



Evaluación de la respuesta celular de células madre adultas de origen mesenquimal frente a materiales cerámicos

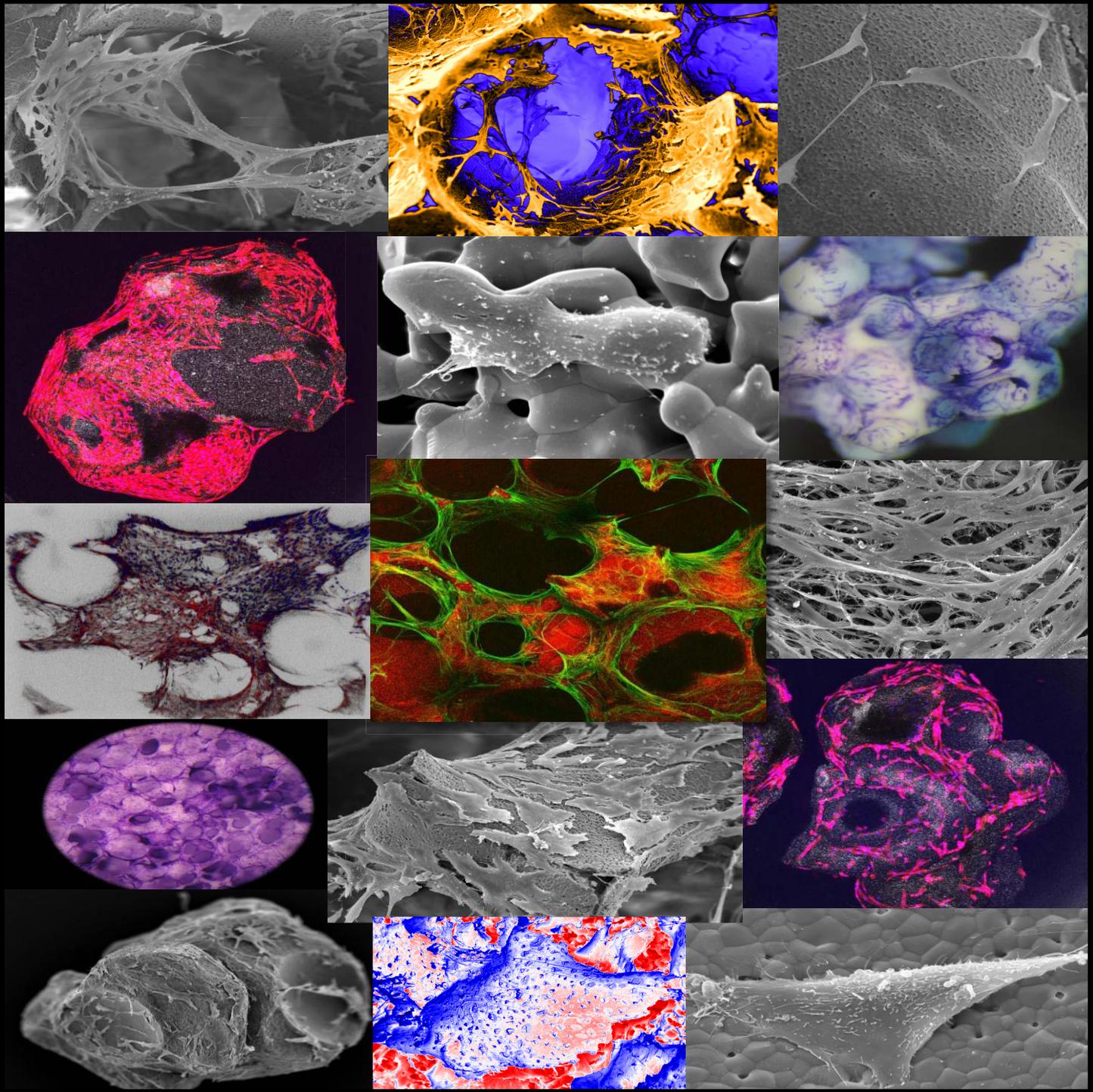
Claudia Alejandra Müller Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Evaluación de la respuesta celular de células madre adultas de origen mesenquimal frente a materiales cerámicos



Claudia Alejandra Müller Sánchez

Barcelona 2014

**Evaluación de la respuesta celular de células
madre adultas de origen mesenquimal frente a
materiales cerámicos**

Claudia Alejandra Müller Sánchez

Barcelona, Marzo 2014

Universidad de Barcelona
Departamento de Biología Celular

Memoria presentada por la licenciada en Biología Claudia Alejandra Müller Sánchez, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona, por el programa de Doctorado en Biomedicina del Departamento de Biología Celular (Bienio 2009-2014)

La presente Tesis Doctoral: “Evaluación de la respuesta celular de células madre adultas de origen mesenquimal frente a materiales cerámicos” ha estado realizada en el departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona bajo la dirección del Dr. Manuel Reina del Pozo.

