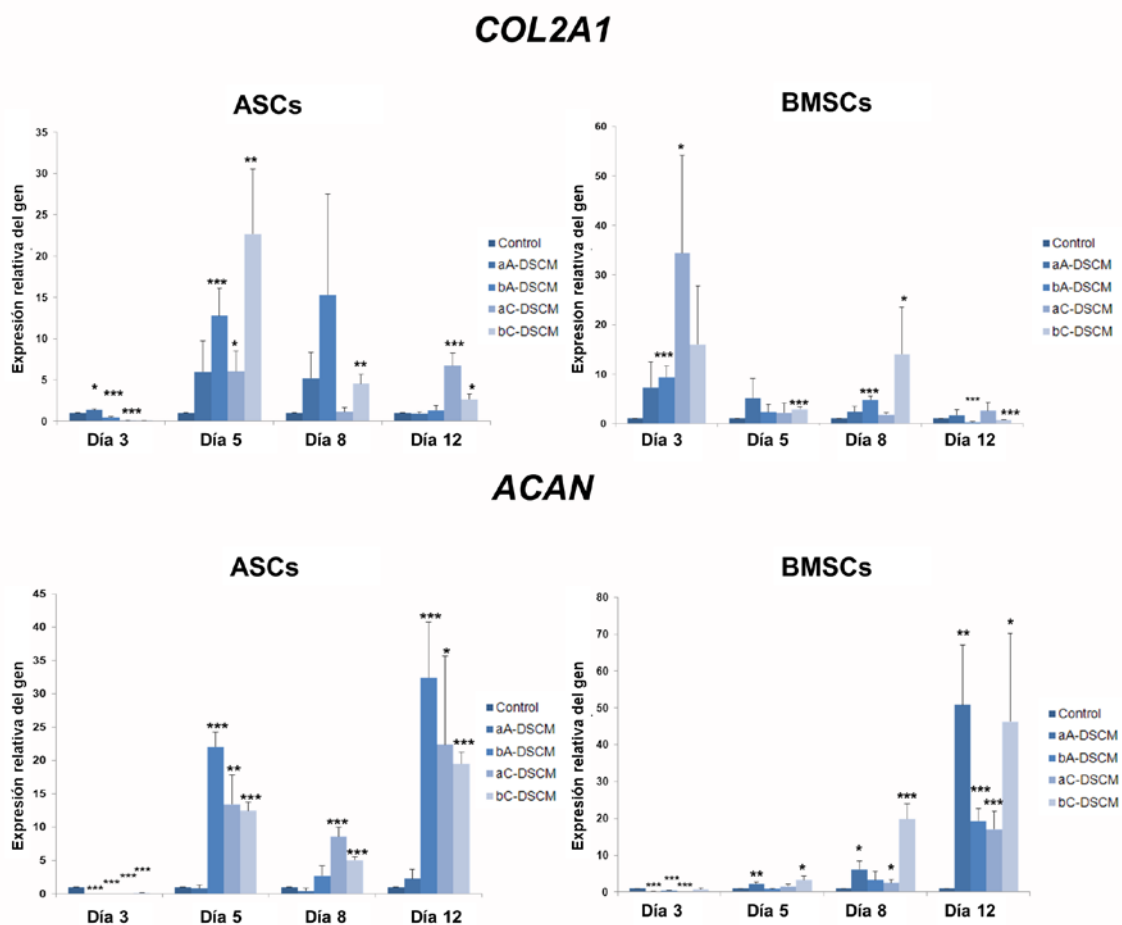


Figura 29: Cuantificación de la expresión de los genes de condrogénesis colágeno tipo II (COL2A1) y agrecano (ACAN) por medio de PCR a tiempo real en ASCs y BMSCs sembradas sobre las DSCMs. Como control se utilizó la expresión de los mismos genes analizada en función de los días en las MSCs sembradas sin DSCM. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$.

4.14. ANÁLISIS DE LA OSTEOGÉNESIS SOBRE LAS DSCMs.

Después de 15 días de inducción de la diferenciación osteogénica de las MSCs de caballo sembradas sobre DSCMs, se analizó y cuantificó la formación de matriz extracelular osteogénica sobre las DSCMs.

A partir del día 6 de diferenciación, las matrices derivadas de medio ascórbico se replegaron en forma de nódulo conteniendo en su interior las células en proceso de diferenciación. Este nódulo permaneció hasta el último día de diferenciación, mostrándose en las imágenes de la figura 30 A y C.

La tinción con rojo alizarín de las cuatro matrices sembradas con los dos tipos celulares (ASCs y BMSCs) fue positiva, tiñendo de rojo los depósitos cálcicos (Fig. 30 A y C). La diferenciación sobre las matrices derivadas de medio condrogénico se produjo de forma más homogénea a lo largo de toda la matriz.

Cuando se cuantificó la mineralización por medio de la absorbancia colorimétrica, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los diferentes tipos de matrices. En ambos tipos de MSCs, la mineralización más alta se obtuvo en aA-DSCM.

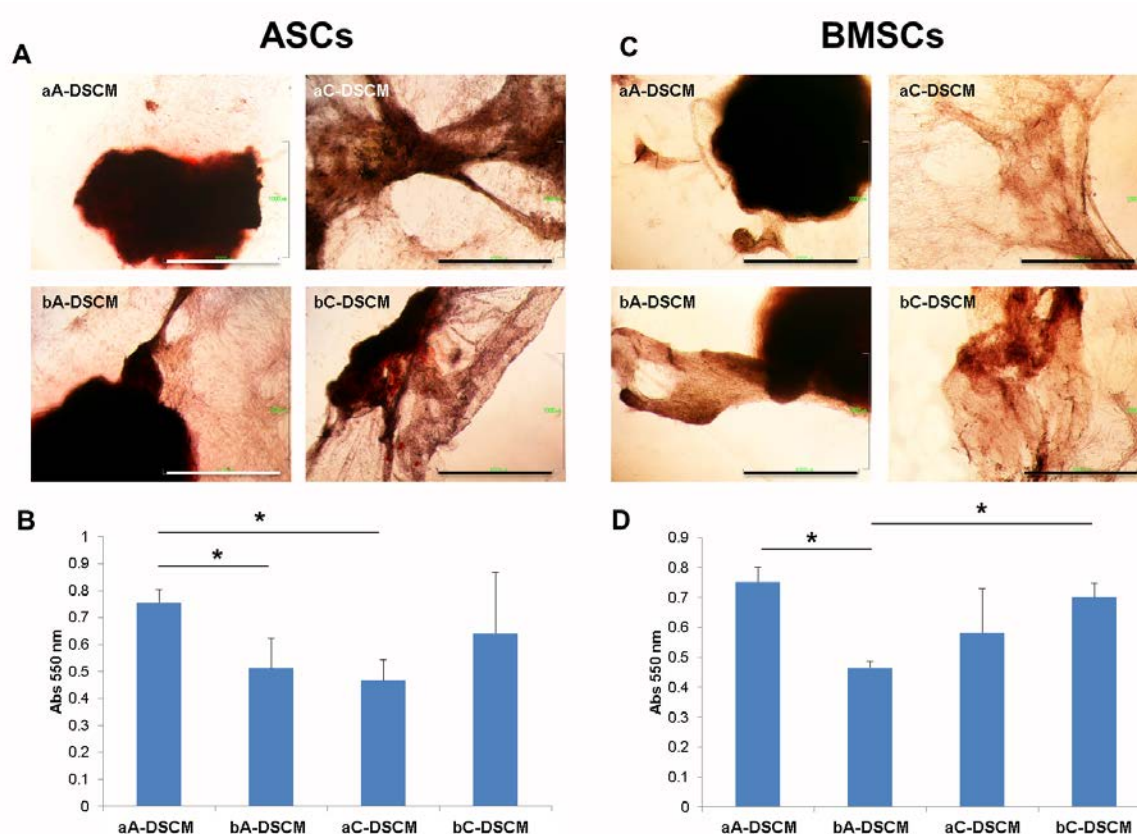


Figura 30: Análisis histológico de la osteogénesis de las ASCs (**A**) y de las BMSCs (**C**) por medio de tinción con rojo alizarín y cuantificación de la mineralización por absorbancia a 550 nm de ASCs (**B**) y BMSCs (**D**) creciendo sobre las DSCMs. Escala = 1.000 μ m. * $p \leq 0,05$.

4.15. PERFIL INMUNOMODULADOR DE LAS MSCs DE CABALLO.

4.15.1. Evolución de la expresión de los marcadores de superficie de MSCs de caballo en presencia de TNF

Las MSCs de caballo fueron incubadas con TNF durante 12 horas antes de analizar si esta citoquina alteraba o no la expresión de los marcadores de superficie CD90 y CD105. Los resultados obtenidos (Fig. 31 A), no fueron significativos para ambos CDs cuando se compararon con los obtenidos en las células sin ser estimuladas con TNF. Se pudo observar un ligero aumento de la expresión de CD90 en las MSCs que habían sido cultivadas con TNF, aunque dicho aumento no fue significativo.

4.15.2. Evolución de la multipotencialidad de MSCs de caballo en presencia de TNF

La multipotencialidad de las MSCs de caballo fue analizada por medio de tinciones histológicas y cuantificación de la eficiencia de diferenciación hacia adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis, cuando las MSCs eran estimuladas durante 12 horas con TNF o mantenidas con este factor durante los 15 días de diferenciación.

Los resultados obtenidos (Fig. 31 B, C y D), no mostraron diferencias significativas, excepto cuando las MSCs eran cultivadas durante 15 días con TNF en la diferenciación osteogénica ($p \leq 0,05$). Sin embargo, en el resto de diferenciaciones se observó, tanto en las tinciones histológicas como en las gráficas de cuantificación, que cuando las MSCs eran cultivadas con TNF durante las tres diferenciaciones, la capacidad de diferenciación disminuía, salvo en las diferenciaciones adipogénica y condrogénica de las MSCs estimuladas con TNF durante 12 horas, en las que se produjo un ligero aumento en la diferenciación comparado con las MSCs sin

estimular. También observamos un ligero aumento, no significativo, de la condrogénesis en las BMSCs estimuladas con TNF.

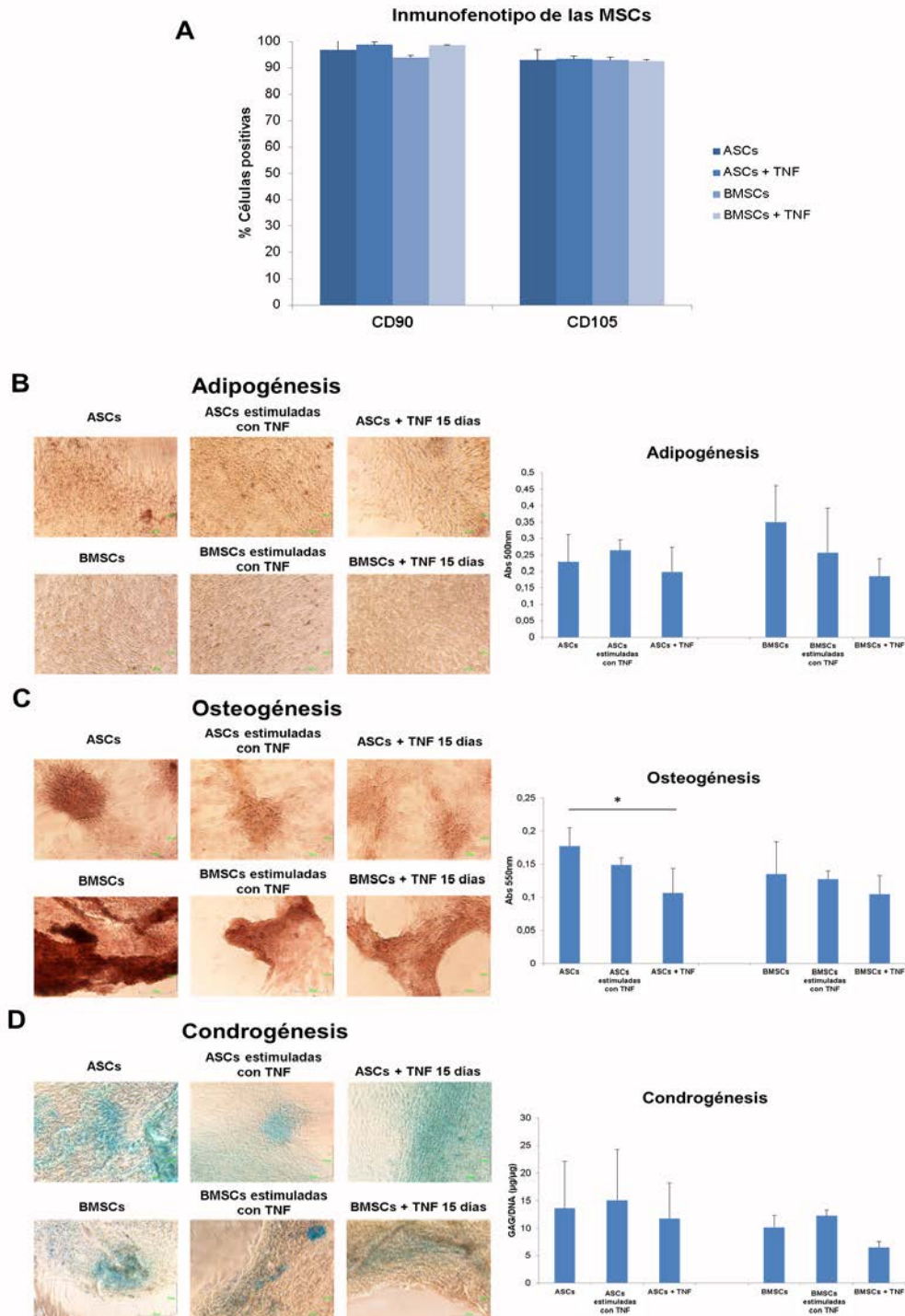


Figura 31: Inmunofenotipo de CD90 y CD105 de las MSCs de caballo incubadas durante 12 horas con TNF y comparadas con su control **(A)**. Evolución de la multipotencialidad de las MSCs de caballo mostrada por medio de imágenes y cuantificada por: los depósitos lipídicos teñidos (Abs 500nm) en adipogénesis, depósitos de calcio (Abs 550nm) en osteogénesis y la relación GAG/DNA en

condrogénesis, cuando son tratadas con TNF durante 12 horas o cultivadas con TNF durante la diferenciación (B, C, D).

4.15.3. Expresión de los genes iNOS, IL-6, TGF- β 1 y COX-2 de MSCs de caballo en presencia de TNF

Las MSCs de caballo fueron estimuladas con TNF durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo se analizó la expresión de los genes iNOS, IL-6, TGF- β 1 y COX-2 (Fig 32 A). Únicamente se encontraron diferencias significativas en la expresión de IL-6 en las BMSCs incubadas con TNF. Su expresión aumentó muy significativamente ($p \leq 0,005$) comparada tanto con las BMSCs sin TNF, como con las ASCs con y sin TNF. Los resultados obtenidos del resto de genes analizados alcanzaron valores de expresión relativamente bajos, ya que el valor de normalización (Expresión relativa del gen = 1) fue la expresión de los genes en condrocitos.

4.15.4. Cuantificación de PGE₂ y de óxido nítrico por las MSCs de caballo en presencia de TNF

La producción de PGE₂ por las MSCs incubadas durante 12 horas estimuladas con TNF fue cuantificada por ELISA. La cantidad de PGE₂ fue más alta en el caso de las BMSCs estimuladas con TNF (Fig. 32 B). Esta cantidad fue significativamente superior ($p \leq 0,005$) comparada con las ASCs estimuladas y no estimuladas con TNF y la producida por las BMSCs sin ser estimuladas con TNF.

En cuanto a la cantidad de óxido nítrico liberada al medio de cultivo por las MSCs, estimuladas y sin estimular con TNF, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 32 C). Aun así, se notó un ligero aumento en la producción de NO, tanto por las ASCs con TNF como por las BMSCs con TNF.

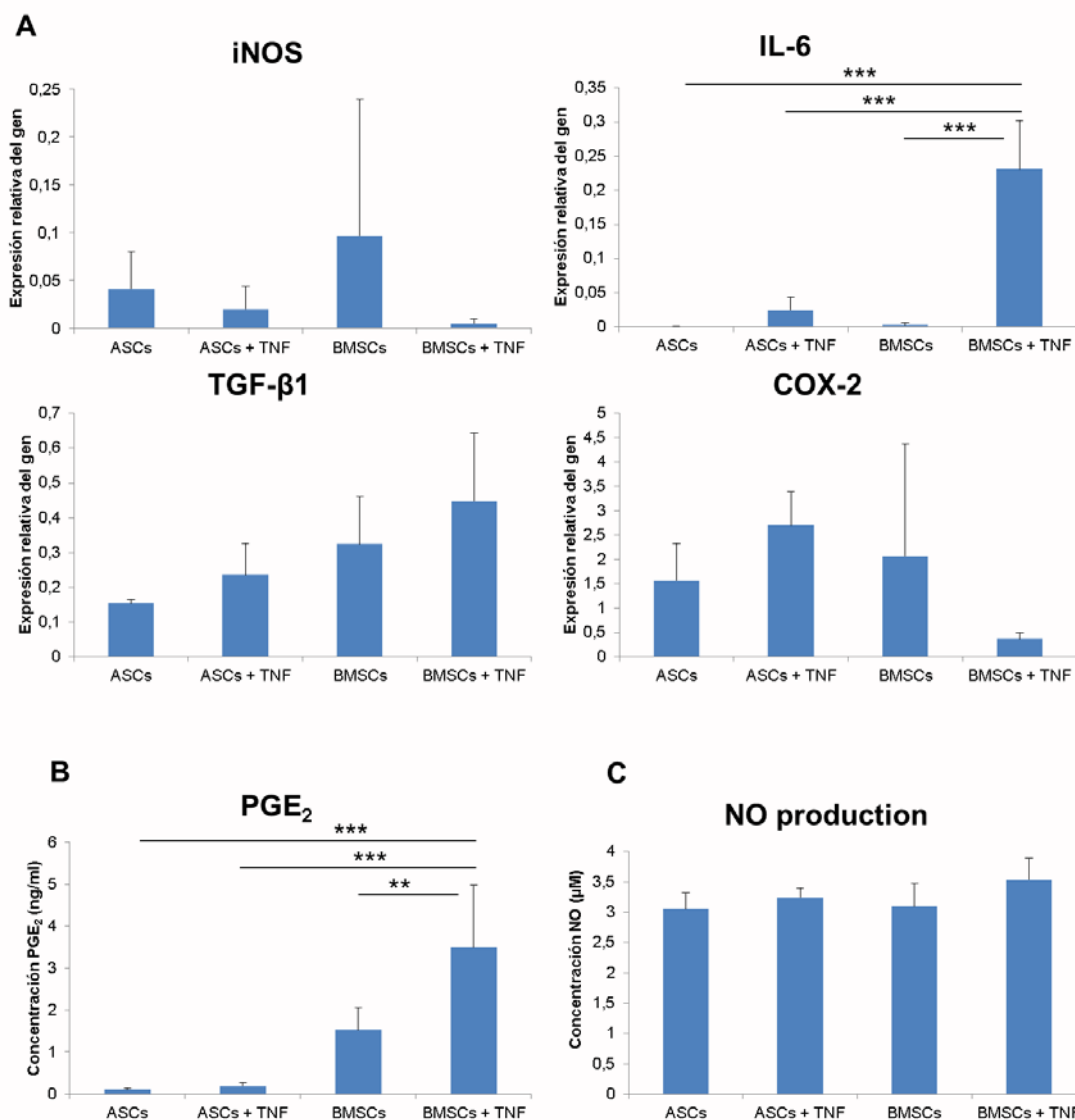


Figura 32: Análisis de la expresión relativa de los genes iNOS, IL-6, TGF-β1 y COX-2 (A), de la cuantificación de PGE₂ por medio de ELISA (B) y la producción de óxido nítrico (C) en las MSCs de caballo estimuladas con TNF durante 12 horas, comparadas con las MSCs en ausencia de TNF.

4.16. CO-CULTIVOS DE CÉLULAS DE CABALLO

4.16.1. Proliferación celular en co-cultivos

Con el fin de analizar, en los posteriores ensayos, la posible actividad inmunomoduladora de las MSCs sobre los condrocitos en co-cultivo, estudiamos el comportamiento de ambas poblaciones celulares cuando se sembraban juntas con una misma densidad celular.

Tanto las MSCs como los condrocitos de caballo, fueron teñidos con reactivos fluorescentes para analizar la proliferación celular en el co-cultivo en función del tiempo. La fluorescencia emitida fue analizada por microscopía confocal y por citometría, siendo teñidas las MSCs de verde y los condrocitos de violeta.

La diferencia en la proliferación celular se contrastó con el análisis en microscopía confocal (Fig. 33 A), donde se observó que los condrocitos crecían en grupos, ocupando más espacio e impidiendo que las MSCs pudiesen aumentar su proliferación. También, y debido a la diferencia morfológica de los condrocitos con las MSCs, la proliferación de estas últimas se vio reducida.

A las 24, 36 y 48 horas después de ser sembradas, en ambos casos, co-cultivo de condrocitos con ASCs y con BMSCs, se observó que la proliferación de los condrocitos era mayor que la de las MSCs (Fig. 33 B). En el caso del co-cultivo con ASCs, los porcentajes obtenidos fueron de 45% de células ASCs y 55% de condrocitos. En el caso del co-cultivo con BMSCs, los porcentajes obtenidos fueron de 35% de células BMSCs y 65% de condrocitos. No se encontraron diferencias en la proliferación celular cuando se añadía TNF al medio de cultivo.

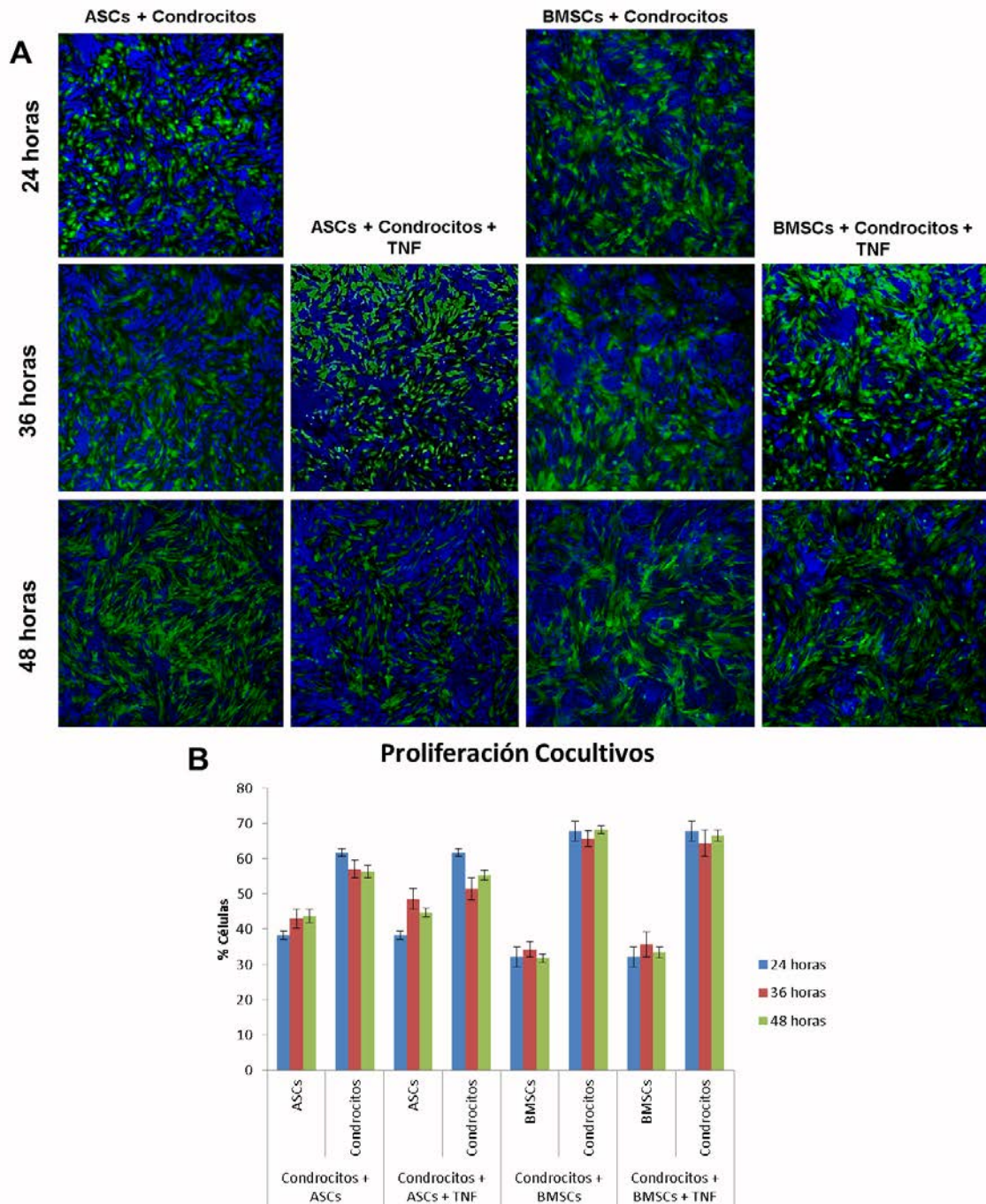


Figura 33: Análisis de la proliferación de los condrocitos (teñidas de violeta) y las ASCs y BMSCs (teñidas de verde) a las 24, 36 y 48 horas de cultivo con y sin TNF (añadido a las 24 horas), por medio de análisis por microscopía confocal (**A**) y la cuantificación por medio de citometría de flujo (**B**).

4.16.2. Expresión génica

Analizamos la expresión de los genes iNOS, IL-6, COX-2, TGF- β 1, COL2A1 y ACAN en los co-cultivos con ASCs y BMSCs estimuladas y sin estimular con TNF durante 12 horas (Fig. 34).

Los resultados obtenidos muestran un aumento muy significativo ($p \leq 0,005$) en la expresión de los genes de inflamación (iNOS e IL-6) en condrocitos tras ser estimuladas con TNF. Sin embargo, al cultivar los condrocitos con ASCs, la expresión de estos genes se vio reducida significativamente, cuando la comparamos con los condrocitos inflamados. Este mismo efecto se produce cuando los condrocitos son cultivados conjuntamente con las BMSCs.

No existen diferencias significativas en la expresión de COX-2 cuando se induce la inflamación en los condrocitos. La expresión de este gen se ve elevada en los co-cultivos con ASCs y BMSCs cuando son estimuladas con TNF. Esta expresión fue significativamente mayor en los co-cultivos con ASCs.

La expresión de TGF- β 1 no se ve alterada en ninguno de los casos de co-cultivos.

Los genes que inducen la regeneración de la matriz extracelular condrogénica, colágeno tipo II y agregano (COL2A1 y ACAN, respectivamente) también fueron analizados en las distintas condiciones de co-cultivo. La expresión de COL2A1 se mantuvo en los condrocitos cultivados con TNF y en las condiciones de co-cultivo con BMSCs, sin embargo, cuando los condrocitos fueron cultivados con ASCs, la expresión de este gen se vio reducida significativamente ($p \leq 0,05$).

A diferencia del colágeno, la expresión de agregano se redujo muy significativamente ($p \leq 0,005$), en todas las condiciones analizadas. Se observó incluso, que en las condiciones de co-cultivo

con BMSCs, la expresión de este gen era inferior a la expresión observada cuando los condrocitos eran cultivados con ASCs.

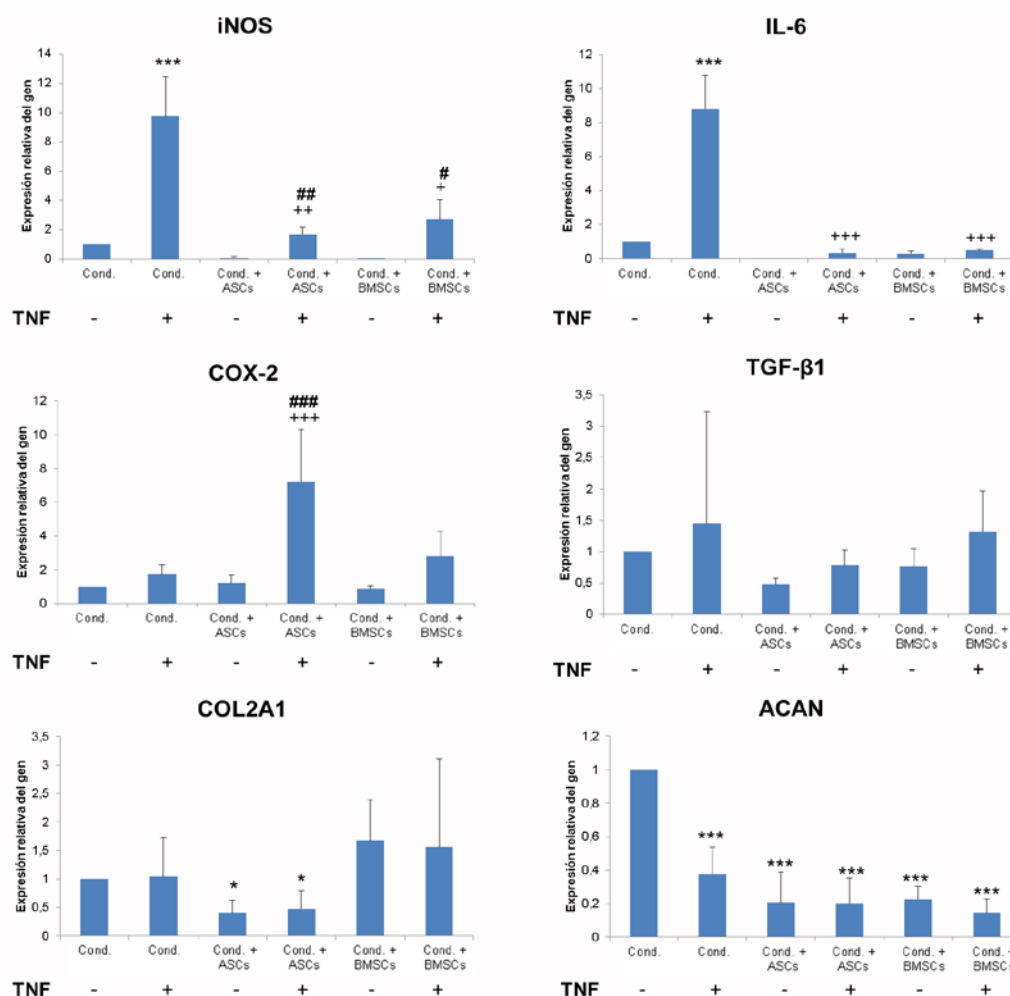


Figura 34: Análisis de la expresión relativa de los genes iNOS, IL-6, COX-2, TGF-β1, COL2A1 y ACAN en condrocitos de caballo y en condiciones de co-cultivo con ASCs y BMSCs a los que se les inducía la inflamación (TNF) durante 12 horas. *($p \leq 0,05$), ***($p \leq 0,005$) comparando con condrocitos no estimulados. +(p ≤ 0,05), ++(p ≤ 0,01), +++(p ≤ 0,005) comparando con condrocitos inflamados. #(p ≤ 0,01), ##(p ≤ 0,01), ###(p ≤ 0,005) comparado con su control sin TNF.

4.16.3. Producción de PGE₂

Cuantificamos por ELISA la concentración de PGE₂ secretada al medio de cultivo por los condrocitos cultivados con medio condicionado. La producción de PGE₂ fue significativamente más elevada cuando se cultivaron los condrocitos con TNF, en comparación con los condrocitos sin estimular (Fig. 35 A). La

expresión de PGE₂ en los co-cultivos estimulados con TNF se redujo significativamente ($p \leq 0,005$), cuando se comparaban con los condrocitos inflamados. Esta reducción fue comparable a la de los co-cultivos sin estimular, no encontrando diferencias significativas en la concentración de PGE₂.

4.16.4. Concentración de óxido nítrico (NO)

Se cuantificó la concentración de óxido nítrico secretada por los condrocitos y los co-cultivos al medio utilizando un análisis colorimétrico.

Los resultados obtenidos (Fig. 35 B) muestran que la expresión de NO se elevó en los condrocitos estimulados con TNF. Del mismo modo, la concentración de NO en los co-cultivos sin estimular con TNF, fue inferior a la obtenida en los condrocitos sin estimular. Al añadir TNF al medio de los co-cultivos, la concentración de TNF se redujo significativamente ($p \leq 0,05$) comparada con los condrocitos con TNF. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de NO cuando se comparaban los co-cultivos con y sin estimular con TNF, asumiendo que las concentraciones de NO obtenidas son equivalentes a las de su control.

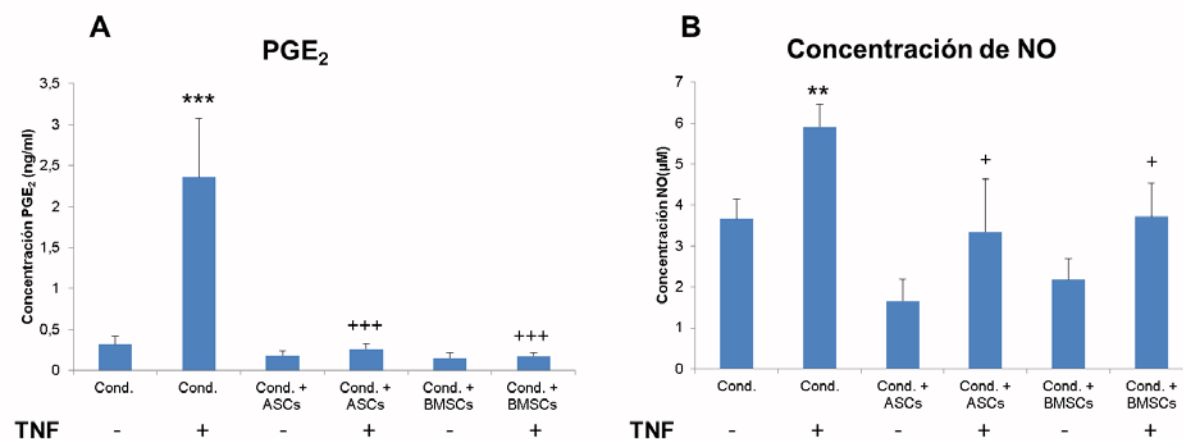


Figura 35: Concentración de PGE₂ (A) y de óxido nítrico (NO) (B) secretada al medio de cultivo por condrocitos de caballo y co-cultivos de ASCs y BMSCs con condrocitos con y sin TNF. **($p \leq 0,01$), ***($p \leq 0,005$) comparando con condrocitos no tratados. +($p \leq 0,05$), +++($p \leq 0,005$) comparando con condrocitos inflamados.

4.17. ADICIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS EN CULTIVOS DE CONDROCITOS DE CABALLO

Después de obtener una monocapa de condrocitos de caballo, se cambió el medio de cultivo por el medio condicionado obtenido de las MSCs durante 12 horas de cultivo. Posteriormente, a este medio se le adicionó TNF en los casos indicados en la tabla 6 de materiales y métodos y se cultivó durante 12 horas.

4.17.1. Expresión génica

En la figura 36 se recogen los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales para todos los genes analizados. Tras estimular con TNF los condrocitos, se produjo un aumento significativo ($p \leq 0,005$) de la expresión de los genes pro-inflamatorios iNOS e IL-6, mientras que cuando se añadía el medio condicionado al cultivo celular procedente del cultivo de ASCs y BMSCs con y sin TNF, la expresión de estos genes se redujo significativamente en todos los casos (Fig. 31).

El efecto del medio condicionado no produjo efectos significativos sobre la expresión del gen COX-2, el cual es el encargado de activar

la producción de PGE₂. El mismo efecto se produjo en la expresión del gen TGF-β1, en el cual no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los casos analizados.

También fueron estudiados los genes que sintetizan matriz extracelular condrogénica, COL2A1 y ACAN. El efecto del medio condicionado y la estimulación con TNF no produjeron ningún efecto significativo en la expresión de colágeno tipo II, excepto cuando se cultivaron las células con el medio condicionado procedente de BMSCs que habían sido estimuladas con TNF. Dicha expresión se vio significativamente reducida ($p \leq 0,05$) comparando con los condrocitos no estimulados.

El efecto contrario ocurrió en la expresión de agrecano (ACAN). En todos los casos analizados se produjo una reducción muy significativa ($p \leq 0,005$) de su expresión cuando se comparaba con el cultivo de condrocitos no tratados.

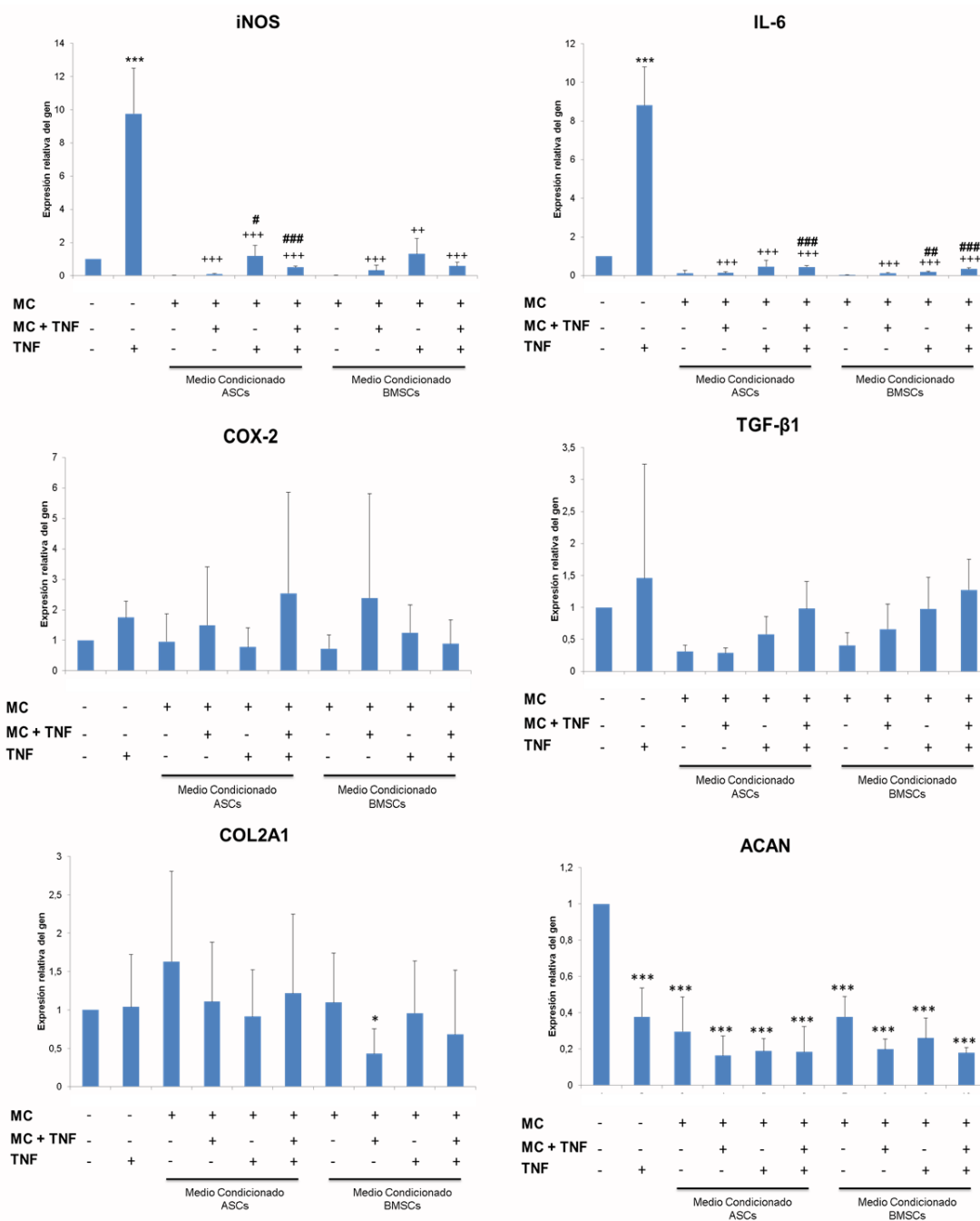


Figura 36: Análisis de la expresión relativa de los genes iNOS, IL-6, COX-2, TGF-β1, COL2A1 y ACAN en condrocitos de caballo creciendo con los medios condicionados (MC) procedente de ASCs y BMSCs, producido tras estar o no estimuladas las células con TNF (MC+TNF) durante 12 horas. Estos condrocitos posteriormente fueron estimulados con (TNF) durante 12 horas. El símbolo positivo indica presencia y el negativo ausencia de MC, MC + TNF y TNF. *(p≤0,05), *** (p≤0,005) comparando con condrocitos no tratados. ++ (p≤0,01), +++ (p≤0,005) comparando con condrocitos inflamados. ## (p≤0,01), ### (p≤0,005) comparado con su control sin TNF.