El Director,

La Doctoranda

Manuel Reina del Pozo

Claudia Alejandra Müller Sánchez

A mis padres Roberto y Nahir

A mi hermano Robert

*Y a mi marido Carlos... porque son mis pilares y
mi principal fuente de apoyo e inspiración.*

Agradecimientos

Sin duda hacer un doctorado no se trata únicamente del desarrollo de un proyecto de investigación del que obtienes unos resultados y escribes una memoria. Se trata de conjunto de experiencias personales y profesionales que abren tu mente y te brindan la oportunidad de mirar las cosas desde muchos puntos de vista. Con el tiempo parece obvio que ser curioso, paciente, perseverante y mantenerte fiel a tus valores y principios parecen ser las claves fundamentales para alcanzar las metas y los objetivos propuestos.

Han sido muchas las personas que han estado presentes en éste largo recorrido y a las cuales quisiera dedicar unas cuantas líneas, aunque quizás no sean lo suficientemente extensas para demostrar mi gratitud. En primer lugar agradecer a mi tutor Manuel Reina por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la confianza y libertad suficiente para alcanzar los objetivos profesionales propuestos. También por su flexibilidad y apoyo en todo aquello que necesité para cumplir unas cuantas metas personales. Seguidamente agradecer a Conxita de Castellarnau, una persona clave en el desarrollo de este proyecto y un gran ejemplo a seguir para todos los que conformamos el equipo de Celltec-UB. Has sido para mí una gran guía y siempre recordaré que un diseño experimental meticuloso es clave para ahorrar tiempo y dinero en cualquier proyecto.

Gracias a todos los chicos del laboratorio que poco a poco fueron llenando espacios y convirtiendo nuestro trabajo en un lugar más grato y divertido. . . . Nuria Nieto, María Angulo, Alejandro Martorell, Xavier Rovira, Víctor Uleceta y Janat Fazal, Todos han sido un apoyo incondicional y los generadores de muchas sonrisas a los largo de estos años. Al resto del equipo Enric Espel, Ricardo Casaroli, Ofelia Martínez, Francesc Soriano y Susana Castel, quienes siempre han estado disponibles a responder preguntas y a proporcionar consejos y sugerencias.

También quisiera agradecer a Arlyng González. Mi hermana de corazón, mi compañera estudio, de alegrías y penas, sabores y sin sabores. También un reconocimiento especial a

todos los miembros del grupo de los Catazolanos, con los que he disfrutado de esta hermosa tierra y he compartido momentos mágicos de fusión catalana-venezolana.

Finalmente agradecer a mis padres Roberto Müller y Nahir Sánchez y a mi hermano Robert, quienes hace unos cuantos años guardaron su corazón en un bolsillo y renunciaron a la posibilidad de tenerme cerca para apoyar mi decisión de trasladarme a Barcelona y continuar mis estudios. Asimismo a mi esposo Carlos Moreno, quien ha compartido minuto a minuto este recorrido y me ha brindado todo su cariño y comprensión en los momentos más difíciles. También a mis Stos Carlos Moreno y Alba infante, por estar siempre presentes. Han sido, son y seguirán siendo mi inspiración. . . .

Claudia A. Müller S.

26/03/2014

... “Existe un solo pecado y ese es robar. Todos los demás pecados son simplemente variaciones de robar. ¿Entiendes? Cuando matas a un hombre, robas una vida. Le robas a su esposa el derecho de tener un esposo, a sus hijos el derecho de tener padre. Cuando dices una mentira, le robas a alguien el derecho a la verdad. No hay acto más despreciable que robar.”

Khaled Hosseini
Cometas en el cielo

RESUMEN

Las células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADSCs) tienen un gran potencial dentro del campo de la ingeniería de tejidos debido a su fácil obtención, capacidad de diferenciación a múltiples linajes, propiedades inmunomoduladoras y producción de factores proangiogénicos y antiapoptóticos. Asimismo, los materiales cerámicos de fosfato de calcio son ampliamente utilizados como biomateriales en la ingeniería de tejidos del hueso, debido a su similitud con la fase mineral del tejido óseo. Además, su combinación con proteínas de matriz extracelular (ECM) o factores osteoinductores (factores de crecimiento y células endoteliales, etc) puede incrementar la bioactividad del constructo células-biomaterial. A pesar de ello, pocos trabajos existen en la literatura que evalúen la repuesta de células ADSCs frente a biomateriales cerámicos de fosfatos de calcio, empleando recubrimientos con proteínas de ECM y/o el cocultivo de células ADSCs con células endoteliales, como factores claves para el incremento de la inducción de las células hacia linajes osteogénicos.