4.17.2. Producción de PGE₂

La cuantificación de la concentración de PGE₂ secretada al medio de cultivo por los condrocitos cultivados con medio condicionado fue analizada mediante ELISA. La producción de PGE₂ fue significativamente más elevada cuando se cultivaron los condrocitos con medio condicionado. Los resultados obtenidos (Fig. 37 A) en los controles de los medios condicionados, tuvieron una expresión más elevada que el control positivo de condrocitos inflamados. Al añadir TNF y medio condicionado, la producción de PGE₂ se vio incrementada hasta 6 veces el valor del control positivo.

4.17.3. Concentración de óxido nítrico (NO)

Se cuantificó la expresión de NO secretada por los condrocitos al medio de cultivo utilizando un análisis colorimétrico.

Los resultados obtenidos (Fig. 37 B) en los condrocitos cultivados con medio condicionado procedente de ASCs, fueron reducidos significativamente en todos los casos, excepto cuando se añadió medio condicionado obtenido por ASCs cultivadas con TNF y al que, posteriormente, se añadió TNF. Este valor obtenido fue semejante al de condrocitos inflamados y fue significativamente más alto comparado con el valor obtenido sin la adición de TNF.

El mismo efecto se produjo en los condrocitos cultivados con medio condicionado procedente de BMSCs. La expresión de NO se redujo aunque no de forma significativa.

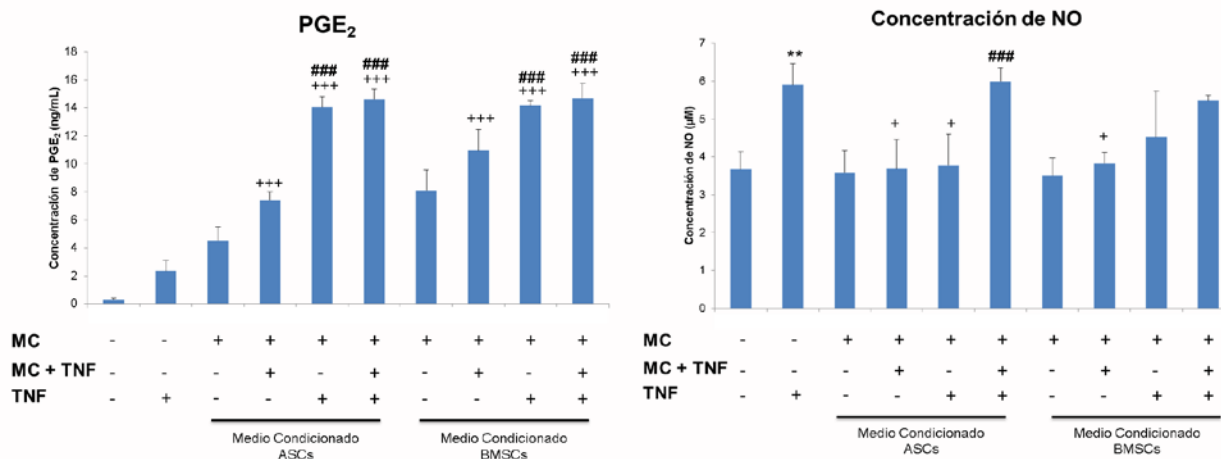


Figura 37: Concentración de PGE₂ (A) y de óxido nítrico (NO) (B) secretada al medio de cultivo por condrocitos de caballo creciendo con los medios condicionados (MC) procedente de ASCs y BMSCs, producido tras estar o no estimuladas las células con TNF (MC+TNF) durante 12 horas. Estos condrocitos posteriormente fueron estimulados con (TNF) durante 12 horas. El símbolo positivo indica presencia y el negativo ausencia de MC, MC + TNF y TNF. **($p \leq 0,01$) comparando con condrocitos no tratados. +($p \leq 0,05$), +++($p \leq 0,005$) comparando con condrocitos inflamados. ###($p \leq 0,005$) comparado con su control sin TNF.

4.18. EFECTO INMUNOMODULADOR DEL CONDROITÍN SULFATO SOBRE CO-CULTIVOS HUMANOS

4.18.1. Proliferación celular en co-cultivos

Se analizó la proliferación celular de las ASCs y de los condrocitos de humano en crecimiento en co-cultivo en ausencia y presencia de TNF y CS a las 12, 24 y 36 horas de cultivo, con el fin de constatar el efecto inmunomodulador de las ASCs, siendo teñidas las MSCs de violeta y los condrocitos de verde.

Tanto los resultados obtenidos por microscopía confocal (Fig. 38 A-B), como los analizados por citometría de flujo (Fig. 38 C), mostraron un crecimiento más elevado de los condrocitos en comparación con las ASCs. Este porcentaje fue de un 35% para las ASCs en el co-cultivo, mientras que para los condrocitos el porcentaje llegó a ser del 65%. Este porcentaje no se alteró por la presencia de TNF y CS en el medio de cultivo. El crecimiento de las dos líneas celulares no fue equivalente debido a que la morfología de las células era distinta, como se puede ver en los controles de los dos tipos

celulares, siendo las ASCs las células que presentaban un mayor tamaño.

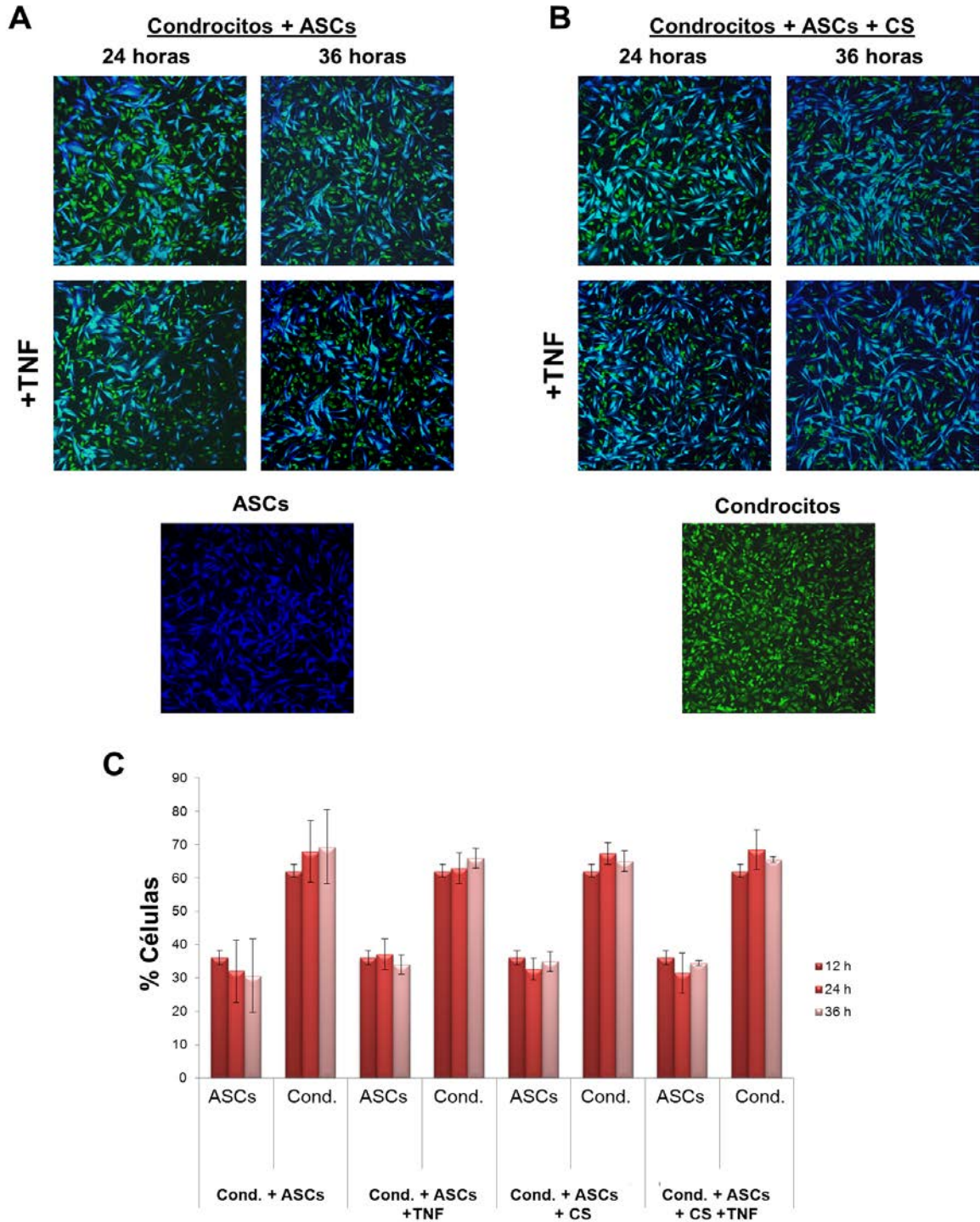


Figura 38: Análisis de la proliferación de los condrocitos (teñidos de verde) y las ASCs (teñidas de violeta), a las 24 y 36 horas en cultivo con y sin TNF (añadido a las 24 horas), y tras añadir CS a las 24 horas al medio de cultivo, con microscopía confocal (A, B) y la cuantificación por medio de citometría de flujo (C).

4.18.2. Expresión génica

Analizamos la expresión de los genes IL-6, iNOS, MMP-13, IDO-1, TNF y TGF- β 1 en los co-cultivos de condrocitos con ASCs y la adición de CS en los medios correspondientes (Fig. 39). En las distintas condiciones experimentales se indujo la inflamación con TNF.

La expresión de los genes que inducen inflamación en condrocitos, IL-6 e iNOS, se vio aumentada de forma muy significativa ($p \leq 0,005$) cuando eran estimuladas con TNF, sin embargo, al añadir el CS la expresión de IL-6 se redujo significativamente, y la de iNOS, pero ésta no de forma significativa. Las ASCs sometidas al efecto de TNF aumentaron la expresión de IL-6, aunque en menor cantidad que los condrocitos inflamados. En las condiciones de co-cultivo, la expresión relativa de estos dos genes se vio reducida y de forma más notable cuando se añadió CS al medio de cultivo.

El mismo efecto se produjo con la MMP-13 y con TNF. Tanto la expresión de esta metaloproteasa como del factor de necrosis tumoral se redujeron muy significativamente en condiciones de co-cultivo y cuando se añadía CS al medio, incluso hasta alcanzar valores semejantes a los obtenidos con las células que no habían sufrido el efecto del TNF.

Las expresiones de IDO-1 y de TGF- β no experimentaron muchos cambios considerables en la mayoría de las muestras analizadas. La expresión de IDO-1 fue más elevada en condrocitos y en co-cultivos inflamados con y sin CS, aunque esta expresión no fue significativa. La expresión de TGF- β no se alteró en los distintos casos analizados, excepto en los co-cultivos de condrocitos y ASCs a los que se añadió CS y TNF, donde se redujo significativamente su expresión.

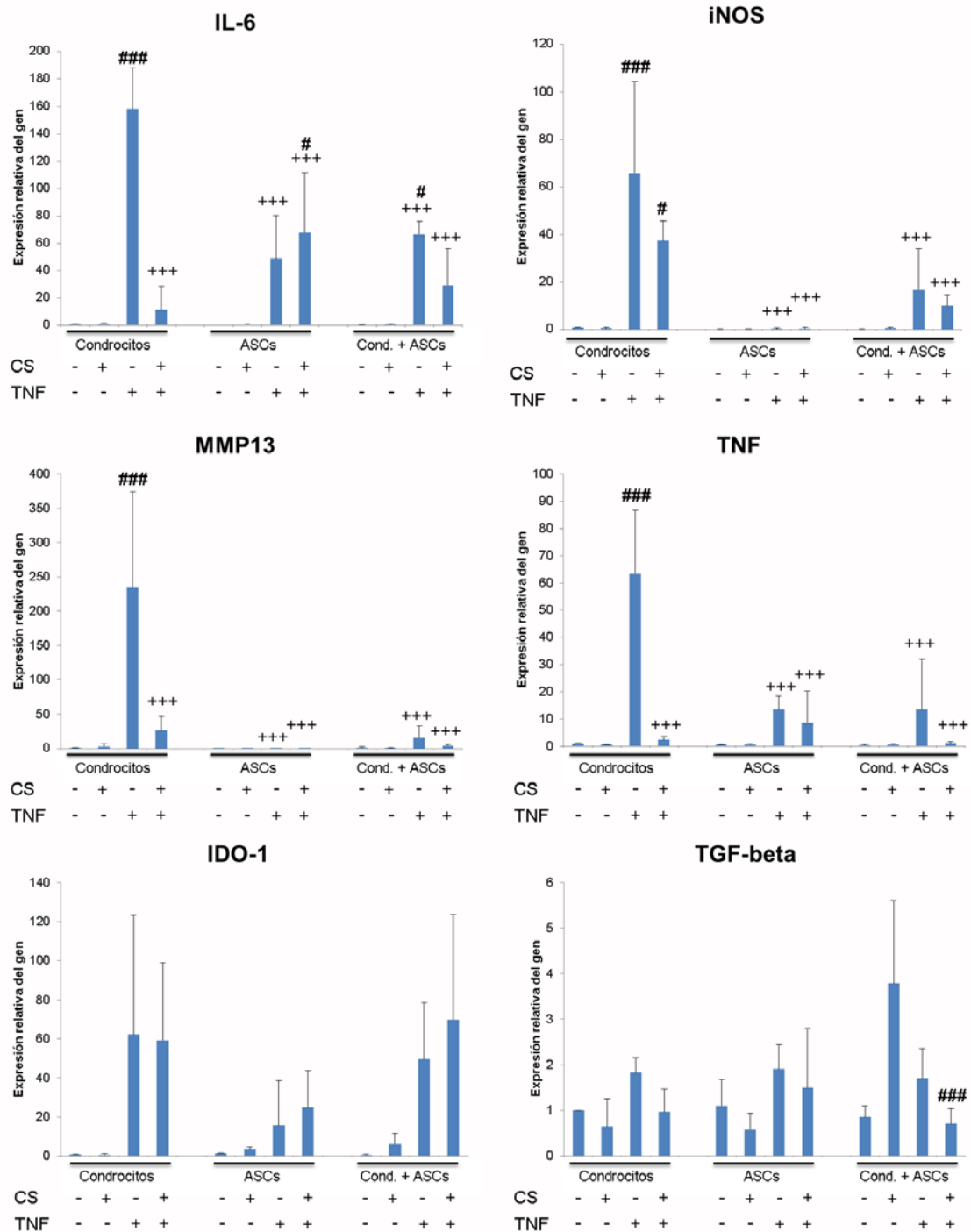


Figura 39: Análisis de la expresión relativa de los genes IL-6, iNOS, MMP-13, IDO-1, TNF y TGF-β1 en condrocitos de humano, ASCs y co-cultivos de condrocitos y ASCs a los que se les adicionó condroitín sulfato (CS) durante 12 horas y posteriormente se les inducía inflamación (TNF) durante 12 horas. +++(p<0,005) comparando con condrocitos inflamados. #(p<0,05), ##(p<0,01), ###(p<0,005) comparado con su control sin TNF.

4.18.3. Evolución de expresión de genes específicos de condrogénesis

Analizamos la expresión de los genes específicos de condrogénesis SOX-9, ACAN y COL2A1 en los co-cultivos con ASCs y la adición de CS en los medios correspondientes (Fig. 40). En las distintas condiciones experimentales se estimularon con TNF.

Se pudo observar cómo al añadir condroitín sulfato a los condrocitos sin ser estimulados con TNF, tanto la expresión de ACAN como la de COL2A1, aumentó muy significativamente ($p \leq 0,005$). Sin embargo, al añadir TNF y CS a los condrocitos, la expresión de los tres genes específicos de condrogénesis no sufrió cambio significativo.

Este mismo efecto ocurrió en los co-cultivos, donde se pudo comprobar un aumento de la expresión de los genes aunque no de manera significativa.

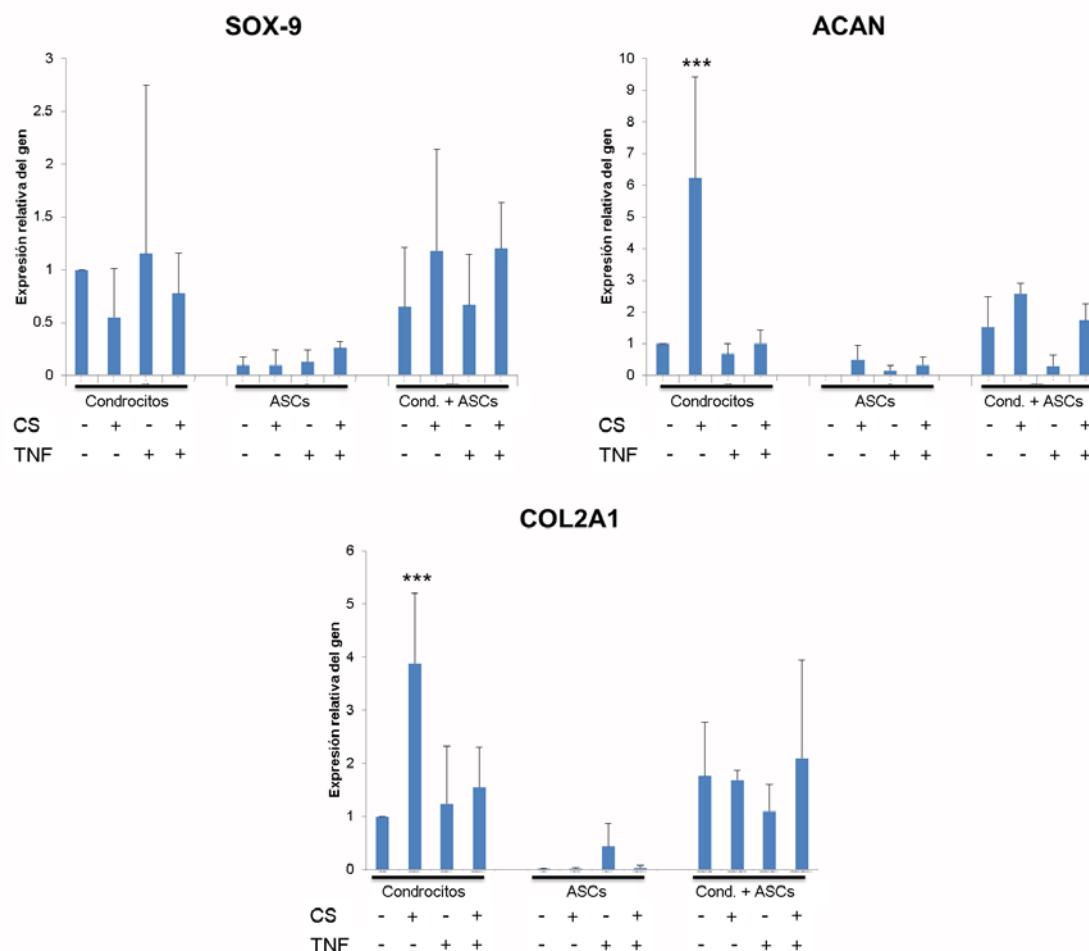


Figura 40: Análisis de la expresión relativa de los genes de específicos de condrogénesis SOX-9, ACAN y COL2A1 en condrocitos de humano, ASCs y co-cultivos de condrocitos y ASCs a los que se les adicionó condroitín sulfato (CS) durante 12 horas y posteriormente se les inducía inflamación (TNF) durante 12 horas. ***($p \leq 0,005$) comparando con condrocitos sin estimular con TNF.

4.18.4. Cuantificación de PGE₂

Se analizó la concentración de PGE₂ liberada al medio de cultivo en las distintas condiciones experimentales por ELISA.

En todos los casos estudiados la expresión de PGE₂ se incrementó en gran medida al añadir TNF al medio de cultivo. Esta concentración fue muy elevada incluso en las ASCs y los condrocitos tratados con CS (Fig. 41).

La cantidad de PGE₂ se redujo en un único caso, en el co-cultivo de condrocitos y ASCs al que se le añadió CS al medio de cultivo.

Esta reducción fue significativa cuando la comparamos con los condrocitos inflamados ($p \leq 0,01$) y cuando la comparamos con el co-cultivo al que no se le había añadido CS ($p \leq 0,01$).

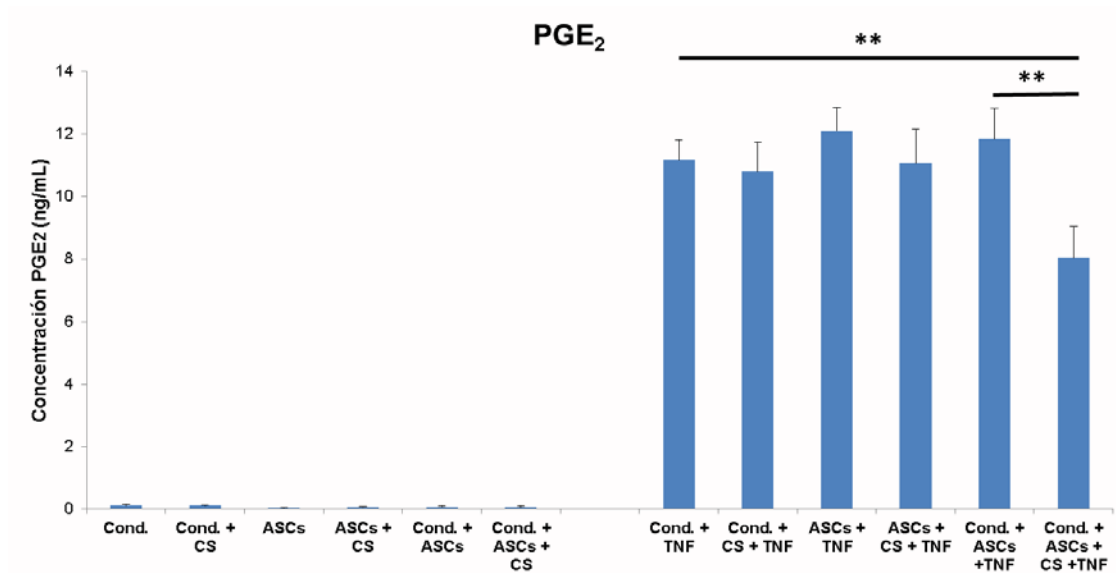


Figura 41: Concentración de PGE₂ secretada al medio de cultivo por condrocitos, ASCs y co-cultivo de condrocitos y ASCs de humano a los que se les añadió condroitín sulfato (CS) y fue inducida la inflamación con TNF. **($p \leq 0,01$).

5. DISCUSIÓN

Uno de los principales retos que presenta la medicina actual en el tratamiento de las enfermedades osteoarticulares es desarrollar un tratamiento económico y efectivo, sin que complique la salud del paciente, y que, a ser posible, sea obtenido del propio paciente. Los tratamientos convencionales no resuelven estas patologías a largo plazo y presentan el inconveniente de los efectos secundarios. Los tratamientos agresivos, como la sustitución de estructuras anatómicas por prótesis, no siempre dan buenos resultados. Por ello, es fundamental conseguir nuevos avances terapéuticos que puedan resolver estos problemas.

En los últimos años, la ingeniería de tejidos es considerada una ciencia que fusiona los campos de la biología celular, la ingeniería, la ciencia de los materiales y la cirugía, con el fin de regenerar la funcionalidad tisular. Los tres componentes críticos en la ingeniería de tejidos y, concretamente, en la regeneración del cartílago son: conseguir el número de células suficientes para reparar el defecto (tales como condrocitos o células troncales multipotentes), el acceso a factores de crecimiento y diferenciación, y el molde o matriz portadora de las células para adaptarse al defecto, favoreciendo la proliferación celular y la diferenciación [304].

En nuestro trabajo hemos obtenido células troncales mesenquimales de caballo y humano, desarrollando distintas técnicas con el fin de evaluar su capacidad en la regeneración del cartílago y su papel inmunomodulador en enfermedades que afectan a la integridad de la articulación como la osteoartrosis o la artritis reumatoide.

5.1. OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES Y CONDROCITOS DE CABALLO Y DE HUMANO

Las especies animales utilizadas en este trabajo fueron dos, el caballo y el hombre. El caballo (*Eqqus ferus caballus*) es considerado un buen modelo animal para el estudio de las enfermedades osteoarticulares, ya que, sus articulaciones, en especial la articulación fémoro-tibio-rotuliana, presenta similitudes con la misma articulación humana [305]. Además, el caballo es considerado por la FDA como modelo animal para el estudio de la osteoartritis humana.

Por otra parte, se analizó el efecto inmunomodulador de las MSCs de humano para obtener resultados comparables al estudio realizado en caballo.

El tejido adiposo de caballo se obtuvo de la región glútea dorsal mediante una pequeña incisión, evitando daños y molestias posteriores a los animales intervenidos. El aislamiento celular se realizó mediante una digestión enzimática, descrita previamente por Robdell [300]. Tras la centrifugación, el pellet resultante estaba formado por la Fracción Estromal Vascular (SVF) [306,307]. Esta fracción consistía en una población heterogénea compuesta por dos grupos celulares: células adherentes y células no adherentes pequeñas y anucleadas, en su mayoría eritrocitos. La población celular adherente, con células de mayor tamaño y nucleadas, estaba compuesta por preadipocitos, fibroblastos, células del músculo liso, pericitos y las ASCs [308]. En nuestro estudio, obtuvimos un gran número de células después de la digestión del tejido, equivalente a otros estudios realizados previamente [309]. Las ASCs de caballo presentan una morfología fibroblástica de gran tamaño (entre 20-25 μm), con un núcleo central visible y con prolongaciones

citoplasmáticas, que al ser cultivadas dan lugar a la homogeneización morfológica celular [310].

Las BMSCs de caballo fueron obtenidas de la médula ósea del esternón del caballo y aisladas por medio de gradiente de Ficoll[®]. El número de células obtenidas por cantidad de tejido, fue inferior al obtenido de tejido adiposo, presentando un crecimiento aislado en clones, distinto al crecimiento en fase inicial de las ASCs de caballo. Este comportamiento ya fue caracterizado en estudios anteriores [311].

La proliferación celular fue rápida en ambos tipos celulares, aunque las ASCs presentaron un crecimiento poblacional más rápido que las BMSCs, obteniendo mayor cantidad de células en periodos más cortos de tiempo [312,313].

Los condrocitos de caballo se aislaron en gran número a partir de una digestión enzimática del tejido. Se observaron diferencias en el tiempo de digestión de la matriz extracelular por individuos, pero, en todos los casos, el tiempo de digestión no superó las 8 horas. Como se describe en estudios previos [314], los condrocitos presentaban un crecimiento más lento y esta población celular tenía un tamaño celular inferior al de las MSCs y con una morfología redondeada. No se encontraron diferencias en la cantidad de células obtenidas de los distintos caballos utilizados en el ensayo, se pudo observar que el crecimiento en los pases iniciales en algunos individuos, fue más rápido que en otros.

Las ASCs de humano se obtuvieron de la grasa infrapatelar (grasa de Hoffa) de pacientes sometidos a artroplastias totales de la articulación fémoro-tibio-rotuliana. El protocolo que se utilizó fue el mismo que el realizado para obtener las ASCs de caballo. Obtuvimos un número muy elevado de ASCs tras la digestión enzimática de la

matriz extracelular, entre 100.000 y 300.000 células por gramo de tejido. Estas células ya habían sido caracterizadas anteriormente por su fácil obtención, aislamiento y aplicaciones en humano [315].

El tejido cartilaginoso obtenido de las cirugías de artroplastia total de rodilla solía estar alterado, debido a las agresiones a las que estaba sometido durante la intervención. La cantidad de células obtenidas tras la digestión del tejido, fue muy diferente entre pacientes, llegando en algunos casos, a ser imposible obtener una población celular suficiente para su multiplicación. Este tipo celular fue el que presentó un crecimiento más lento, y fueron necesarios más días en cultivo hasta alcanzar el número de células necesario para continuar con el experimento [316].

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs

El Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee for the International Society for Cellular Therapy define las Multipotent Mesenchymal Stromal Cells (MSC) [317], anteriormente denominadas mesenchymal stem cells, como células adherentes al plástico en condiciones de cultivo estándar, aisladas de médula ósea y otros tejidos; que expresan los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90 en un porcentaje igual o superior al 95% de la población celular medido mediante citometría de flujo; y que presentan un porcentaje inferior al 2% para los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α y HLA clase II. Además de poseer el potencial de diferenciarse *in vitro* hacia adipocitos, condrocitos y osteocitos [318].

Las células adherentes aisladas de tejido adiposo, tanto de caballo como de humano, y de médula ósea de caballo, presentaron resultados positivos para los marcadores específicos de MSCs en un porcentaje superior al 90%. En el caso de caballo, los resultados para el marcador de superficie CD73 fueron negativos, esto fue debido a la

inespecificidad del anticuerpo usado y a que, en la actualidad, no existe este anticuerpo en el mercado específico para caballo.

La segunda fase de caracterización de las MSCs fue el análisis de su multipotencialidad hacia las tres líneas mesodérmicas: condrocitos, adipocitos y osteocitos [319]. Las tres líneas celulares analizadas en este estudio, presentaron cambios estructurales y metabólicos al ser sometidas a condiciones de diferenciación. Estos cambios fueron puestos de manifiesto por las tinciones histológicas y de inmunofluorescencia.

Tanto las ASCs como las BMSCs de caballo, formaron nódulos condrogénicos que se tiñeron con azul alcian al inducirse la diferenciación condrogénica. Al ser diferenciadas hacia una línea osteogénica, los acúmulos cálcicos producidos se tiñeron con rojo alizarin y von Kossa. Y al ser inducida la diferenciación adipogénica, se tiñeron los depósitos intracelulares lipídicos que se formaron con oil red-O. Estos datos se corresponden con estudios de multipotencialidad realizados anteriormente en MSCs procedentes de caballo [309,320,321] y humano [319].

Después de analizar la expresión de los marcadores de superficie y comprobar la multipotencialidad hacia osteocitos, condrocitos y adipocitos de las ASCs y BMSCs procedentes de caballo, no se encontraron diferencias entre ambas líneas celulares mesodérmicas. Resultados coincidentes con los descritos por Ahern y col. [310].

Los resultados obtenidos de las pruebas de multipotencia de las ASCs de humano fueron los mismos que los obtenidos en las MSCs de caballo. Todas las condiciones analizadas por tinciones histológicas fueron positivas y recogidas en las imágenes de la figura 14. Estudios realizados [322,323] concluyen datos semejantes a los mostrados en este trabajo.

Con los datos obtenidos, pudimos confirmar que estas células correspondían a un cultivo primario de células troncales mesenquimales, por lo tanto, continuamos los experimentos de la presente Tesis Doctoral.

5.3. ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN EN LAS MSCs DE CABALLO

Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue optimizar un protocolo de transfección estable en las MSCs de caballo, evitando que la toxicidad del producto transfectante fuese elevada y consiguiendo una alta eficiencia de transfección.

Con los productos lipotransfectantes se suelen obtener porcentajes de transfección más bajos que con métodos físicos de transfección [324] y el porcentaje aún se reduce más cuando se realiza en cultivos primarios, principalmente MSCs, llegando, en algunos casos, a obtenerse tasas muy bajas de células transfectadas [235]. En algunos casos, se han conseguido porcentajes superiores al 30% de células lipotransfectadas en ASCs de caballo [103], pero utilizando productos más específicos y menos accesibles, como es el lipofectante LTX transfection reagent[®].

En nuestro caso, los porcentajes obtenidos para los dos tipos celulares de estudio fueron bajos, no llegando a superar un 10% en ninguna de las condiciones (Fig. 15). Este hecho puede ser debido al metabolismo de los cultivos primarios, y la sensibilidad de estas células frente a las de un cultivo estandarizado o una línea celular.

El número de células transfectadas obtenidas en los dos tipos celulares de caballo utilizando Lipofectamine 2.000[®], fueron prácticamente iguales observándose una pequeña variación en el uso de los ratios de concentración plásmido/producto transfectante. En el

caso de las BMSCs el ratio más alto fue el óptimo, con el que se obtuvo una mayor eficiencia de transfección.

Con el producto transfectante SAFEctin[®], el porcentaje de células transfectadas fue inferior, no alcanzando los valores obtenidos con el uso de Lipofectamine 2.000[®] en los dos tipos celulares. El producto SAFEctin[®] ofrece mejores resultados de transfección en cultivos celulares estandarizados, tales como HeLa [325].

En los cultivos primarios, suelen presentarse problemas de proliferación y viabilidad cuando se les elimina el SFB del medio [326]. Por lo tanto, es aconsejable que estas células permanezcan en todo momento con SFB durante su cultivo. Sin embargo, el uso de sueros en los medios de transfección reduce su eficiencia, debido a la presencia de nucleasas y otras proteínas. En el caso de las ASCs de caballo, los resultados obtenidos no son muy significativos en presencia o no de suero en el medio de cultivo, mientras que las BMSCs de caballo presentaron resultados opuestos a los anteriores, obteniéndose mejores resultados en presencia de suero (Fig. 15). Se suelen obtener resultados muy diversos utilizando suero en el medio transfectante [230].

Cuando se realizan transfecciones, la toxicidad del producto transfectante es el segundo factor más importante a tener en cuenta después de la eficiencia de transfección, tanto en cultivos celulares como en ensayos *in vivo*. El uso de productos transfectantes fáciles de utilizar y que generen baja mortandad celular mejoran los ensayos de transfección.

Se ha observado que Lipofectamine 2.000[®] presenta una baja citotoxicidad en varias líneas celulares, siendo los porcentajes de viabilidad superiores al 60-70% [215]. Los resultados de viabilidad obtenidos usando Lipofectamine 2.000[®] en nuestros tipos celulares

fueron superiores al 60%, en presencia de suero, evidenciando lo anteriormente citado. El aumento de la concentración de Lipofectamine 2.000[®] reduce hasta un 5% la viabilidad del cultivo.

En cuanto al producto SAFEctin[®], los resultados de viabilidad que obtuvimos fueron más altos que con Lipofectamine 2.000[®], superiores al 70%. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos [234], indicando que el uso del lipoagente SAFEctin[®] reduce la citotoxicidad en cultivos celulares transfectados, aunque las eficiencias de transfección son bajas.

5.4. AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE MSCs GFP⁺ DE CABALLO

Las MSCs de caballo se aislaron mediante la adición de geneticina (G418) al medio de cultivo. En el plásmido con el que transfectamos nuestras células, se encontraba un gen (*neo*) que produce una proteína que genera resistencia a la droga G418. El efecto de la geneticina en el metabolismo celular y en su crecimiento, tiene implicaciones tanto en las células transfectadas como en las no transfectadas [327]. Nuestros resultados mostraron que la concentración óptima de G418 para aislar las células GFP⁺ era de 500µg/mL para las ASCs y 450µg/mL para las BMSCs, concentración que coincide con la descrita en estudios previos [103]. El aislamiento de las líneas celulares se realizó en las 24 horas posteriores a la transfección, debido a que, como se muestra en la figura 16, la expresión de la GFP disminuía a partir del primer día.

Tras aislar las líneas celulares GFP⁺, se procedió a caracterizarlas para comprobar que mantenían las características de las células troncales mesenquimales. Para ello cuantificamos la expresión de sus marcadores de superficie y la diferenciación hacia las tres líneas mesenquimales.

La expresión del marcador de superficie CD90 en las MSCs y MSCs GFP⁺ fue superior al 90%, sin embargo, cuando se analizó el marcador de superficie CD105 la población celular de BMSCs GFP⁺ fue positiva en un 80%, inferior al 90%. La expresión de estos marcadores de superficie en células aisladas con una transfección estable, también fue puesta de manifiesto en un estudio previo [328], donde la expresión de estos marcadores de superficie fue superior al 90%.

En este mismo estudio, junto con otros trabajos [103,235,329], se analizó el potencial de diferenciación de las MSCs transfectadas establemente hacia las tres líneas. En este artículo se revelaron resultados positivos hacia las tres líneas, aunque tras diferenciar las células a adipocitos, la expresión de la fluorescencia verde se vio reducida significativamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo para el caso de las ASCs GFP⁺, donde también se redujo la expresión de GFP en la diferenciación adipogénica, en presencia y ausencia de G418 en el medio de diferenciación. Sin embargo, los resultados obtenidos para las BMSCs transfectadas mostraron una disminución en la capacidad de diferenciación hacia las tres líneas, debido a su baja proliferación celular y a su apariencia apoptótica.

Estudios anteriores realizados en MSCs GFP⁺ de caballo, demuestran que la diferenciación condrogénica en las células transfectadas se vio significativamente reducida en comparación con las células no transfectadas [330]. Por el contrario, nuestros resultados demostraron que la diferenciación condrogénica en las ASCs tras 15 días, fue equivalente en las células transfectadas y en las no transfectadas.

El fenotipo de las ASCs sin transfectar es muy similar, aunque no idéntico, al de las BMSCs [331]. Se puso de manifiesto en nuestros resultados, que existían diferencias en los dos tipos celulares, ya que las ASCs soportan mejor el proceso de transfección y su posterior aislamiento, que las BMSCs.

5.5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MSCs Y MSCs GFP⁺ DE CABALLO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

En la actualidad, existen muy pocos estudios comparativos de la morfología de las MSCs [332-338] y solamente uno describe las diferencias morfológicas en las MSCs de rata con transfección estable [332].

Por lo tanto, este es el primer estudio morfológico que describe la ultraestructura tanto de las ASCs como de las BMSCs de caballo por medio de microscopía electrónica de transmisión, cuando han sido aisladas con una transfección estable GFP⁺.

El análisis de la morfología se realizó con microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos mostraron un cultivo celular con un fenotipo indiferenciado, con la presencia de un núcleo grande e irregular, un citoplasma denso rico en orgánulos, presencia de retículo endoplásmico rugoso con cisternas dilatadas, mitocondrias elongadas, inclusiones heterogéneas vacuolares y la presencia de vacuolas lipídicas, siendo éstas el orgánulo más representativo (Fig. 15). Estas características observadas son debidas a su intensa actividad metabólica. Esta caracterización de la ultraestructura de las MSCs las distingue de otros tipos celulares como los fibroblastos, siendo una característica común de su potencial multipotente [335]. Observamos que todas las líneas celulares analizadas en nuestro estudio, ASCs y BMSCs, presentaban un alto número de vacuolas

lipídicas, aunque, en estudios previos, se afirmó que la presencia de este tipo de vacuolas era característica de una línea adipogénica. Esta observación podría reflejar un tipo de memoria adipogénica del microambiente en el cual las ASCs originales crecieron [336], pero esto no explicaría la presencia de vacuolas lipídicas en las BMSCs. Otra característica que presentaron nuestras células, es la presencia de un nucléolo dentro de su núcleo, a diferencia de otros estudios en los cuales se encontraban dos o más nucleólos dentro de un mismo núcleo [337,339]. Aunque las MSCs son una población celular heterogénea, cuando se tiene en cuenta la expresión de los marcadores inmunocitoquímicos [340,341], las observaciones morfológicas mostradas en este estudio demuestran que la población de MSCs es relativamente uniforme, especialmente en términos de ultraestructura.

Otro trabajo que describe las características ultramorfológicas de las MSCs [336], proporciona una descripción del núcleo y del citoplasma de este tipo celular procedente de humano. Sus resultados mostraron un núcleo con abundante heterocromatina y un citoplasma denso en el que se encontraban numerosos lisosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso. Observaron la presencia de vesículas de pinocitosis y vacuolas lipídicas, características coincidentes con nuestro estudio. Ozen y col. demostraron que la presencia de vacuolas en este tipo celular, juegan un papel importante en la señalización de las células mesenquimales.

Otros dos estudios [105,106] también reflejan resultados similares a autores previos. Las BMSCs de humano se han descrito morfológicamente como células vacuolizadas, con un núcleo grande e irregular. Ambos estudios revelaron que, frecuentemente, las MSCs aparecían con una disposición binucleada, sin embargo, nuestros resultados sugieren que esta observación podría ser debida a la

forma irregular del núcleo (como se ilustra en las figuras 20-22) y no debido a la presencia de dos núcleos.