En este sentido, el objetivo del presente trabajo ha sido *Evaluar la biocompatibilidad y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo (ADSCs) frente a materiales cerámicos de fosfato de calcio con o sin proteínas de matriz extracelular y células endoteliales.*

Nuestros resultados indican que las células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo humano (hADSCs), expresan marcadores característicos de células progenitoras (CD29, CD44, CD73, CD90 Y CD105) y se diferencian hacia linajes adipogénico, osteogénico, condrogénico y miogénico. Particularmente las señales de diferenciación osteogénicas de las células hADSCs son muy potentes y comparables en gran medida con las de otras líneas de osteoblastos ampliamente utilizadas en el campo de la ingeniería de tejidos tales como las MCT3T3 y hFOB 1.19. Por lo tanto son un excelente modelo celular para la evaluación de biomateriales diseñados con la finalidad de favorecer la regeneración ósea.

El diseño de una metodología especial para el cultivo celular sobre biomateriales, permitió la cuantificación eficiente y reproducible del porcentaje de células que se adhieren específicamente al material y el seguimiento de su proliferación. Empleando fibroblastos dérmicos humanos (HDF) se demostró que el biomaterial cerámico KeraOs[®] (KO) es biocompatible según la ISO 10993-5.

El estudio de la respuesta de las células hADSCs frente a diversos biomateriales cerámicos, evidenció que las células se adhieren, proliferan y se diferencian hacia un fenotipo osteoblástico sobre los materiales comerciales Bone Ceramic®, Cerasorb® y KeraOs®, aunque no sobre Bio-Oss®. Cada material induce una respuesta osteogénica con un perfil particular en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina y la expresión de los genes osteonectina y osteocalcina. Aunque los biomateriales solos desencadenan la diferenciación de las células, la adición de factores inductores en el medio de cultivo potencia la respuesta osteogénica.

El recubrimiento del material KeraOs® con fibronectina, colágeno o la combinación FN/COL incrementa significativamente la producción de matriz extracelular, la actividad de la enzima fosfatasa alcalina y la expresión de un mayor número de genes asociados a rutas de diferenciación osteogénicas tales como BMP1, BMP2, Runx2, SMAD1, etc. Sin embargo, respecto a las otras dos proteínas, la fibronectina induce el mayor aumento en la adhesión celular y la respuesta osteogénica.

Por otra parte se observó que el cocultivo de células hADSCs con células endoteliales también incrementa el potencial osteogénico de las células hADSCs. Adicionalmente las células endoteliales forman estructuras tipo capilares y se expresan marcadores angiogénicos tales como VEGF, VE-cad, α -SMA y Ang-1.

Finalmente evaluamos el efecto del biomaterial KeraOs® combinado con fibronectina y células madre autólogas de tejido adiposo sobre la regeneración de perros Beagles. Similar a lo observado con las mesenquimales humanas (hADSCs), las caninas se adhieren, proliferan y se diferencian hacia un fenotipo osteoblástico, evidenciando su utilidad como modelo para el estudio de la regeneración ósea tanto *in vitro* como *in vivo*.

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

II.	Abreviaturas	
III.	Índice de Figuras	
IV.	Índice de Tablas	
1.	Introducción	
1.1	Ingeniería de tejidos y los cultivos tridimensionales <i>in vitro</i>	39
1.2	El hueso y la Ingeniería de tejidos del hueso	42
1.2.1	Estructura del hueso: Células y matriz extracelular ósea	42
1.2.2	Remodelación, daño y reparación del tejido óseo	45
1.2.3	Ingeniería de tejidos del hueso	48
1.2.3.1	<i>Biomateriales en la reconstrucción del tejido óseo</i>	51
1.2.3.2	<i>Materiales Cerámicos de fosfato de calcio</i>	53
1.2.3.2.1	<i>Composición química</i>	53
1.2.3.2.2	<i>Estructura</i>	54
1.2.3.2.3	<i>Propiedades mecánicas</i>	55
1.2.3.2.4	<i>Biodegradabilidad</i>	56
1.2.3.2.5	<i>Estímulos bioquímicos para incrementar la biofuncionalidad</i>	56
1.2.3	Evaluación de la Biocompatibilidad de materiales	57
1.3	Células madres mesenquimales adultas: definición y papel en la ingeniería de tejidos	59
1.3.1	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSCs)	63
1.4	Células madre mesenquimales (MSCs) y osteogénesis	57
1.5	Células madres mesenquimales (MSCs) y materiales cerámicos de fosfato de calcio: interacción célula-biomaterial y osteogénesis.	73
1.6	Células endoteliales como moduladoras de la osteogénesis de células madre mesenquimales: osteogénesis y vascularización <i>in vitro</i>	77
2.	Objetivos	83
3.	Materiales y Métodos	
3.1	Reactivos, Materiales y Equipos	87
3.1.1	Soluciones Tampón	87
3.1.2	Medios de Cultivo comerciales	87
3.1.3	Suplementos de medios de cultivo	88
3.1.4	Enzimas	88
3.1.5	Medios de Cultivo celular	89
3.1.6	Proteínas de Recubrimiento	89
3.1.7	Kits	90
3.1.8	Otros Reactivos	91
3.1.9	Material de cultivo celular	92
3.1.10	Equipos	92
3.2	Tipos celulares: características y condiciones de mantenimiento de cultivos sobre plástico	93

3.2.1	Células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo humano (hADSCs)	93
3.2.2	Células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo canino (cADSCs)	93
3.2.3	MC3T3	94
3.2.4	hFOB 1.19	95
3.2.5	Fibroblastos dérmicos humanos (HDF)	95
3.2.6	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)	96
3.3	Aislamientos celulares	97
3.3.1	Células hADSCs	97
3.3.2	Células cADSCs	99
3.4	Caracterización de células hADSCs y cADSCs	100
3.4.1	Expresión de antígenos de superficie: Citometría de flujo	100
3.4.2	Diferenciación a múltiples linajes	101
3.4.2.1	<i>Diferenciación Osteogénica</i>	101
3.4.2.2	<i>Diferenciación Adipogénica</i>	102
3.4.2.3	<i>Diferenciación Miogénica</i>	102
3.4.2.4	<i>Diferenciación Condrogénica</i>	102
3.5	Cultivo celular sobre biomateriales cerámicos de fosfato de calcio	103
3.5.1	Biomateriales	103
3.5.2	Cultivo celular sobre biomateriales: acondicionamiento, aplicación de recubrimientos y siembra celular.	105
3.5.2.1	<i>Discos</i>	105
3.5.2.2	<i>Granulados</i>	108
3.6	Cocultivos de hADSCs y HUVEC	112
3.7	Adhesión y proliferación: viabilidad celular con Alamar Blue®	113
3.8	Histoquímica	114
3.8.1	Azul de Toluidina	114
3.8.2	Rojo de Alizarina	114
3.8.3	Oil Red	115
3.8.4	Azul Alcian	116
3.9	3.9 Inmunofluorescencia	116
3.10	3.10 Microscopía	118
3.10.1	Confocal	118
3.10.2	Electrónica de Barrido (SEM)	118
3.11	Detección bioquímica de fosfatasa alcalina	119
3.12	Aislamiento de RNA	120
3.13	Retro-trascrición	121
3.13.1	Retro-trascrición de muestras para PCR en tiempo real	121

3.13.2	Retro-transcripción de muestras para qPCR-array	122
3.14	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	122
3.15	qPCR-Array	125
3.16	Ensayos de citotoxicidad indirecta con el ensayo WST-1	127
3.17	Regeneración de defectos óseos creados en mandíbula de perros Beagles	128
3.18	Análisis Estadístico	130
4.	Resultados	
4.1	Aislamiento y caracterización de células mesenquimales de tejido adiposo humano (hADSCs)	133
4.2	Aislamiento y caracterización de células mesenquimales de tejido adiposo canino (cADSCs)	137
4.3	Comparación de la capacidad de diferenciación osteogénica de células hADSCs y cADSCs con las líneas MC3T3 y hFOB 1.19.	141
4.4	Estandarización y Biocompatibilidad del biomaterial KeraOs®	144
4.4.1	Discos KeraOs®	144
4.4.2	Estudio comparativo de la biocompatibilidad de los biomateriales granulados KeraOs® (KO), Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC) y Cerasorb® (CS).	152
4.5	Respuesta de células hADSCs frente a biomateriales	154
4.5.1	Discos KeraOs con y sin recubrimiento de Fibronectina	154
4.5.2	Granulados	161
4.6	Cocultivo de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano y células endoteliales de cordón umbilical humano	175
4.7	Regeneración ósea en perros Beagle	185
5.	DISCUSIÓN	
5.1	Aislamiento y caracterización de células madre derivadas de tejido adiposo humano (hADSCs) y canino (cADSCs)	193
5.2	Capacidad de diferenciación osteogénica de células hADSCs y cADSCs	198
5.3	Biocompatibilidad del biomaterial KeraOs®	200
5.4	Respuesta de células hADSCs frente a materiales cerámicos	202
5.5	Efecto del recubrimiento de la superficie del material KeraOs® sobre la biocompatibilidad y diferenciación osteogénica de células hADSCs.	207
5.6	Cocultivo de células hADSCs y HUVEC: diferenciación osteogénica y formación de estructuras capilares	212
5.7	Efecto del biomaterial KO combinado FN y células madre mesenquimales autólogas derivadas de tejido adiposo canino (cADSCs), sobre la regeneración ósea en perros Beagle	216
6.	Conclusiones	221
7.	Referencias	225