No encontramos diferencias morfológicas entre ASCs, ASCs GFP⁺ y BMSCs, pudiéndose observar los mismos orgánulos en los citoplasmas de estos tres tipos celulares. Constatamos que la morfología celular no se modificó por la expresión de GFP, sin embargo, las BMSCs GFP⁺ presentaban características morfológicas distintas a los otros tipos celulares. El orgánulo predominante en esta línea celular fue el retículo endoplásmico rugoso, con cisternas dilatadas y las mitocondrias, característica debida a su alta actividad proteica. Estudios previos proporcionan más información de la caracterización ultraestructural de las MSCs [106,236,336]. Raimondo y col. [236] describen la morfología celular de las BMSCs de rata con una transfección estable, en la que aparece un núcleo irregular y la presencia de orgánulos semejantes a los encontrados en nuestras células. Concordando con este estudio, la presencia de retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y vesículas lipídicas caracterizan este tipo de células transfectadas.

5.6. MATRICES EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSCs DE CABALLO (DSCMs)

Otro capítulo dentro de los objetivos de este trabajo, fue la obtención de matrices descelularizadas obtenidas a partir de células troncales mesenquimales (DMSCs). Estas se obtuvieron adicionando a los medios de cultivo de MSCs un medio ascórbico, el más utilizado en los trabajos revisados, y medio condrogénico. El fin de este estudio fue analizar si existía alguna diferencia entre las DSMCs producidas tanto por ASCs como por BMSCs de caballo, y utilizando ambos medios de diferenciación (ascórbico y condrogénico). Además, las BMSCs y las ASCs fueron cultivadas sobre los cuatro tipos

diferentes de DSCMs y analizamos su proliferación, viabilidad, adhesión celular, el promedio del área celular utilizada y su potencial de diferenciación. Por lo que nos consta, este es el primer estudio existente que proporciona datos comparativos entre estos cuatro tipos de DSCMs procedentes de ASCs y BMSCs de caballo, y el comportamiento de ambos tipos celulares cuando se cultivan sobre ellas.

La descelularización completa de un órgano para utilizarlo como molde tridimensional, tiene interés en las aplicaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos puesto que, este proceso, preserva la estructura tisular [342-344]. Sin embargo, las matrices naturales suelen estar limitadas por su capacidad de manipulación después de su procesado y por la fuente del tejido de donde se obtienen, dando como resultado una gran variabilidad. Muchos estudios han sido enfocados hacia el uso de tejidos y órganos descelularizados [342,344-346], sin embargo, actualmente, estos estudios se están centrando en las matrices extracelulares derivadas de cultivos, las cuales pueden obtenerse de distintas células de mamíferos. Estas DSCMs se obtienen cultivando células *in vitro* para que produzcan la matriz extracelular, que será empleada como un biomaterial tras su descelularización. Se han desarrollado muchas técnicas distintas de descelularización para obtener las ECMs derivadas de células como sustrato viable para el cultivo celular [195]. Esta descelularización de las ECMs mantiene la composición, la integridad mecánica y la actividad biológica de las matrices extracelulares [347,348].

Las matrices extracelulares descelularizadas derivadas de células (DCM), contienen un conjunto de macromoléculas organizadas que pueden imitar el microambiente del tejido nativo que va a ser reparado. A diferencia de las matrices extracelulares derivadas de tejido, las DCM tienen más facilidad para ser adaptadas según el tipo

celular seleccionado para producir la ECM y por el sistema de cultivo (por ejemplo, cultivo 2D ó 3D, estático o perfusión). Este tipo de DCM constituye una red compleja, compuesta por muchos tipos de moléculas como colágenos, fibronectina y proteoglicanos. Debido a su estructura 3D única, propiedades mecánicas, potencial de señalización celular y capacidad de regular las funciones celulares, las DCMs están atrayendo una gran atención como biomaterial biológico en la ingeniería de tejidos [349].

Las DCM derivadas de MSCs (DSCMs) se desarrollaron con la finalidad de potenciar el papel de las MSCs en la regeneración tisular. Cuando caracterizamos los cuatro tipos de DSCMs que produjimos, todas se tiñeron con la tinción azul alcian, indicando la presencia de proteoglicanos (Fig. 18). Las DSCMs derivadas de medio ascórbico presentaban una estructura más débil, y cuando se extraían sufrían una gran retracción, lo cual dificultaba su manejo. Sin embargo, las DSCMs derivadas de medio condrogénico, eran mucho más compactas y fáciles de manejar. No se retraían al sacarlas y mantenían la forma del pocillo donde fueron producidas. Cuando se observó su morfología en el microscopio electrónico de barrido, las cuatro DSCMs tenían diferencias estructurales, en las aA-DSCMs las fibras estaban desorganizadas y presentaban poros de pequeño tamaño. Estas fibras se encontraban en una disposición no alineada y con una distribución aleatoria dando lugar a una matriz menos uniforme. Las aC-DSCMs, por el contrario, presentaban una distribución de sus fibras más uniforme y eran más porosas. Tanto las DSCMs derivadas de medio condrogénico producidas por ASCs como por BMSCs, mostraron que las fibras proteicas que la formaban se disponían con una estructura más ordenada, homogénea, alineada y porosa (Fig. 19). En especial, las bC-DSCMs fueron las que mostraron una estructura más uniforme y, a diferencia de las aC-DSCMs, tenían

una morfología menos porosa. Estas diferentes estructuras pueden tener un efecto en la interacción de las células con las proteínas de la matriz extracelular. Estudios recientes han demostrado que los diámetros de las fibras de los biomateriales, son un importante parámetro para el cultivo celular en 3D, donde las células responden de forma diferente a cada biomaterial utilizado [350]. Por ejemplo, Li y col. [351] demostraron que los condrocitos producen más ECM cuando son cultivados en nanofibras que cuando se cultivan en microfibras.

Se han estudiado diferentes combinaciones de proteínas de ECM, tales como colágeno tipo I y fibronectina, y su efecto en los cultivos de MSCs [352,353], aunque las actividades descritas no son las mismas que las observadas en otros estudios [354].

En varios estudios se ha demostrado [207] la presencia de proteínas como colágeno tipo I y II, fibronectina, biglycano, decorina, perlacan y laminina en las DSCMs. La fibronectina, vitronectina y colágeno tipo I también han sido estudiadas como factores que afectan a la quimiotaxis y favorecen la actividad mitogénica de las MSCs humanas [355,356]. Por otro lado, el colágeno y la vitronectina promueven la osteogénesis de las MSCs [357,358], mientras que la fibronectina es una proteína multi-dominio que posee puntos de unión para las integrinas, colágeno y otras proteínas que forman las ECMs. Los glicosaminoglicanos (GAG), además, influyen en la forma de las células y favorecen la adhesión celular a la matriz y la proliferación [359]. Algunos autores sostienen que favorecen la diferenciación celular, pero otros opinan que no se ha demostrado que afecten a la diferenciación celular de las MSCs [360] o induzcan la adipogénesis [361]. El ácido hialurónico es el principal proteoglicano que constituye el cartílago, un polímero natural biocompatible y biodegradable con una parte central de agrecano. Cuando este ácido hialurónico se

utilizaba como molde tridimensional para el cultivo de MSCs, se vio que la estructura 3D de los biomateriales de ácido hialurónico inducían la diferenciación condrogénica en condrocitos articulares de conejo [362,363]. Esto indica que el contacto célula-célula con el ácido hialurónico modula la matriz pericelular en el proceso de condensación celular, que es la primera etapa de la condrogénesis [364,365].

Analizamos la presencia de algunos de estos componentes en nuestras DSCMs, utilizando tinciones inmunohistoquímicas y SDS-Page. El perfil proteico de las DSCMs derivadas de medio condrogénico analizado en SDS-PAGE, presentaba un perfil semejante al de las matrices de cartílago y de tendón que utilizamos como control (Fig. 20). Por el contrario, las DSCMs derivadas de medio ascórbico contenían un componente (banda) adicional de 100kD, que no estaba presente en las DSCMs derivadas de medio condrogénico. Todas ellas presentaron bandas con pesos moleculares altos (superiores a 100kD), lo mismo que las matrices procedentes de cartílago y tendón. El análisis proteico de las DSCMs se completó con inmunohistoquímica de las matrices, la cual mostró la presencia de colágeno tipo I y II y fibronectina en todas las DSCMs, y la presencia de agregano y ácido hialurónico sólo en las C-DSCMs (Fig. 21).

Para que se produzca la regeneración tisular, las MSCs necesitan migrar hacia la zona donde se haya producido el daño, posteriormente proliferar para diferenciarse hacia células maduras o para secretar factores de crecimiento, que puedan influir en las propiedades biológicas del microambiente tisular [366]. Los biomateriales utilizados para vehicular las MSCs hacia el tejido dañado, a menudo se evalúan en función de estas propiedades [367,368]. En nuestro trabajo utilizamos algunas de estas características para evidenciar la bioactividad de las DSCMs: adhesión

celular, proliferación, viabilidad sobre las DSCMs o capacidad de inducir la diferenciación. Nuestros resultados demostraron que no existían diferencias significativas en la eficiencia de adhesión celular de las MSCs sembradas sobre las distintas DSCMs. En general, el área utilizada por las MSCs fue significativamente baja en las aA-DSCMs en los dos tipos de MSCs, probablemente, debido a que las matrices derivadas de medio ascórbico se repliegan al ser extraídas, reduciendo el área de siembra; mientras que se observó que las MSCs presentaron gran afinidad por las matrices derivadas de medio condrogénico (Fig. 22). La adhesión celular a las DSCMs y el área de siembra sobre ellas dependen de las interacciones específicas con los receptores de superficie de las células, como integrinas, y los ligandos presentes en los sustratos de las matrices extracelulares [369].

Cuantificamos la proliferación de las MSCs sobre las DSCMs en los días 3, 5, 8 y 12 después de la siembra. Nuestros resultados mostraron que las MSCs sembradas sobre las cuatro DSCMs, presentaron una proliferación diferente en los primeros días después de la siembra (día 3 y 5), obteniendo una proliferación entre 150 y 200 veces mayor en las MSCs cultivadas sobre A-DSCMs que en las cultivadas sobre C-DSCMs (Fig. 23). Sin embargo, a partir del quinto día de cultivo, las MSCs cultivadas sobre bC-DSCMs aumentaron su proliferación de forma significativa. En los siguientes días de análisis, la proliferación de las MSCs sobre las DSCMs se redujo, excepto en las cultivadas sobre aC-DSCMs, donde la proliferación celular aumentó gradualmente hasta el día 12 de cultivo. Se ha demostrado que las proteínas de las ECM promueven la migración de las MSCs [355], y, además, otros estudios han evidenciado el mismo efecto producido por el colágeno tipo I y la fibronectina sobre los cultivos de MSCs [207,370]. Observamos que la principal diferencia en la

composición proteica de las A-DSCMs y C-DSCMs (agrecano y ácido hialurónico) aparentemente no influía en la proliferación de las MSCs, sugiriendo que otros componentes de las matrices extracelulares contribuyen al crecimiento de las MSCs. Parece que el efecto de las DSCMs sobre la proliferación de las MSCs, depende más de la afinidad que presentan las MSCs para unirse a las DSCMs y de los ratios específicos de proliferación de las ASCs y BMSCs.

Además, la viabilidad de las MSCs sembradas sobre los cuatro tipos de DSCMs se mantuvo alta durante todo el periodo experimental. Especialmente, las ASCs sembradas sobre C-DSCMs mostraron un aumento significativo de la viabilidad en los días 5 y 8. Coincidiendo con otros autores [212], la viabilidad y la proliferación celular se redujeron en el día 12 de cultivo.

El potencial de diferenciación de las MSCs hacia distintas líneas celulares es un proceso fundamental para su uso en aplicaciones clínicas. Las MSCs cultivadas sobre los cuatro tipos de DSCMs mantuvieron su capacidad de diferenciación, evidenciado por su alto nivel de expresión génica de los marcadores específicos de condrogénesis (colágeno tipo II y agrecano), y por el aumento de la matriz de mineralización osteogénica. Los condrocitos se caracterizan por su capacidad para producir moléculas propias de la ECM condrogénica [371], tales como agrecano [364] y colágeno tipo II [372]. En nuestras matrices analizamos la diferenciación hacia tejido cartilaginoso en ausencia de factores de crecimiento y diferenciación. Para ello cuantificamos la expresión de los genes específicos de condrogénesis por PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos revelaron un aumento de la expresión de colágeno tipo II en el día 5 en las ASCs sembradas sobre bC-DSCMs, mientras que en las BMSCs, la mayor expresión de colágeno tipo II se obtuvo en el día 3, cuando las células se sembraron sobre aC-DSCMs (Fig. 24). Además, los

niveles de expresión de colágeno tipo II fueron altos en los días 5 y 8 en las ASCs y en el día 3 en las BMSCs en todas las condiciones, en el resto de los días, estos niveles se mantuvieron bajos. Sin embargo, la expresión de agrecano por las MSCs sembradas sobre las cuatro DSCMs fue significativamente elevado tras 12 días de cultivo. Por lo tanto, demostramos que las DSCMs promueven la condrogénesis de las MSCs por contacto célula-matriz. Además, nuestros datos concuerdan con otros estudios que muestran que estos genes están más expresados en cultivos de BMSCs de humano, aunque no fueron desarrollados en MSCs cultivadas sobre DSCMs [373-376].

Como se muestra en la imagen del análisis histológico de la osteogénesis, teñido por rojo alizarin S (Fig. 25), la superficie teñida de color rojo fue semejante, aunque las A-DSCMs mostraban una morfología nodular-replegada. Al cuantificar la mineralización por colorimetría se observó que, tanto las ASCs como las BMSCs sembradas sobre aA-DSCMs, mostraron una mineralización significativamente más elevada que el resto.

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos, donde se demostró que la presencia de morfógenos induce la producción de ECM cartilaginosa y osteogénica [377-379], y que las MSCs pueden diferenciarse hacia osteoblastos, mioblastos o células nerviosas sin añadir factores de diferenciación, únicamente dependiendo de la modificación de la superficie donde son cultivadas [380,381]. Pattabhi y col. [382] demostraron que las matrices extracelulares descelularizadas inducen la diferenciación de las MSCs de humano hacia osteoblastos en ausencia de dexametasona. En otros trabajos, también se describía la inducción de la diferenciación de las MSCs sembradas sobre DMSCs hacia osteoblastos y condrocitos [349], aunque la fuente celular y la producción de las DSCMs fueron diferentes a las utilizadas en nuestro estudio y esto dificulta la

comparación de todos los resultados. Estas investigaciones ponen de manifiesto un potencial desconocido de las DSCMs como inductoras de la diferenciación de las MSCs.

Junto con estos estudios, nuestros resultados sugieren que los componentes bioactivos de las DSCMs están muy relacionados con la fuente celular que producen las DSCMs y merecen más análisis, caracterización y estudio del mecanismo de acción en las MSCs.

5.7. PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS MSCs DE CABALLO

Como ya hemos citado anteriormente, las MSCs desempeñan un papel importante en la regeneración de tejidos en las enfermedades osteoarticulares. Estudios recientes han demostrado que este tipo celular posee, aparte de este papel regenerativo, un efecto inmunomodulador y, por lo tanto, están siendo consideradas como una terapia prometedora en la reducción del proceso inflamatorio producido en las enfermedades osteoarticulares degenerativas [383].

Aunque se sabe que este tipo celular reduce la inflamación, los mecanismos y efectos anti-inflamatorios que producen no están del todo claros. Un gran número de estudios han comparado y analizado el papel inmunomodulador de las MSCs de humano procedentes de distintos tejidos adultos [384-386]. Otros estudios demuestran que las MSCs también poseen un papel inmunomodulador en otras especies de vertebrados, como son: ratón [323,386], perro [387] y caballo [388].

En el presente trabajo constatamos los efectos anti-inflamatorios de las MSCs. Para ello realizamos co-cultivos con condrocitos inflamados y MSCs y adicionamos medios condicionados de MSCs a condrocitos inflamados. Valorando posteriormente, la expresión de distintos genes específicos de inflamación. Los datos obtenidos en el

análisis de los dos tipos de MSCs de caballo muestran diferencias en la expresión tanto de genes como de proteínas. En todos los cultivos indujimos la inflamación con TNF, aunque otros autores demostraron efectos inflamatorios equivalentes con INF- γ [389] y LPS [390].

Antes de analizar el efecto que tienen las MSCs sobre los condrocitos inflamados, estudiamos la acción que tenía el TNF sobre las MSCs. Tras cultivar las MSCs con TNF durante 12 horas, no encontramos diferencias en la expresión de los marcadores de superficie CD90 y CD105 (Fig. 26), efecto que concuerda con otros autores [391]. En cuanto a la multipotencialidad de las MSCs, tampoco se vio alterada con la adición de TNF, excepto en las ASCs diferenciadas a adipocitos cuando eran cultivadas con TNF durante 15 días, en estas condiciones disminuía la capacidad de diferenciación adipogénica de las MSCs. Recientemente, se ha descubierto que tanto la influencia del TNF como la de la IL-10, favorecen la diferenciación condrogénica de las MSCs [392].

Cuando analizamos la expresión de los genes y la producción de PGE₂, pudimos comprobar que la expresión de IL-6 y la cantidad de PGE₂ fue más elevada en las BMSCs, al ser estimuladas con TNF, que en las ASCs, BMSCs y ASCs estimuladas con TNF. Diferentes estudios demuestran el papel protector de la PGE₂ producida por las MSCs sobre las células inflamadas [294,393,394], al igual que la IL-6 [388]. Por lo tanto, de acuerdo con estos estudios, las BMSCs de caballo tendrían un potencial anti-inflamatorio superior al de las ASCs.

El crecimiento de las células en los co-cultivos de MSCs y condrocitos, sembrados a concentración 1:1, fue desigual, obteniendo una mayor proliferación de los condrocitos con respecto a las MSCs (Fig. 28). Este efecto, tanto en ASCs como en BMSCs, pudo deberse a

la diferencia de tamaño celular. Los condrocitos, al ser de menor tamaño, proliferan con mayor rapidez en menor superficie de cultivo. El efecto del TNF no afectó de forma significativa a la proliferación *in vitro* de las células cultivadas. Como se ha constatado [395], el aumento en la densidad de siembra puede influir en la expresión de genes, por lo que los ensayos de inflamación se realizaron después de 24 horas de cultivo, cuando las células alcanzaban una confluencia del 90%.

Analizados los genes pro-inflamatorios (iNOS e IL-6) en los co-cultivos de condrocitos tanto con ASCs como con BMSCs de caballo, observamos un descenso significativo en su expresión. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre el efecto que tenían ambos tipos celulares (ASCs y BMSCs). Sin embargo, sí se pudo observar, que la expresión de genes pro-inflamatorios se reducía cuando los condrocitos eran co-cultivados con ASCs. Este efecto inmunomodulador se puso de manifiesto en estudios realizados con MSCs de caballo en co-cultivos con células mononucleares de sangre periférica, donde se redujo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias [383]. De acuerdo con nuestro trabajo, las MSCs en co-cultivo con condrocitos inflamados reducen significativamente la expresión de los genes causantes de la inflamación en las enfermedades osteoarticulares, poniendo de manifiesto su papel inmunomodulador, estos resultados coinciden con estudios previos [396,397].

En la actualidad, no solo se utilizan co-cultivos con MSCs como ensayos *in vitro* de modelos pro-inflamatorios, sino que también se utiliza el propio medio de cultivo de las MSCs (medio condicionado). Estudios previos demostraron su efecto reparador en el tejido miocárdico [271], en la mejora de enfermedades hepáticas [398], enfermedades crónicas [399], y en otras enfermedades asociadas a

procesos inflamatorios [400]. Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue, además de analizar el papel inmunomodulador de las MSCs de caballo, estudiar el efecto que producían las citoquinas o factores liberados al medio de cultivo por las MSCs tras 24 horas de cultivo. Tal y como se recoge en estudios en otras enfermedades, nuestros datos mostraron un descenso muy significativo en la expresión de los genes inflamatorios iNOS e IL-6 (Fig. 31). Este efecto fue más evidente cuando las MSCs fueron cultivadas en presencia de TNF.