II. ABREVIATURAS

AB	Alamar Blue®
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ALP = ALPL	Fosfatasa alcalina
AM	Medio de cultivo adipogénico
Ang 1	Angiopoyetina 1
Ang 2	Angiopoyetina 2
BC	Bone Ceramic®
BCP	Fosfato de calcio bifásico
BGLAP = OC	Osteocalcina
BMP	Proteína morfogenética del hueso
BM-MSCs	Células madre mesenquimal derivadas de la médula ósea
BO	Bio-Oss®
BSP	Sialoproteína del hueso
CCiTUB	Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona
cADSCs	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo canino
Cel	Células
CM	Medio de cultivo condrogénico
COL	Colágeno
COL	Colágeno tipo 1
COL XII	Colágeno tipo 12
CS	Cerasorb®
DMEM 1 g/L	Medio Eagle modificado por Dulbecco 1 g/L Glucosa
DMEM 4 g/L	Medio Eagle modificado por Dulbecco 4 g/L Glucosa
DMS	Dexametasona
D-PBS	Tampón Fosfato salino Dulbecco`s 1X
D-PBS Ca⁺² Mg²⁺	Tampón Fosfato salino Dulbecco`s 1X con calcio y magnesio
D-PBS/EDTA	Tampón Fosfato salino Dulbecco`s 1X – EDTA
EBM	Medio endotelial basal
EBM-2	Medio endotelial basal 2
ECGS	Suplemento para el crecimiento de células endoteliales
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGM-2	Medio endotelial de crecimiento 2
EM	Medio endotelial
FBS	Suero bovino fetal
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FN	Fibronectina
FN/COL	Mezcla fibronectina/Colágeno en relación 1:1
G418	Geneticina 418
Gly 2P	Glicerol dos fosfato
HA	Hidroxiapatita
hADSCs	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano
Ham`s F12	Medio de cultivo HAM`s F12
HDF	Fibroblastos dérmicos humanos
hFOB 1.19	Línea de osteoblastos embrionarios humanos
HDMECs	Células endoteliales de la microvasculatura dérmica humana
HAS	Albúmina

HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
ITG	Integrina
ITS	Solución Insulina-Transferrina-Selenio- Etanolamina
KO	KeraOs® en formato de granulado
KO COL	KeraOs® en formato de granulado recubierto con Colágeno
KO FN	KeraOs® en formato de granulado recubierto con fibronectina
KO FN/COL	KeraOs® en formato de granulado recubierto con una mezcla de fibronectina/Colágeno en relación 1:1
KOd	KeraOs® en formato de disco
KOd COL	KeraOs® en formato de disco recubierto con Colágeno
KOd FN	KeraOs® en formato de disco recubierto con fibronectina
L-Gln	L-Glutamina
L-Pro	L-Prolina
MC	Medio condrogénico
MC3T3	Línea celular de osteoblastos murinos clon E1
MEM 199	Minimum Essential Medium 199
MM	Medio de cultivo miogénico
MMPs	Metaloproteasas
MSCs	Células madre mesenquimales
OC= BGLAB	Osteocalcina
OM	Medio de cultivo osteogénico
ON	Osteonectina
OP	Osteopontina
P	Plasma
P/E	Penicilina/estreptomicina
PB	Tampón fosfato (1M)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Paraformaldehído
PM	Medio proliferativo
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Rpm	Revoluciones por minute
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TB	Tampón de bloqueo
TF	Tampón FACS
TGF-β	Factor de crecimiento transformante
TL	Tampón de Lavados
TP	Tampón de permeabilización
VE-Cad	Caderina endotelial vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WST-1	Reactivo de proliferación celular WST-1
α MEM	Minimum Essential Medium alfa
α-SMA	Alfa actina de músculo liso
β-Act	Beta Actina
β-TCP	Beta fosfato tricálcico