El papel del NO en la inmunomodulación mediada por MSCs no está del todo claro. Existen diversidad de estudios en los que el NO se incrementa en los ensayos de co-cultivos de MSCs y monocitos [401], mientras que otros no consideran significativo su incremento [402]. La diferencia del efecto del NO entre especies de vertebrados sugiere que, en humanos juega un papel importante en la respuesta inflamatoria [285], mientras que en otras especies, entre las que se encuentra el caballo, el NO no tiene efectos en el mecanismo inmunomodulador [383]. Esto se demuestra en nuestros resultados, que, aunque se encuentren diferencias significativas, el incremento de esta sustancia no es muy elevado en ninguno de los casos analizados.

La proteína COX-2 está involucrada en la producción de PGE₂, la cual juega un papel importante en el efector inmunomodulador mediado por las MSCs [403]. Nuestros resultados no pusieron de manifiesto diferencias en la expresión de COX-2 en ninguno de los casos. Ciertos estudios sugieren que la PGE₂ juega un importante papel inmunomodulador, siendo secretado por las MSCs al medio de cultivo, favoreciendo el efecto anti-inflamatorio [294,404]. Tal y como se demuestra en nuestro trabajo, la producción de PGE₂ se vio significativamente elevada (Fig. 32) en los ensayos realizados con medios condicionados, aunque la producción de este factor se redujo

en los ensayos de co-cultivos (Fig. 30). Esto sugiere que la cantidad de PGE₂ producida por el estímulo del medio condicionado, podría favorecer la protección a los condrocitos frente al estímulo inflamatorio.

Se ha demostrado que el TGF- β 1 es sintetizado por las MSCs derivadas de tejidos como el adiposo [405], médula ósea [406] y cordón umbilical [407]. La cuantificación de TGF- β 1 en nuestros ensayos, no presentó incrementos significativos en su expresión (Fig. 27, 29 y 31). Aunque se haya descubierto que el TGF- β 1 tiene un importante efecto en la proliferación de las células T y su inmunosupresión [408], aún no está claro el efecto que tiene sobre los condrocitos en enfermedades osteoarticulares.

La expresión de los genes que componen la matriz extracelular condrogénica (COL2A1, ACAN) se ve reducida por el efecto del TNF [409]. El uso de medios condicionados favorecen la diferenciación condrogénica y osteogénica sobre condrocitos articulares [410] [411]. Este efecto no se produjo en nuestros cultivos, donde tanto en condiciones de co-cultivo, como con el uso de medios condicionados, la expresión de colágeno tipo II no se vio alterada, aunque sí la expresión de agregano, que se redujo significativamente.

5.8. PAPEL INMUNOMODULADOR DEL CONDROITÍN SULFATO Y LAS ASCs DE HUMANO

Uno de los compuestos más utilizados en el tratamiento de las enfermedades osteoarticulares es el condroitín sulfato [244]. Este compuesto promete buenos resultados reduciendo la inflamación producida en las articulaciones [412]. El CS ha dado buenos resultados tanto en ensayos *in vitro* [413] como *in vivo* [414]. Aunque la dosis de administración oral del CS oscila entre 800 y 1.200 mg por día, en un estudio realizado por la casa comercial que

nos proporcionó el compuesto [302] se recogía que la concentración idónea, en la cual el CS presenta buenos resultados inmunomoduladores *in vitro*, fue de 200 µg/mL, concentración que utilizamos para nuestro estudio. Por vía oral, las concentraciones deben ser mucho más altas para que pueda llegar a la articulación una cantidad suficiente que pueda tener efecto, aún así, uno de los principales problemas del condroitín sulfato es, que administrado por vía oral, no alcanza concentraciones terapéuticas adecuadas a nivel articular [415].

Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue analizar el efecto inmunomodulador del CS en combinación con las ASCs en co-cultivo con condrocitos. Nuestros resultados mostraron una disminución en la expresión de todos los genes relacionados con las citoquinas pro-inflamatorias analizadas.

La citoquina IL-6 es la responsable del dolor en las enfermedades osteoarticulares [416], siendo una de las principales inductoras de la inflamación. En nuestro trabajo, observamos que la expresión de la IL-6 se redujo significativamente tanto con el co-cultivo de ASCs como con el de CS y la combinación de ambos, en comparación con los condrocitos inflamados. Estudios previos ponen de manifiesto estos efectos, en los que las MSCs y el CS, redujeron la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se encontraban la IL-6 [417,418]. Sin embargo, el efecto que produjo el CS sobre la reducción de la expresión de IL-6 fue mayor cuando se utilizó aisladamente, que cuando se combinaba con ASCs. La combinación de ASCs y CS dio lugar a una reducción notable de la expresión de IL-6, aunque no fue tan importante como la producida únicamente por el CS. Aunque se ha demostrado que la IL-6 es una de las principales interleucinas que inducen la inflamación, su papel

está, actualmente, siendo debatido debido a evidencias que aseguran que esta interleucina podría tener un papel anti-inflamatorio [35].

La expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), fue muy alta en condrocitos después de ser estimulados con TNF [256]. Esta enzima es una de las implicadas en los procesos inflamatorios en enfermedades osteoarticulares, y una de las enzimas que se expresan en grandes cantidades en estudios *in vitro* [419]. En humanos, la expresión de esta enzima por parte de las ASCs es mínima [285]. Nuestros resultados mostraron que la combinación de ASCs y CS reducía significativamente su expresión. Al contrario de lo que ocurría en el caso anterior para la IL-6, la expresión de iNOS experimentó una mayor reducción en los cultivos de ASCs combinadas con CS como tratamiento. La iNOS es una enzima que produce óxido nítrico (NO) como producto final de su reacción enzimática. No está muy claro el efecto que tiene el NO, siendo considerado, principalmente, como compuesto pro-inflamatorio y destructor. Sin embargo, se ha descubierto que el NO generado por enzimas NOS puede tener un papel beneficioso como vasodilatador, mejorando la circulación sanguínea en la zona afectada [420]. Debido a que el CS formaba precipitados con los kits comercializados para cuantificar el NO, no podemos aportar datos de la producción de este compuesto para poder corroborar estudios anteriores.

Otras citoquinas causantes de la inflamación y procesos de dolor en las enfermedades osteoarticulares son las metaloproteasas [12]. Entre este grupo de enzimas, dos de ellas causan mayor efecto inflamatorio en la etiopatogenia de las enfermedades osteoarticulares, las metaloproteasas 1 y 13 (MMP-1 y MMP-13) [17,421]. El aumento en la producción de IL-6 y de otros compuestos pro-inflamatorios está relacionado con el aumento en la expresión de metaloproteasas [422]. Este aumento fue puesto de manifiesto en

nuestro trabajo, donde se estudió la expresión de la metaloproteasa 13. Tanto el CS como las ASCs redujeron significativamente su expresión, esta reducción fue más de 200 veces menor con el uso de CS y hasta 250 veces menor cuando se combinaba CS y ASCs. El aumento en la expresión de MMP-13 (causante de la degradación del colágeno y proteoglicanos en el cartílago), da lugar a la inhibición de otros compuestos como el TGF- β [423] y, tras su inactivación, previene la degradación del cartílago durante los procesos osteoartríticos [424]. Uno de los principales objetivos en el tratamiento de la osteoartritis es evitar la degradación del cartílago por efecto de las metaloproteasas, evitando, de este modo, el aumento de la inflamación y favoreciendo la reparación del tejido [16].

El factor de necrosis tumoral (TNF), citoquina que, junto con IL-1 β , causan la activación de las rutas inflamatorias en la osteoartritis [422] y bloquean la síntesis de proteoglicanos y colágeno por los condrocitos, se redujo en nuestros ensayos tras la adición de CS y ASCs. Esta reducción favorece el bloqueo de las rutas pro-inflamatorias, y evita la síntesis de compuestos pro-inflamatorios y degradativos derivados como las proteasas, quimioquinas, óxido nítrico y eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos).

Los resultados de la expresión de TGF- β 1 fueron variables. Su expresión no fue muy diferente en presencia o ausencia de TNF, CS y ASCs. Estudios previos [423], demostraron que el bloqueo del gen que expresa TGF- β 1 en condrocitos inflamados producía la reducción de su diferenciación y el desarrollo de la osteoartritis. En el mismo trabajo, también se demostró que esta citoquina era responsable de la producción de glicosaminoglicanos y colágeno tipo II por parte de los condrocitos, mostrando un papel beneficioso en las patologías relacionadas con procesos osteoartríticos. También se demostró que

la concentración de TGF- β 1 en pacientes afectados por osteoartritis era baja o incluso indetectable [422].

Lee y col. [425] demostraron que la expresión deIDO se inducía en MSCs tras un daño tisular. De acuerdo con esto, en otros tejidos dañados o estimulados con TNF, la producción de IDO se vio aumentada [426]. Esto concuerda con nuestros resultados, en los que, tras inducir la inflamación en las células, aumentaba la expresión de IDO, aunque también aumentaba con la adición de CS y ASCs. Nuestros resultados mostraron que la IDO probablemente se exprese como un protector natural frente a la inflamación, tal y como demostraron otros autores [427].

Durante los procesos inflamatorios producidos en las enfermedades osteoarticulares, el cartílago articular se degrada y, de este modo, la producción de proteínas de la matriz extracelular del cartílago por parte de los condrocitos, se reduce debido al efecto de las MMPs sobre el tejido [428]. Cuando estudiamos el efecto que tenía el CS y las ASCs sobre la expresión de los genes específicos de condrogénesis (SOX-9, ACAN y COL2A1) en los condrocitos inflamados, no observamos ningún aumento de su expresión cuando eran tratados. Sin embargo, sí encontramos un aumento muy significativo en la expresión de ACAN y COL2A1 en los condrocitos sin inflamar a los que se les había añadido CS. Esto pone de manifiesto el papel que tiene el CS en la expresión de proteínas que forman la matriz extracelular del cartílago [429].

El efecto del TNF e IL-1, tanto en condrocitos [430] como en MSCs [431,432], hace que la expresión de PGE₂ aumente. Aunque la PGE₂ se considera una proteína pro-inflamatoria, existen distintas teorías acerca del efecto beneficioso o perjudicial que produce en los procesos osteoarticulares [279-281]. Por otra parte, se descubrió que la producción de PGE₂ se elevaba en condiciones de co-cultivo [425] y

que, en algunos casos, el CS no producía ningún efecto en los niveles de PGE₂ [433], mientras que en otros casos su concentración disminuía [434]. Tal y como indicamos en el apartado anterior (apartado 5.7), se sugiere que la PGE₂ protege a los condrocitos frente a un estímulo inflamatorio. Esto concuerda con nuestros resultados, en los que la cantidad de PGE₂ liberada al medio aumentó con la adicción de TNF. Sin embargo, en condiciones de co-cultivo con CS y TNF en el medio de cultivo, la cantidad se redujo significativamente, aunque se mantuvo elevada en comparación con los controles sin estimular.

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.

6. CONCLUSIONES

1. En la caracterización de las células troncales mesenquimales de caballo, procedentes de médula ósea y de tejido adiposo, ambas fueron positivas para los marcadores de superficie CD90 y CD105 y se comprobó su multipotencialidad hacia tres líneas mesodérmicas (adipocitos, osteocitos y condrocitos). No se encontraron diferencias entre ambas en la expresión de los marcadores de superficie CD90 y CD105, ni en su multipotencia. Las células troncales mesenquimales de tejido adiposo de humano fueron positivas para los marcadores de superficie CD73, CD90, CD105 y se comprobó su multipotencialidad hacia tres líneas mesodérmicas (adipocitos, osteocitos y condrocitos).
2. En el estudio comparativo de obtención de una línea transfectada estable de las células troncales mesenquimales de caballo, procedentes de médula ósea y de tejido adiposo, se obtuvieron porcentajes más altos de eficiencia de transfección con Lipofectamine 2.000[®]. Sin embargo, la viabilidad de las MSCs aumentó cuando utilizamos SAFEctin[®].
3. Conseguimos aislar una línea de ASCs GFP⁺ estable utilizando geneticina como factor de selección. En esta línea celular se mantuvo, tanto la expresión de marcadores específicos de superficie para células troncales mesenquimales, como su multipotencialidad. En las BMSCs GFP⁺ se redujo su proliferación y se produjo la pérdida de la capacidad multipotente, impidiendo conseguir un número suficiente de células para su utilización en estudios posteriores.
4. En cuanto a su ultraestructura, las ASCs GFP⁺ presentaban una morfología semejante a las ASCs. Por el contrario, las BMSCs GFP⁺ presentan diferencias morfológicas comparadas con las BMSCs.

5. En la producción de las DMSCs, las derivadas de medio ascórbico presentaban una estructura más débil, y cuando se extraían sufrían una gran retracción, lo cual dificultaba su manejo. Sin embargo, las DSCMs derivadas de medio condrogénico, eran mucho más compactas y fáciles de manejar. No se retraían al sacarlas y mantenían la forma del pocillo donde fueron producidas.
6. En la caracterización de los cuatro tipos de DSCMs producidas por ASCs y BMSCs, observamos que la principal diferencia en la composición proteica de las A-DSCMs y C-DSCMs fue la presencia de agregano y ácido hialurónico en las matrices derivadas de medio condrogénico, y su ausencia en las derivadas de medio ascórbico. Sin embargo, este hecho, aparentemente, no influía en la proliferación de las MSCs, sugiriendo que otros componentes de las matrices extracelulares contribuyen a su crecimiento.
7. Los niveles de expresión de colágeno tipo II y agregano en las DSCMs fueron variables en función del día y el tipo celular analizado. Al cuantificar la mineralización por colorimetría, se observó que tanto las ASCs como las BMSCs sembradas sobre aA-DSCMs, mostraron una mineralización significativamente más elevada que el resto.
8. Tanto las ASCs como las BMSCs tienen un efecto inmunomodulador sobre algunos genes pro-inflamatorios. Las MSCs en co-cultivo con condrocitos inflamados, reducen significativamente la expresión de los genes causantes de la inflamación en las enfermedades osteoarticulares. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre el efecto que tenían ambos tipos celulares (ASCs y BMSCs).

9. También se produjo un descenso muy significativo en la expresión de estos genes, cuando se adicionaba a los condrocitos inflamados medios condicionados recogidos del cultivo de MSCs.
10. En nuestros cultivos, tanto en condiciones de co-cultivo, como con el uso de medios condicionados, la expresión de colágeno tipo II no se vio alterada, aunque sí la expresión de agregano, que se redujo significativamente.
11. En el análisis del efecto inmunomodulador del CS en combinación con las ASCs en co-cultivo con condrocitos inflamados, nuestros resultados mostraron una disminución en la expresión de todos los genes relacionados con las citoquinas pro-inflamatorias analizadas. Aunque no se produjo aumento en la expresión de los genes específicos de la matriz de cartilago, como colágeno tipo II y agregano.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Limitaciones

En cuanto a las limitaciones que podemos encontrar en este trabajo, destacamos la falta de estudios realizados con células troncales mesenquimales de médula ósea de humano. En las comparativas realizadas en ASCs y BMSCs hemos observado que las primeras, en la mayor parte de las condiciones, han demostrado mayor potencial regenerativo e inmunomodulador que las BMSCs, aparte de la facilidad de obtención. Esto plantea que las ASCs son una fuente alternativa muy atractiva a las BMSCs, dato especialmente destacable en humana, y hubiese sido muy interesante constatar esta superioridad, en casi todos los aspectos de las ASCs frente a las BMSCs.

Perspectivas de futuro

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se han abierto nuevas líneas de investigación, como ha sido el papel inmunomodulador de las células troncales mesenquimales o la producción de matrices naturales a partir de MSCs. En trabajos futuros continuaremos profundizando en ambos aspectos, siendo uno de nuestros retos estudiar el papel que desempeñan estas células en las distintas vías de señalización celular, tanto en los procesos inflamatorios como de adhesión, migración y diferenciación.

Resultado de este trabajo hemos enviado dos artículos que están pendientes de evaluación y estamos preparando otros dos.

- *Effect of Ascorbic and Chondrogenic derived decellularized Extracellular Matrix from equine mesenchymal stem cells on their proliferation, viability and differentiation. BIOMATERIALS.*
- *Isolation and morphological characterization of GFP stably transfected adipose tissue-derived and bone marrow*

mesenchymal equine stem cells. **HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY.**

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM. Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 2001;9:37-52.
2. Opoka-Winiarska V, Jurecka A, Emeryk A, Tylki-Szymanska A. Osteoimmunology in mucopolysaccharidoses type I, II, VI and VII. Immunological regulation of the osteoarticular system in the course of metabolic inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21:1813-1823.
3. 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;27:1675-1680.
4. Kisiday JD, Kopesky PW, Evans CH, Grodzinsky AJ, McIlwraith CW, Frisbie DD. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J Orthop Res* 2008;26:322-331.
5. Roy K, Kanwar RK, Kanwar JR. Molecular targets in arthritis and recent trends in nanotherapy. *Int J Nanomedicine* 2015;10:5407-5420.
6. Cao YL, Zhou GD. [Tissue engineering in twenty-first century-opportunity and challenge]. 2005;85:2523-2525.
7. Kristjansson B, Honsawek S. Current perspectives in mesenchymal stem cell therapies for osteoarthritis. *Stem Cells Int* 2014;2014:194318.
8. Funck-Brentano T, Cohen-Solal M. Subchondral bone and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2015;27:420-426.
9. Yang Y, Gao SG, Zhang FJ, Luo W, Xue JX, Lei GH. Effects of osteopontin on the expression of IL-6 and IL-8 inflammatory factors in human knee osteoarthritis chondrocytes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18:3580-3586.
10. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002;39:237-246.
11. Goldring SR, Goldring MB. Bone and cartilage in osteoarthritis: is what's best for one good or bad for the other? *Arthritis Res Ther* 2010;12:143.

12. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001;44:585-594.
13. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000;43:801-811.
14. Attur MG, Patel IR, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:65-72.
15. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15:831-845.
16. Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, Chen H, Cole A, Im HJ, et al. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:2376-2385.
17. Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, Roach HI. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:128-149.
18. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 2006;54:1357-1360.
19. Li Y, Xu L, Olsen BR. Lessons from genetic forms of osteoarthritis for the pathogenesis of the disease. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:1101-1105.
20. Iovu M, Dumais G, du Souich P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16 Suppl 3:S14-8.
21. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094-1108.

22. Tang P, Chen Q, Lan Q, Chen Y, Yang H, An N, et al. Role of basophils in rheumatoid arthritis (Review). *Exp Ther Med* 2015;9:1567-1571.
23. Paula FS, Alves JD. Non-tumor necrosis factor-based biologic therapies for rheumatoid arthritis: present, future, and insights into pathogenesis. *Biologics* 2014;8:1-12.
24. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Blanco FJ. Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Genomics* 2008;9:381-393.
25. Heinegard D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:50-56.
26. Osta B, Roux JP, Lavocat F, Pierre M, Ndongo-Thiam N, Boivin G, et al. Differential Effects of IL-17A and TNF-alpha on Osteoblastic Differentiation of Isolated Synoviocytes and on Bone Explants from Arthritis Patients. *Front Immunol* 2015;6:151.
27. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994;76:959-962.
28. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-452.
29. van den Berg WB. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000;59 Suppl 1:i81-4.
30. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest* 1988;82:2026-2037.
31. Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990;1052:366-378.
32. Goldring MB, Otero M, Tsuchimochi K, Ijiri K, Li Y. Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Ann Rheum Dis* 2008;67 Suppl 3:iii75-82.

33. Geng Y, Valbracht J, Lotz M. Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J Clin Invest* 1996;98:2425-2430.
34. Zanotti S, Canalis E. Interleukin 6 mediates selected effects of Notch in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21:1766-1773.
35. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:878-888.
36. Hu W, Zhang W, Li F, Guo F, Chen A. Bortezomib prevents the expression of MMP-13 and the degradation of collagen type 2 in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:526-530.
37. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:471-478.
38. Pozgan U, Caglic D, Rozman B, Nagase H, Turk V, Turk B. Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem* 2010;391:571-579.
39. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater* 2011;21:202-220.
40. Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets* 2010;11:599-613.
41. Galera P, Vivien D, Pronost S, Bonaventure J, Redini F, Loyau G, et al. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) up-regulation of collagen type II in primary cultures of rabbit articular chondrocytes (RAC) involves increased mRNA levels without affecting mRNA stability and procollagen processing. *J Cell Physiol* 1992;153:596-606.
42. Galera P, Redini F, Vivien D, Bonaventure J, Penfornis H, Loyau G, et al. Effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular

chondrocytes during the dedifferentiation process. *Exp Cell Res* 1992;200:379-392.