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagen representativa del procedimiento aplicado en la ingeniería de tejidos para la regeneración de tejidos dañados	39
Figura 2	Factores microambientales que afectan el comportamiento celular	40
Figura 3	Organización histológica del hueso	45
Figura 4	Proceso de reparación de un hueso fracturado	46
Figura 5	Ingeniería de tejidos del hueso	49
Figura 6	Tipos de biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos del hueso en función de su composición química	52
Figura 7	Ejemplos de materiales cerámicos comerciales utilizados como sustitutos óseos	53
Figura 8	Biomateriales de fosfato de calcio	54
Figura 9	Esquema ilustrativo del nicho de las células madre mesenquimales	59
Figura 10	Esquema ilustrativo de la capacidad de diferenciación a múltiples linajes de las células madres mesenquimales adultas	60
Figura 11	Diferenciación de células mesenquimales adultas hacia células de linajes mesodérmico endodérmico y ectodérmico	60
Figura 12	Diferentes tipos celulares que coexisten con las células madre mesenquimales en el tejido adiposo blanco.	63
Figura 13	Tejido adiposo, lipoaspirados y células madres derivadas de tejido adiposo	64
Figura 14	Propiedades biológicas de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSCs) y su potencial en la ingeniería de tejidos	66
Figura 15	Proceso de regeneración, remodelación y reparación del hueso y factores implicados	67
Figura 16	Proceso de diferenciación osteogénica	68
Figura 17	Inducción de la diferenciación osteoblástica de células progenitoras mediante la ruta de señalización de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs)	69
Figura 18	Señalización de las BMPs en la diferenciación osteogénica	70
Figura 19	Inducción de la ruta de diferenciación osteogénica mediante miembros de la familia TGF- β no pertenecientes al subgrupo de las BMPs	71
Figura 20	Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) en la diferenciación osteogénica	71
Figura 21	Vista general de las rutas de señalización que pueden afectar la expresión de Runx-2	72
Figura 22	Formación y maduración de vasos tipo capilares	80
Figura 23	Factores implicados en la comunicación entre las células formadoras de hueso (MSCs, osteoprogenitoras y osteoblastos) y las células endoteliales	81
Figura 24	Aislamiento de células madre de tejido adiposo humano	98
Figura 25	Panícula adiposa extraída del área abdominal de perros de raza Beagle	99
Figura 26	Imágenes representativas del material KeraOs®	103
Figura 27	Configuración de discos de β -TCP (KOD) en placas de 24 pocillos antes de la siembra celular	105
Figura 28	Representación gráfica del proceso de siembra celular sobre discos de β -TCP y separación de células adheridas y no adheridas al disco	107
Figura 29	Fotografía de granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) en placas NetwellTM	108

Figura 30	Representación esquemática de la siembra celular sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) colocados en placas Netwell™	110
Figura 31	Esquema representativo de la siembra y separación de células adheridas y no adheridas a granulados	111
Figura 32	Aislamiento RNA con Trizol	121
Figura 33	Diseño general de placa de qPCR-array	125
Figura 34	Genes Housekeeping y controles evaluados en el qPCR-Array	126
Figura 35	Genes de la ruta osteogénica evaluados en el qPCR-Array	126
Figura 36	Esquema representativo de los procedimientos realizados en el experimento in vivo de la regeneración de defectos óseos mandibulares en perros de raza Beagle.	130
Figura 37	Células madre mesenquimales aisladas a partir de tejido adiposo humano y cultivadas durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C) con medio proliferativo (PM)	133
Figura 38	Análisis de expresión de marcadores de superficie en células hADSCs mediante citometría de flujo	134
Figura 39	Tinción Rojo de Alizarina de células hADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo	135
Figura 40	Tinción Oil red de células hADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y adipogénico (AM) tras 21 días de cultivo	135
Figura 41	Imágenes de contraste de fases de células hADSCs con medio proliferativo (PM) y miogénico (MM) tras 28 días de cultivo	136
Figura 42	Tinción Azul Alcian de células hADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y condrogénico (CM) tras 21 días de cultivo	136
Figura 43	Células madre mesenquimales aisladas a partir de panícula adiposo canino y cultivadas durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C) con medio proliferativo (PM).	137
Figura 44	Análisis de expresión de marcadores de superficie en células cADSCs mediante citometría de flujo	138
Figura 45	Tinción Rojo de Alizarina de células cADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo	139
Figura 46	Tinción Oil Red de células cADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y adipogénico (AM) tras 21 días de cultivo	139
Figura 47	Imágenes de contraste de fases de células cADSCs con medio proliferativo (PM) y miogénico (MM) tras 28 días de cultivo	140
Figura 48	Tinción Azul Alcian de células cADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y condrogénico (CM) tras 21 días de cultivo	140
Figura 49	Tinción de Rojo Alizarina sobre células MC3T3, hFOB. 1.19, hADSCs y cADSCs mantenidas bajo condiciones de proliferación (PM) o inducción a linaje osteogénico (OM)	142
Figura 50	Representación gráfica de la actividad de la enzima ALP en células MC3T3, hFOB. 1.19, hADSCs y cADSCs mantenidas bajo condiciones de proliferación (PM) o inducción a linaje osteogénico (OM)	143
Figura 51	Efecto de la densidad de siembra en la cuantificación del porcentaje de adhesión de células HDF sobre discos KeraOs (Kod)	145
Figura 52	Efecto del volumen de acondicionamiento y siembra en el porcentaje de adhesión de células HDF sobre discos KeraOs (Kod)	146

Figura 53	Proliferación de células HDF sobre discos KeraOs (KOd) y plástico	147
Figura 54	Citotoxicidad indirecta de extractos de discos KeraOs (KOd) sobre células HDF	148
Figura 55	Efecto del recubrimiento de discos KeraOs (KOd) con colágeno (KOd COL), fibronectina (KOd FN), albúmina (KOd HSA) y plasma (KOd P50 % y KOd 100 %) sobre el porcentaje de adhesión de células HDF	149
Figura 56	Efecto del recubrimiento de discos KeraOs (KOd) con colágeno (KOd COL), fibronectina (KOd FN), albúmina (KOd HSA) y plasma (KOd P50% y KOd 100%) sobre la proliferación células HDF	149
Figura 57	Imágenes de microscopía estereoscópica de células HDF sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y recubiertos con colágeno (KOd COL), fibronectina (KOd FN), albúmina (KOd HSA) y plasma (KOd P50% y KOd 100%) tras 7 días de cultivo	150
Figura 58	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células HDF sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y recubiertos con colágeno (KOd COL), fibronectina (KOd FN), albúmina (KOd HSA) y plasma (KOd P50% y KOd 100%) tras 7 días de cultivo	151
Figura 59	Porcentaje de adhesión y proliferación de células HDF sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO)	153
Figura 60	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células HDF sobre granulados tras 21 días de cultivo	153
Figura 61	Proliferación de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN) con medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 0, 7, 14 y 21 días	155
Figura 62	Imágenes de microscopía electrónica de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN) en medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 7, 14 y 21 días	156
Figura 63	Imágenes de microscopía confocal de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) tras 21 días de cultivo	157
Figura 64	Actividad fosfatasa Alcalina (ALP) de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN) con medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 0, 7, 14 y 21 días	158
Figura 65	Tasa de variación de la actividad ALP en células hADSCs cultivadas sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN) en medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM), respecto a células cultivadas en plástico con y sin recubrimiento de FN (controles)	158
Figura 66	Expresión relativa de los genes fosfatasa alcalina (A), osteonectina (B) y osteocalcina (C) en células hADSCs cultivadas con medios proliferativo (PM) y osteogénico (OM) sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN)	160
Figura 67	Proliferación de células hADSCs sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) con medio de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM)	162

Figura 68	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células hADSCs sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) con medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días.	162
Figura 69	Actividad fosfatasa Alcalina (ALP) en células hADSCs cultivadas sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) tras 14 y 21 días con medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM)	163
Figura 70	Expresión relativa de los genes fosfatasa alcalina (A), osteonectina (B) y osteocalcina (C) en células hADSCs cultivadas durante 21 días sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM)	165
Figura 71	Imágenes de microscopía estereoscópica de células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo	167
Figura 72	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo	168
Figura 73	Tasa de variación de la actividad ALP en células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo	169
Figura 74	Representación gráfica de la magnitud de la expresión de los genes evaluados en el qPCR- Array de las células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo	170
Figura 75	Índice de expresión de una selección de genes evaluados mediante qPCR- Array de células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo.	173
Figura 76	Expresión relativa de los genes fosfatasa alcalina (A), osteocalcina (B), colágeno 12A1 (C), Osteonectina (D), Osteopontina (E) e Integrina α 5 (F) en células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con Fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de Fibronectina y Colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo	174
Figura 77	Imágenes de microscopía de fluorescencia de cocultivos de células hADSCs-HUVEC con medios de cultivo endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) durante 7 días	176
Figura 78	Imágenes de inmunofluorescencia de cocultivos de células hADSCs-HUVEC con medio endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) tras 7 días de cultivo	177