43. Darling EM, Athanasiou KA. Growth factor impact on articular cartilage subpopulations. *Cell Tissue Res* 2005;322:463-473.

44. Narcisi R, Quarto R, Ulivi V, Muraglia A, Molfetta L, Giannoni P. TGF beta-1 administration during ex vivo expansion of human articular chondrocytes in a serum-free medium redirects the cell phenotype toward hypertrophy. *J Cell Physiol* 2012;227:3282-3290.

45. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:625-635.

46. Godwin J, Kuraitis D, Rosenthal N. Extracellular matrix considerations for scar-free repair and regeneration: insights from regenerative diversity among vertebrates. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;56:47-55.

47. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006;10:7-19.

48. Chiang H, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc* 2009;108:87-101.

49. Stoddart MJ, Grad S, Eglin D, Alini M. Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering. *Regen Med* 2009;4:81-98.

50. Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:1064-1068.

51. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 2009;27:307-314.

52. Young FE. A time for restraint. *Science* 2000;287:1424.

53. Minas T, Gomoll AH, Solhpour S, Rosenberger R, Probst C, Bryant T. Autologous chondrocyte implantation for joint preservation in patients with early osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:147-157.

54. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 2010;38:1117-1124.
55. Vasiliadis HS, Wasiak J. Autologous chondrocyte implantation for full thickness articular cartilage defects of the knee. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(10):CD003323. doi:CD003323.
56. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
57. Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:686-695.
58. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-74.
59. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42-60.
60. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* 2013;85:3-10.
61. 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.
62. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:2.
63. Kiatpongsan S. From embryonic stem cells to functioning germ cells: science, clinical and ethical perspectives. *J Med Assoc Thai* 2007;90:2233-2237.
64. Bongso A, Tan S. Human blastocyst culture and derivation of embryonic stem cell lines. *Stem Cell Rev* 2005;1:87-98.
65. Mehta RH. Sourcing human embryos for embryonic stem cell lines: problems & perspectives. *Indian J Med Res* 2014;140 Suppl:S106-11.
66. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, et al. Identification of a novel population of muscle stem

cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002;157:851-864.

67. 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;17:331-340.

68. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Mesenchymal stem cell; history, biology and clinical application. *Rev Invest Clin* 2006;58:498-511.

69. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301-316.

70. Song L, Baksh D, Tuan RS. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cytherapy* 2004;6:596-601.

71. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:263-272.

72. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 2005;139:504-509.

73. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005;33:1402-1416.

74. 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;160:909-918.

75. 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;17:331-340.

76. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.

77. 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;160:909-918.
78. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000;218:115-124.
79. 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;19:1450-1456.
80. Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:517-521.
81. Li J, Sen GL. Post-Transcriptional Mechanisms Regulating Epidermal Stem and Progenitor Cell Self-Renewal and Differentiation. *J Invest Dermatol* 2016.
82. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-776.
83. 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;31:563-572.
84. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 2002;24:91-98.
85. Strain AJ, Crosby HA. Hepatic stem cells. *Gut* 2000;46:743-745.
86. Levis HJ, Daniels JT. Recreating the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche with Bioengineered Limbal Crypts. *Curr Eye Res* 2016:1-8.
87. Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 2005;23:3-9.

88. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-228.
89. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
90. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-395.
91. Buhring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1106:262-271.
92. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-2749.
93. 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;11:19-27.
94. 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;26:202-211.
95. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49.
96. 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;30:896-904.
97. Takeda YS, Xu Q. Neuronal Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using Exosomes Derived from Differentiating Neuronal Cells. *PLoS One* 2015;10:e0135111.

98. 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: 125-134.
99. 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: 195-198.
100. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102:3483-3493.
101. Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nestic D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 2008;76:118-129.
102. Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, et al. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg* 2008;37:713-724.
103. Donofrio G, Capocefalo A, Franceschi V, Morini G, Del Bue M, Conti V, et al. Virally and physically transgenized equine adipose-derived stromal cells as a cargo for paracrine secreted factors. *BMC Cell Biol* 2010;11:73.
104. 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;20:530-541.
105. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* 2001;3:393-396.
106. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7841-7845.
107. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011;9:12-811X-9-12.
108. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues:

superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005;52:2521-2529.

109. Koch TG, Berg LC, Betts DH. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J* 2008;49:1009-1017.

110. 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;22:12-20.

111. 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;12:586-93; discussion 594-5.

112. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002;307:321-327.

113. Mareschi K, Rustichelli D, Calabrese R, Gunetti M, Sanavio F, Castiglia S, 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.

114. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101-109.

115. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int* 2014;2014:951512.

116. Beane OS, Darling EM. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng* 2012;40:2079-2097.

117. Fraser JK, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z. Adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol* 2008;449:59-67.

118. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24:150-154.

119. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal

changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006;24:376-385.

120. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006;8:166-177.

121. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009;76:56-66.

122. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. 2000;24 Suppl 4:S41-4.

123. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. 2002;13:4279-4295.

124. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005;54:132-141.

125. Yilgor Huri P, Cook CA, Hutton DL, Goh BC, Gimble JM, DiGirolamo DJ, et al. Biophysical cues enhance myogenesis of human adipose derived stem/stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;438:180-185.

126. 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;52:119-132.

127. Pavlova G, Lopatina T, Kalinina N, Rybalkina E, Parfyonova Y, Tkachuk V, et al. In vitro neuronal induction of adipose-derived stem cells and their fate after transplantation into injured mouse brain. *Curr Med Chem* 2012;19:5170-5177.

128. Park IS, Mondal A, Chung PS, Ahn JC. Vascular regeneration effect of adipose-derived stem cells with light-emitting diode phototherapy in ischemic tissue. *Lasers Med Sci* 2015;30:533-541.

129. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ* 2016.

130. Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, Stolzing A. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. 2011;9:10.
131. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
132. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.
133. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-1920.
134. Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009;11:197-203.
135. Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 2008;26:1998-2005.
136. Prasad A, Manivannan J, Loong DT, Chua SM, Gharibani PM, All AH. A review of induced pluripotent stem cell, direct conversion by trans-differentiation, direct reprogramming and oligodendrocyte differentiation. *Regen Med* 2016.
137. International Stem Cell Initiative, Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 2007;25:803-816.
138. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009;461:402-406.
139. Liu H, Kim Y, Sharkis S, Marchionni L, Jang YY. In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med* 2011;3:82ra39.
140. Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived

neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16825-16830.

141. Tan Q, Lui PP, Rui YF, Wong YM. Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2012;18:840-851.

142. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther* 2013;21:1424-1431.

143. Desnuelle C, Dib M, Garrel C, Favier A. A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2001;2:9-18.

144. Shefner JM, Cudkowicz ME, Schoenfeld D, Conrad T, Taft J, Chilton M, et al. A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology* 2004;63:1656-1661.

145. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008;118:3143-3150.

146. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005;121:465-477.

147. Park ET, Gum JR, Kakar S, Kwon SW, Deng G, Kim YS. Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int J Cancer* 2008;122:1253-1260.

148. Kuttler F, Mai S. c-Myc, Genomic Instability and Disease. *Genome Dyn* 2006;1:171-190.

149. Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, Polder JA, Mohan AK, Bloom ET, et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:503-507.

150. Klein TJ, Schumacher BL, Schmidt TA, Li KW, Voegtline MS, Masuda K, et al. Tissue engineering of stratified articular cartilage

from chondrocyte subpopulations. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:595-602.

151. Shui W, Yin L, Luo J, Li R, Zhang W, Zhang J, et al. Characterization of chondrocyte scaffold carriers for cell-based gene therapy in articular cartilage repair. *J Biomed Mater Res A* 2013;101:3542-3550.

152. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res* 2003;21:272-281.

153. 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;84:571-578.

154. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:226-231.

155. McCoy JP, Jr, Schade WJ, Siegle RJ, Waldinger TP, Vanderveen EE, Swanson NA. Characterization of the humoral immune response to bovine collagen implants. *Arch Dermatol* 1985;121:990-994.

156. Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:1580-1585.

157. Fussenegger M, Meinhart J, Hobling W, Kullich W, Funk S, Bernatzky G. Stabilized autologous fibrin-chondrocyte constructs for cartilage repair in vivo. *Ann Plast Surg* 2003;51:493-498.

158. Peretti GM, Randolph MA, Villa MT, Buragas MS, Yaremchuk MJ. Cell-based tissue-engineered allogeneic implant for cartilage repair. *Tissue Eng* 2000;6:567-576.

159. van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 1999;20:1167-1175.

160. Vinatier C, Gauthier O, Masson M, Malard O, Moreau A, Fellah BH, et al. Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2009;89:176-185.
161. Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 2000;16:571-577.
162. Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Brauer R. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:50-65.
163. Erickson GR, Gimple JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. 2002;290:763-769.
164. Mierisch CM, Wilson HA, Turner MA, Milbrandt TA, Berthoux L, Hammarskjold ML, et al. Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1757-1767.
165. Tognana E, Padera RF, Chen F, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Development and remodeling of engineered cartilage-explant composites in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:896-905.
166. Knudson W, Casey B, Nishida Y, Eger W, Kuettner KE, Knudson CB. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1165-1174.
167. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003;24:4337-4351.
168. Bulpitt P, Aeschlimann D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J Biomed Mater Res* 1999;47:152-169.
169. Di Martino A, Sitterling M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005;26:5983-5990.
170. Hoemann CD, Sun J, Legare A, McKee MD, Buschmann MD. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive

chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13: 318-329.

171. Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A, Merceron C, Masson M, Moreau A, et al. An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:1259-1267.

172. Sontjens SH, Nettles DL, Carnahan MA, Setton LA, Grinstaff MW. Biodendrimer-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue repair. *Biomacromolecules* 2006;7:310-316.

173. Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, et al. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005;(435):96-105.

174. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2405-2412.

175. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 4):1497-1508.

176. 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;357:185-189.

177. Shui W, Yin L, Luo J, Li R, Zhang W, Zhang J, et al. Characterization of chondrocyte scaffold carriers for cell-based gene therapy in articular cartilage repair. *J Biomed Mater Res A* 2013;101:3542-3550.

178. Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996;17:103-114.

179. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 2001;19:1029-1034.

180. 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;28:3236-3244.

181. Soontornworajit B, Zhou J, Zhang Z, Wang Y. Aptamer-functionalized in situ injectable hydrogel for controlled protein release. *Biomacromolecules* 2010;11:2724-2730.
182. Paige KT, Vacanti CA. Engineering new tissue: formation of neo-cartilage. *Tissue Eng* 1995;1:97-106.
183. Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, 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.
184. Nestic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:300-322.
185. Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, et al. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996;33:57-63.
186. van Eijk F, Saris DB, Creemers LB, Riesle J, Willems WJ, van Blitterswijk CA, 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;14:1425-1433.
187. Messner K. Hydroxylapatite supported Dacron plugs for repair of isolated full-thickness osteochondral defects of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluations from 6-48 weeks. *J Biomed Mater Res* 1993;27:1527-1532.
188. Defrere J, Franckart A. Teflon/polyurethane arthroplasty of the knee: the first 2 years preliminary clinical experience in a new concept of artificial resurfacing of full thickness cartilage lesions of the knee. *Acta Chir Belg* 1992;92:217-227.
189. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432-463.
190. Fitzpatrick LE, McDevitt TC. Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Biomater Sci* 2015;3:12-24.

191. Brown BN, Barnes CA, Kasick RT, Michel R, Gilbert TW, Beer-Stolz D, et al. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 2010;31:428-437.
192. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater* 2009;5:1-13.
193. Benders KE, van Weeren PR, Badylak SF, Saris DB, Dhert WJ, Malda J. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends Biotechnol* 2013;31:169-176.
194. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med* 2011;17:424-432.
195. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675-3683.
196. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 2009;324:1673-1677.
197. Giavaresi G, Bondioli E, Melandri D, Giardino R, Tschon M, Torricelli P, et al. Response of human chondrocytes and mesenchymal stromal cells to a decellularized human dermis. *BMC Musculoskelet Disord* 2013;14:12-2474-14-12.
198. Yang G, Rothrauff BB, Lin H, Gottardi R, Alexander PG, Tuan RS. Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon-derived extracellular matrix. *Biomaterials* 2013;34:9295-9306.
199. Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F. The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSCs. *Biomaterials* 2013;34:5802-5812.
200. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology* 1999;54:407-410.
201. Dellgren G, Eriksson M, Brodin LA, Radegran K. The extended Biocor stentless aortic bioprosthesis. Early clinical experience. *Scand Cardiovasc J* 1999;33:259-264.

202. Harper C. Permacol: clinical experience with a new biomaterial. *Hosp Med* 2001;62:90-95.

203. Kolker AR, Brown DJ, Redstone JS, Scarpinato VM, Wallack MK. Multilayer reconstruction of abdominal wall defects with acellular dermal allograft (AlloDerm) and component separation. *Ann Plast Surg* 2005;55:36-41; discussion 41-2.

204. Lee MS. GraftJacket augmentation of chronic Achilles tendon ruptures. *Orthopedics* 2004;27:s151-3.

205. Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns* 1995;21:243-248.

206. Pei M, Li JT, Shoukry M, Zhang Y. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2011;22:333-43; discussion 343.

207. Lai Y, Sun Y, Skinner CM, Son EL, Lu Z, Tuan RS, et al. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2010;19:1095-1107.

208. Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, et al. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2007;28:5462-5470.

209. Ando W, Tateishi K, Katakai D, Hart DA, Higuchi C, Nakata K, et al. In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Eng Part A* 2008;14:2041-2049.

210. Lin H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat Rev Genet* 2002;3:931-940.

211. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006;441:1075-1079.

212. Thakkar S, Ghebes CA, Ahmed M, Kelder C, van Blitterswijk CA, Saris D, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular matrix influences gene expression of chondrocytes. *Biofabrication* 2013;5:025003-5082/5/2/025003. Epub 2013 Feb 27.

213. Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, et al. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTechniques* 2000;29:314-8, 320-2, 324 passim.
214. Felgner PL, Tsai YJ, Sukhu L, Wheeler CJ, Manthorpe M, Marshall J, et al. Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1995;772:126-139.
215. Samadikhah HR, Majidi A, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes. *Int J Nanomedicine* 2011;6:2275-2283.
216. Wei W, Mu Y, Li X, Gou M, Zhang H, Luo S, et al. Adenoviral vectors modified by heparin-polyethyleneimine nanogels enhance targeting to the lung and show therapeutic potential for pulmonary metastasis in vivo. *J Biomed Nanotechnol* 2011;7:768-775.
217. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992;111:229-233.
218. Southern PJ, Berg P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1982;1:327-341.
219. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res* 2012;1:27-9175.98152. Epub 2012 Jul 6.
220. Schaffer DV, Koerber JT, Lim KI. Molecular engineering of viral gene delivery vehicles. *Annu Rev Biomed Eng* 2008;10:169-194.
221. Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, et al. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 2002;11:115-132.
222. Klein RM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology* 1992;24:384-386.
223. Eshita Y, Higashihara J, Onishi M, Mizuno M, Yoshida J, Takasaki T, et al. Mechanism of introduction of exogenous genes into cultured cells using DEAE-dextran-MMA graft copolymer as non-viral gene carrier. *Molecules* 2009;14:2669-2683.

224. Loyter A, Scangos G, Juricek D, Keene D, Ruddle FH. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp Cell Res* 1982;139:223-234.
225. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7297-7301.
226. Shau MD, Shih MF, Lin CC, Chuang IC, Hung WC, Hennink WE, et al. A one-step process in preparation of cationic nanoparticles with poly(lactide-co-glycolide)-containing polyethylenimine gives efficient gene delivery. *Eur J Pharm Sci* 2012;46:522-529.
227. Romero EL, Morilla MJ, Bakas LS. Lipid vectors. New strategies for gene therapy. *Medicina (B Aires)* 2001;61:205-214.
228. Dincer S, Turk M, Piskin E. Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther* 2005;12 Suppl 1:S139-45.
229. Wagner E, Culmsee C, Boeckle S. Targeting of polyplexes: toward synthetic virus vector systems. *Adv Genet* 2005;53:333-354.
230. Yamano S, Dai J, Moursi AM. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. *Mol Biotechnol* 2010;46:287-300.
231. Distler JH, Jungel A, Kurowska-Stolarska M, Michel BA, Gay RE, Gay S, et al. Nucleofection: a new, highly efficient transfection method for primary human keratinocytes*. *Exp Dermatol* 2005;14:315-320.
232. Zhu L, Lu Y, Miller DD, Mahato RI. Structural and formulation factors influencing pyridinium lipid-based gene transfer. *Bioconjug Chem* 2008;19:2499-2512.
233. Kongkaneramt L, Sarisuta N, Azad N, Lu Y, Iyer AK, Wang L, et al. Dependence of reactive oxygen species and FLICE inhibitory protein on lipofectamine-induced apoptosis in human lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325:969-977.
234. Howell S, Bradley M, Unciti-Broceta A. Non-toxic, highly efficient delivery of nucleic acids into challenging cells using safectin transfection reagent. *Drug Discov Today* 2010;15:1114.

235. Zaragosi LE, Billon N, Ailhaud G, Dani C. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells* 2007;25:790-797.
236. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. *J Anat* 2006;208:3-12.
237. Sritharan D, Leung YY. Making the next steps in psoriatic arthritis management: current status and future directions. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2015;7:173-186.
238. Uebelhart D. Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16 Suppl 3:S19-21.
239. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J* 2006;20:9-22.
240. Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2241-2256.
241. Uebelhart D, Thonar EJ, Delmas PD, Chantraine A, Vignon E. Effects of oral chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6 Suppl A:39-46.
242. Martel-Pelletier J, Farran A, Montell E, Verges J, Pelletier JP. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules* 2015;20:4277-4289.
243. Mazieres B, Combe B, Phan Van A, Tondut J, Grynfeldt M. Chondroitin sulfate in osteoarthritis of the knee: a prospective, double blind, placebo controlled multicenter clinical study. *J Rheumatol* 2001;28:173-181.
244. Uebelhart D, Malaise M, Marcolongo R, de Vathaire F, Piperno M, Mailleux E, et al. Intermittent treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate: a one-year, randomized, double-blind, multicenter study versus placebo. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:269-276.
245. Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 2006;354:795-808.

246. Moller I, Perez M, Monfort J, Benito P, Cuevas J, Perna C, et al. Effectiveness of chondroitin sulphate in patients with concomitant knee osteoarthritis and psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18 Suppl 1:S32-40.
247. Verbruggen G, Goemaere S, Veys EM. Chondroitin sulfate: S/DMOAD (structure/disease modifying anti-osteoarthritis drug) in the treatment of finger joint OA. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6 Suppl A:37-38.
248. Verbruggen G, Goemaere S, Veys EM. Systems to assess the progression of finger joint osteoarthritis and the effects of disease modifying osteoarthritis drugs. *Clin Rheumatol* 2002;21:231-243.
249. Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6 Suppl A:14-21.
250. Chan PS, Caron JP, Orth MW. Effect of glucosamine and chondroitin sulfate on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in interleukin-1-challenged bovine articular cartilage explants. *Am J Vet Res* 2005;66:1870-1876.
251. Orth MW, Peters TL, Hawkins JN. Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine-HCl and chondroitin sulphate. *Equine Vet J Suppl* 2002;(34):224-229.
252. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Altavilla D, Calatroni A. Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther* 2003;5:R122-31.
253. Chou MM, Vergnolle N, McDougall JJ, Wallace JL, Marty S, Teskey V, et al. Effects of chondroitin and glucosamine sulfate in a dietary bar formulation on inflammation, interleukin-1beta, matrix metalloprotease-9, and cartilage damage in arthritis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230:255-262.
254. Chan PS, Caron JP, Rosa GJ, Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:387-394.
255. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and

nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 2002;21:251-262.

256. Lianxu C, Hongti J, Changlong Y. NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:367-376.

257. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000;43:801-811.

258. Wada Y, Shimada K, Sugimoto K, Kimura T, Ushiyama S. Novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor R-130823 protects cartilage by down-regulating matrix metalloproteinase-1,-13 and prostaglandin E2 production in human chondrocytes. *Int Immunopharmacol* 2006;6:144-155.

259. Berenbaum F, Humbert L, Bereziat G, Thirion S. Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A2 via ATP in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2003;278:13680-13687.

260. Wen D, Nong Y, Morgan JG, Gangurde P, Bielecki A, Dasilva J, et al. A selective small molecule IkappaB Kinase beta inhibitor blocks nuclear factor kappaB-mediated inflammatory responses in human fibroblast-like synoviocytes, chondrocytes, and mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:989-1001.

261. Jomphe C, Gabriac M, Hale TM, Heroux L, Trudeau LE, Deblois D, et al. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:59-65.

262. Smolen JS, Van Der Heijde DM, St Clair EW, Emery P, Bathon JM, Keystone E, et al. Predictors of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with high-dose methotrexate with or without concomitant infliximab: results from the ASPIRE trial. *Arthritis Rheum* 2006;54:702-710.

263. Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ, et al. Etanercept therapy in rheumatoid

arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999;130:478-486.

264. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, et al. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2006;54:26-37.

265. Keystone E, Heijde D, Mason D, Jr, Landewe R, Vollenhoven RV, Combe B, et al. Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum* 2008;58:3319-3329.

266. Keystone EC, Genovese MC, Klareskog L, Hsia EC, Hall ST, Miranda PC, et al. Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor {alpha} given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORWARD Study. *Ann Rheum Dis* 2009;68:789-796.

267. Bresnihan B. Anakinra as a new therapeutic option in rheumatoid arthritis: clinical results and perspectives. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:S32-4.

268. Oldfield V, Dhillon S, Plosker GL. Tocilizumab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2009;69:609-632.

269. Finckh A, Ciurea A, Brulhart L, Kyburz D, Moller B, Dehler S, et al. B cell depletion may be more effective than switching to an alternative anti-tumor necrosis factor agent in rheumatoid arthritis patients with inadequate response to anti-tumor necrosis factor agents. *Arthritis Rheum* 2007;56:1417-1423.

270. Wang Y, Yuan M, Guo QY, Lu SB, Peng J. Mesenchymal Stem Cells for Treating Articular Cartilage Defects and Osteoarthritis. *Cell Transplant* 2015;24:1661-1678.

271. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1888-97.

272. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2010;1:2.
273. Conde J, Gomez R, Bianco G, Scotece M, Lear P, Dieguez C, et al. Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2011;70:551-559.
274. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:890-896.
275. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389-397.
276. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007;262:509-525.
277. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007;28:219-226.
278. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005;105:2214-2219.
279. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-1822.
280. Najjar M, Rouas R, Raicevic G, Boufker HI, Lewalle P, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy* 2009;11:570-583.
281. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008;2:141-150.

282. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619-4621.
283. Batten P, Sarathchandra P, Antoniw JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM, et al. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng* 2006;12:2263-2273.
284. Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JN, Pescatori M, Stubbs AP, et al. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2010;162:474-486.
285. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009;27:1954-1962.
286. Lozito TP, Tuan RS. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *J Cell Physiol* 2011;226:385-396.
287. Dixon JA, Gorman RC, Stroud RE, Bouges S, Hirotsugu H, Gorman JH,3rd, et al. Mesenchymal cell transplantation and myocardial remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2009;120:S220-9.
288. Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation* 2007;30:97-104.
289. Mo XT, Guo SC, Xie HQ, Deng L, Zhi W, Xiang Z, et al. Variations in the ratios of co-cultured mesenchymal stem cells and chondrocytes regulate the expression of cartilaginous and osseous phenotype in alginate constructs. *Bone* 2009;45:42-51.
290. Wu L, Leijten JC, Georgi N, Post JN, van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1425-1436.
291. Wu L, Prins HJ, Helder MN, van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures

are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1542-1551.

292. Frisbie DD. Autologous-conditioned serum: evidence for use in the knee. *J Knee Surg* 2015;28:63-66.

293. Diao HJ, Yeung CW, Yan CH, Chan GC, Chan BP. Bidirectional and mutually beneficial interactions between human mesenchymal stem cells and osteoarthritic chondrocytes in micromass co-cultures. *Regen Med* 2013;8:257-269.

294. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Coble K, Prockop DJ. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells* 2012;30:2283-2296.

295. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Bazhanov N, Kuhlman J, Prockop DJ. Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells* 2013;31:2443-2456.

296. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:704-713.

297. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 2006;5:91-116.

298. Kastrinaki MC, Sidiropoulos P, Roche S, Ringe J, Lehmann S, Kritikos H, et al. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:741-749.

299. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11002-11007.

300. RODBELL M. Localization of Lipoprotein Lipase in Fat Cells of Rat Adipose Tissue. *J Biol Chem* 1964;239:753-755.

301. Gonzalez-Fernandez ML, Perez-Castrillo S, Ordas-Fernandez P, Lopez-Gonzalez ME, Colaco B, Villar-Suarez V. Study on viability and

chondrogenic differentiation of cryopreserved adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for future use in regenerative medicine. *Cryobiology* 2015;71:256-263.

302. Monfort J, Pelletier JP, Garcia-Giralt N, Martel-Pelletier J. Biochemical basis of the effect of chondroitin sulphate on osteoarthritis articular tissues. *Ann Rheum Dis* 2008;67:735-740.

303. Figueiredo MD, Salter CE, Andrietti AL, Vandenplas ML, Hurley DJ, Moore JN. Validation of a reliable set of primer pairs for measuring gene expression by real-time quantitative RT-PCR in equine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;131:65-72.

304. Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomater Sci* 2016.

305. Taylor SE, Smith RK, Clegg PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J* 2007;39:172-180.

306. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016;69:170-179.

307. Guo J, Nguyen A, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016;69:180-188.

308. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005;308:283-290.

309. Vidal MA, Kilroy GE, Johnson JR, Lopez MJ, Moore RM, Gimble JM. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Surg* 2006;35:601-610.

310. 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;72:127-133.

311. Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, et al. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2007;68:1095-1105.
312. Gittel C, Brehm W, Burk J, Juelke H, Staszzyk C, Ribitsch I. Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties. *BMC Vet Res* 2013;9:221-6148-9-221.
313. Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszzyk C, et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J* 2013;195:98-106.
314. Nixon AJ, Lust G, Vernier-Singer M. Isolation, propagation, and cryopreservation of equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res* 1992;53:2364-2370.
315. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg* 2009;79:235-244.
316. Xu J, Zhang C. In vitro isolation and cultivation of human chondrocytes for osteoarthritis renovation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2014;50:623-629.
317. Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H, et al. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol* 2010;10:9.
318. Yang F, Cho SW, Son SM, Bogatyrev SR, Singh D, Green JJ, et al. Genetic engineering of human stem cells for enhanced angiogenesis using biodegradable polymeric nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3317-3322.
319. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
320. Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, et al. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg* 2008;37:713-724.
321. Spencer ND, Chun R, Vidal MA, Gimble JM, Lopez MJ. In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine

bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Vet J* 2011.

322. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.

323. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:462-471.

324. Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H, et al. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol* 2010;10:9.

325. Unciti-Broceta A, Moggio L, Dhaliwal K, Pidgeon L, Finlayson K, Haslett C, et al. High-efficient transfection using cationic lipids with programmed biodegradability. *Drug Discov Today* 2010;15:1111.

326. Tan KY, Teo KL, Lim JF, Chen AK, Choolani M, Reuveny S, et al. Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy* 2015;17:1152-1165.

327. Yallop CA, Svendsen I. The effects of G418 on the growth and metabolism of recombinant mammalian cell lines. *Cytotechnology* 2001;35:101-114.

328. Boura JS, Santos FD, Gimble JM, Cardoso CM, Madeira C, Cabral JM, et al. Direct head-to-head comparison of cationic liposome-mediated gene delivery to mesenchymal stem/stromal cells of different human sources: a comprehensive study. *Hum Gene Ther Methods* 2013;24:38-48.

329. Hu Y, Liu X, Long P, Xiao D, Cun J, Li Z, et al. Nonviral gene targeting at rDNA locus of human mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int* 2013;2013:135189.

330. Santiago-Torres JE, Lovasz R, Bertone AL. Fetal vs adult mesenchymal stem cells achieve greater gene expression, but less osteoinduction. *World J Stem Cells* 2015;7:223-234.

331. Liao HT, Chen CT. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014;6:288-295.
332. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. *J Anat* 2006;208:3-12.
333. Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, et al. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2007;68:1095-1105.
334. Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol* 2007;128:507-520.
335. Pasquinelli G, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M, Conte R, et al. Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastruct Pathol* 2007;31:23-31.
336. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, et al. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J* 2009;23:3494-3505.
337. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol* 2009;132:533-546.
338. Teti G, Cavallo C, Grigolo B, Giannini S, Facchini A, Mazzotti A, et al. Ultrastructural analysis of human bone marrow mesenchymal stem cells during in vitro osteogenesis and chondrogenesis. *Microsc Res Tech* 2012;75:596-604.
339. Pascucci L, Mercati F, Marini C, Ceccarelli P, Dall'Aglio C, Pedini V, et al. Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol* 2010;25:1277-1285.
340. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004;32:414-425.
341. Young HE, Black AC, Jr. Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;276:75-102.

342. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008;14:213-221.
343. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomidou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* 2010;16:927-933.
344. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* 2010;16:814-820.
345. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Ringes-Lichtenberg S, Sturz G, Hoeffler K, et al. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials* 2006;27:4221-4229.
346. Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafó W, Heimbach D, et al. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil* 1996;17:124-136.
347. Arsenault AL, Spitzer E, Simon GT. Improved preservation of cartilage extracellular matrix by freeze dried embedding. *J Microsc* 1987;145:357-360.
348. Hippe-Sanwald S. Impact of freeze substitution on biological electron microscopy. *Microsc Res Tech* 1993;24:400-422.
349. Hoshiba T, Lu H, Yamada T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. Effects of extracellular matrices derived from different cell sources on chondrocyte functions. *Biotechnol Prog* 2011;27:788-795.
350. Christopherson GT, Song H, Mao HQ. The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials* 2009;30:556-564.
351. Li WJ, Jiang YJ, Tuan RS. Chondrocyte phenotype in engineered fibrous matrix is regulated by fiber size. *Tissue Eng* 2006;12:1775-1785.
352. Huang NF, Patlolla B, Abilez O, Sharma H, Rajadas J, Beygui RE, et al. A matrix micropatterning platform for cell localization and stem cell fate determination. *Acta Biomater* 2010;6:4614-4621.

353. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326:1216-1219.
354. Kundu AK, Khatiwala CB, Putnam AJ. Extracellular matrix remodeling, integrin expression, and downstream signaling pathways influence the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on poly(lactide-co-glycolide) substrates. *Tissue Eng Part A* 2009;15:273-283.
355. Thibault MM, Hoemann CD, Buschmann MD. Fibronectin, vitronectin, and collagen I induce chemotaxis and haptotaxis of human and rabbit mesenchymal stem cells in a standardized transmembrane assay. *Stem Cells Dev* 2007;16:489-502.
356. Lindner U, Kramer J, Behrends J, Driller B, Wendler NO, Boehrnsen F, et al. Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells cultured with basement-membrane extracellular matrix proteins. *Cytotherapy* 2010;12:992-1005.
357. Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* 2004;2004:24-34.
358. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009;76:56-66.
359. Singh P, Schwarzbauer JE. Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J Cell Sci* 2012;125:3703-3712.
360. Santiago JA, Pogemiller R, Ogle BM. Heterogeneous differentiation of human mesenchymal stem cells in response to extended culture in extracellular matrices. *Tissue Eng Part A* 2009;15:3911-3922.
361. Angstmann M, Brinkmann I, Bieback K, Breitzkreutz D, Maercker C. Monitoring human mesenchymal stromal cell differentiation by electrochemical impedance sensing. *Cytotherapy* 2011;13:1074-1089.
362. Yoon IS, Chung CW, Sung JH, Cho HJ, Kim JS, Shim WS, et al. Proliferation and chondrogenic differentiation of human adipose-

derived mesenchymal stem cells in porous hyaluronic acid scaffold. *J Biosci Bioeng* 2011;112:402-408.

363. Kang JY, Chung CW, Sung JH, Park BS, Choi JY, Lee SJ, et al. Novel porous matrix of hyaluronic acid for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Int J Pharm* 2009;369:114-120.

364. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:69-78.

365. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:33-45.

366. Garcia-Gomez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramirez M, Castro JG, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10:1453-1468.

367. Noth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:765-783.

368. Fu RH, Wang YC, Liu SP, Huang CM, Kang YH, Tsai CH, et al. Differentiation of stem cells: strategies for modifying surface biomaterials. *Cell Transplant* 2011;20:37-47.

369. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:633-643.

370. Qian L, Saltzman WM. Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification. *Biomaterials* 2004;25:1331-1337.

371. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *Bioessays* 1995;17:1039-1048.

372. Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C, et al. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest* 1994;93:1722-1732.

373. Xu J, Wang W, Ludeman M, Cheng K, Hayami T, Lotz JC, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate gels. *Tissue Eng Part A* 2008;14:667-680.

374. Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:273-281.
375. Ma HL, Chen TH, Low-Tone Ho L, Hung SC. Neocartilage from human mesenchymal stem cells in alginate: implied timing of transplantation. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:439-446.
376. 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;20:530-541.
377. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:597-604.
378. Danisovic L, Bohac M, Zamborsky R, Oravcova L, Provaznikova Z, Csobonyeiova M, et al. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering. *Gen Physiol Biophys* 2016.
379. Havlas V, Kos P, Jendelova P, Lesny P, Trc T, Sykova E. Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2011;78:138-144.
380. Engler AJ, Sweeney HL, Discher DE, Schwarzbauer JE. Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007;7:335.
381. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006;126:677-689.
382. Rao Pattabhi S, Martinez JS, Keller TC,3rd. Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. *Differentiation* 2014;88:131-143.
383. Remacha AR, Barrachina L, Alvarez-Arguedas S, Ranera B, Romero A, Vazquez FJ, et al. Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs. *Vet Immunol Immunopathol* 2015;165:107-118.
384. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-1822.

385. Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008;56:1-8.
386. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006;24:2582-2591.
387. Lee WS, Suzuki Y, Graves SS, Iwata M, Venkataraman GM, Mielcarek M, et al. Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:465-475.
388. Carrade DD, Lame MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells(). *Cell Med* 2012;4:1-11.
389. van Buul GM, Siebelt M, Leijts MJ, Bos PK, Waarsing JH, Kops N, et al. Mesenchymal stem cells reduce pain but not degenerative changes in a mono-iodoacetate rat model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 2014;32:1167-1174.
390. Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C675-82.
391. Xiao Q, Wang SK, Tian H, Xin L, Zou ZG, Hu YL, et al. TNF-alpha increases bone marrow mesenchymal stem cell migration to ischemic tissues. *Cell Biochem Biophys* 2012;62:409-414.
392. Jagielski M, Wolf J, Marzahn U, Volker A, Lemke M, Meier C, et al. The influence of IL-10 and TNFalpha on chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional cultures. *Int J Mol Sci* 2014;15:15821-15844.
393. Noone C, Kihm A, English K, O'Dea S, Mahon BP. IFN-gamma stimulated human umbilical-tissue-derived cells potently suppress NK activation and resist NK-mediated cytotoxicity in vitro. *Stem Cells Dev* 2013;22:3003-3014.
394. Nakamura T. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res* 1991;3:67-85.

395. Watt FM. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J Cell Sci* 1988;89 (Pt 3):373-378.
396. Pigott JH, Ishihara A, Wellman ML, Russell DS, Bertone AL. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2013;26:453-460.
397. Lin QM, Zhao S, Zhou LL, Fang XS, Fu Y, Huang ZT. Mesenchymal stem cells transplantation suppresses inflammatory responses in global cerebral ischemia: contribution of TNF-alpha-induced protein 6. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:784-792.
398. Bai L, Lennon DP, Caplan AI, DeChant A, Hecker J, Kranso J, et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci* 2012;15:862-870.
399. Huang B, Cheng X, Wang H, Huang W, la Ga Hu Z, Wang D, et al. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively. *J Transl Med* 2016;14:45-016-0792-1.
400. Ooi YY, Dheen ST, Tay SS. Paracrine effects of mesenchymal stem cells-conditioned medium on microglial cytokines expression and nitric oxide production. *Neuroimmunomodulation* 2015;22:233-242.
401. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Soullillou JP, et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;110:3691-3694.
402. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010;184:2321-2328.
403. Yanez R, Oviedo A, Aldea M, Bueren JA, Lamana ML. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res* 2010;316:3109-3123.

404. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Bazhanov N, Kuhlman J, Prockop DJ. Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells* 2013;31:2443-2456.
405. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:455-463.
406. De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* 2012;12:574-591.
407. Zhou C, Yang B, Tian Y, Jiao H, Zheng W, Wang J, et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cell Immunol* 2011;272:33-38.
408. Ye Z, Wang Y, Xie HY, Zheng SS. Immunosuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7:608-614.
409. Wu L, Post JN, Karperien M. Engineering cartilage tissue by pellet coculture of chondrocytes and mesenchymal stromal cells. *Methods Mol Biol* 2015;1226:31-41.
410. Lettry V, Hosoya K, Takagi S, Okumura M. Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells. *Jpn J Vet Res* 2010;58:5-15.
411. Ando Y, Matsubara K, Ishikawa J, Fujio M, Shohara R, Hibi H, et al. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone* 2014;61:82-90.
412. Sinusas K. Osteoarthritis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2012;85:49-56.
413. Tat SK, Pelletier JP, Verges J, Lajeunesse D, Montell E, Fahmi H, et al. Chondroitin and glucosamine sulfate in combination decrease the pro-resorptive properties of human osteoarthritis subchondral bone osteoblasts: a basic science study. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R117.

414. Iovu MO, Heroux L, Verges J, Montell E, Paiement J, du Souich P. Effect of chondroitin sulfate on turpentine-induced down-regulation of CYP1A2 and CYP3A6. *Carbohydr Res* 2012; 355:63-68.
415. Hochberg MC. Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18 Suppl 1:S28-31.
416. Li X, Ellman M, Muddasani P, Wang JH, Cs-Szabo G, van Wijnen AJ, et al. Prostaglandin E2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60:513-523.
417. Lee SW, Song YS, Lee SY, Yoon YG, Lee SH, Park BS, et al. Downregulation of protein kinase CK2 activity facilitates tumor necrosis factor-alpha-mediated chondrocyte death through apoptosis and autophagy. *PLoS One* 2011; 6:e19163.
418. Jin M, Iwamoto T, Yamada K, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75:1283-1289.
419. Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, et al. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:11419-11423.
420. Mackenzie IS, Rutherford D, MacDonald TM. Nitric oxide and cardiovascular effects: new insights in the role of nitric oxide for the management of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10 Suppl 2:S3.
421. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423:356-361.
422. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:561459.
423. Shen J, Li S, Chen D. TGF-beta signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Res* 2014; 2:14002.
424. Wang M, Sampson ER, Jin H, Li J, Ke QH, Im HJ, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15:R5.

425. Lee HK, Lim SH, Chung IS, Park Y, Park MJ, Kim JY, et al. Preclinical efficacy and mechanisms of mesenchymal stem cells in animal models of autoimmune diseases. *Immune Netw* 2014;14:81-88.
426. Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. *Am J Reprod Immunol* 2012;67:1-8.
427. Kwidzinski E, Bunse J, Kovac AD, Ullrich O, Zipp F, Nitsch R, et al. IDO (indolamine 2,3-dioxygenase) expression and function in the CNS. *Adv Exp Med Biol* 2003;527:113-118.
428. Schminke B, Miosge N. Cartilage repair in vivo: the role of migratory progenitor cells. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16:461-014-0461-4.
429. Nishimoto S, Takagi M, Wakitani S, Nihira T, Yoshida T. Effect of chondroitin sulfate and hyaluronic acid on gene expression in a three-dimensional culture of chondrocytes. *J Biosci Bioeng* 2005;100:123-126.
430. Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, et al. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* 2002;46:1789-1803.
431. Yamada H, Kikuchi T, Nemoto O, Obata K, Sato H, Seiki M, et al. Effects of indomethacin on the production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1996;23:1739-1743.
432. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 2009;113:6576-6583.
433. Pecchi E, Priam S, Mladenovic Z, Gosset M, Saurel AS, Aguilar L, et al. A potential role of chondroitin sulfate on bone in osteoarthritis: inhibition of prostaglandin E(2) and matrix metalloproteinases synthesis in interleukin-1beta-stimulated osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:127-135.
434. Ferrandiz ML, Terencio MC, Carceller MC, Ruhi R, Dalmau P, Verges J, et al. Effects of BIS076 in a model of osteoarthritis induced

by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. BMC Musculoskelet Disord 2015;16:92-015-0547-9.