Figura 79	Imágenes de inmunofluorescencia de cocultivos de células hADSCs-HUVEC con medio endotelial de crecimiento (EGM-2) tras 7 días de cultivo	177
Figura 80	Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HUVEC y hADSCs marcadas con colorantes Vybrant creciendo en monocultivo sobre plástico tras 7 días de cultivo	178
Figura 81	Imágenes de microscopía de contraste de fases de células HUVEC y hADSCs sembradas sobre matrigel tras 24 horas de cultivo	178
Figura 82	Imagen representativa de cocultivos de células HDF-HUVEC con medio de cultivo endotelial de crecimiento (EGM-2) tras 7 días de cultivo	179
Figura 83	Expresión relativa de genes osteogénicos (A) y angiogénicos (B) en cocultivos de células hADSCs-HUVEC cultivadas sobre plástico con medios proliferativo (PM), osteogénico (OM), endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) tras 7 días	180
Figura 84	Imagen de microscopía de fluorescencia de cocultivos de células hADSCs-HUVEC con medio osteogénico (OM) tras 7 días de cultivo	181
Figura 85	Imágenes de microscopía confocal de cocultivos de células hADSCs-HUVEC sobre granulados KeraOs sin recubrimiento (KO) y con recubrimiento de fibronectina (KO FN). Se mantuvieron los cultivos con medio osteogénico (OM), endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) durante 7 días	183
Figura 86	Expresión relativa de genes osteogénicos (A) y angiogénicos (B) de cocultivos de células hADSCs-HUVEC sobre granulados KeraOs sin recubrimiento (KO) y con recubrimiento de fibronectina (KO FN). Se mantuvieron los cultivos con medio osteogénico (OM), endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) durante 7 días	184
Figura 87	Adhesión y proliferación de células cADSCs sobre discos KeraOs (Kod) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 0, 7, 14 y 21 días de cultivo	185
Figura 88	Células cADSCs sobre discos KeraOs (Kod) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. A1, A2) Imágenes de microscopía estereoscópica	187
Figura 89	Células cADSCs cultivadas sobre plástico y discos KeraOs (Kod) con y sin recubrimiento de fibronectina (FN) en medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 de cultivo.	188
Figura 90	Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) en células cADSCs cultivadas sobre discos KeraOs (Kod) con y sin recubrimiento de fibronectina (Kod FN) en medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 de cultivo	188
Figura 91	Expresión relativa de los genes fosfatasa alcalina (ALP), osteonectina (ON) y osteocalcina (OC) en células cADSCs cultivadas sobre discos KeraOs (Kod) con y sin recubrimiento de fibronectina (Kod FN) en medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 de cultivo	189
Figura 92	Experimento de implantación de granulados KeraOs recubiertos con fibronectina (KOFN) con y sin células madre autólogas de tejido adiposo en defectos óseos mandibulares de perros Beagles	190
Figura 93	Estructura de los biomateriales y su influencia sobre adhesión celular, spreading y fuerzas de tensión	206
Figura 94	Procesos celulares que pueden ser influenciados por la matriz extracelular (ECM)	207
Figura 95	Afinidad de las células madre mesenquimales (MSCs) por las proteínas de matriz extracelular (ECM)	208

IV. LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Productos osteoblásticos	43
Tabla 2	Principales moléculas de señalización involucradas en el proceso de reparación del hueso	47
Tabla 3	Resumen de los estudios clínicos realizados en humanos utilizando ingeniería de tejidos	50
Tabla 4	Diametro medio de los poros en biomateriales cerámicos de fosfato de calcio y su efecto biológico	55
Tabla 5	Norma ISO 10993	57
Tabla 6	Criterios mínimos establecidos por la “International Society for Cellular Therapy” para la identificación de las células mesenquimales (MSCs)	61
Tabla 7	Soluciones Tampón	87
Tabla 8	Medios de cultivo comerciales	87
Tabla 9	Suplementos de medios de cultivo	88
Tabla 10	Enzimas	88
Tabla 11	Medios de cultivo celular	89
Tabla 12	Proteínas empleadas para el recubrimiento de superficies	89
Tabla 13	Kits	90
Tabla 14	Otros reactivos	91
Tabla 15	Características de los donantes de muestras de lipoaspirados humanos	98
Tabla 16	Anticuerpos utilizados para caracterización de hADSCs y cADSCs mediante citometría de flujo	101
Tabla 17	Biomateriales utilizados en el estudio	104
Tabla 18	Densidad de siembra de células HDF, hADSCs y cADSCs en discos KeraOs (KOd).	106
Tabla 19	Proteínas y concentraciones probadas para el recubrimiento de discos KeraOs (KOd).	108
Tabla 20	Proteína de matriz extracelular (ECM) utilizada para el recubrimiento de granulados KeraOs® (KO)	109
Tabla 21	Densidad de siembra de fibroblastos dérmicos (HDF), células madre de tejido adiposo humanas (hADSCs) y células madre de tejido adiposo canino (cADSCs) sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO)	110
Tabla 22	Anticuerpos empleados para la técnica de inmunofluorescencia	117
Tabla 23	Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real	124
Tabla 24	Tasa de variación de la expresión de células MC3T3, hFOB 1.19, hADSCs y cADSCs cultivadas bajo condiciones de diferenciación osteogénica (OM) respecto a las cultivadas bajo condiciones de proliferación (PM)	143
Tabla 25	Porcentaje de adhesión de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN)	154
Tabla 26	Porcentaje de adhesión de células hADSCs sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO).	161
Tabla 27	Porcentaje de adhesión de células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL)	166

Tabla 28	. Índice de expresión de los genes evaluados en el qPCR- Array de las células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo	171
Tabla 29	Perfil de expresión de antígenos de superficie de las células madre de tejido adiposo humano (hADSCs) obtenidos por varios grupos de investigación	195

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ingeniería de tejidos y los cultivos tridimensionales *in vitro*

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario que aplica principios de la ingeniería y ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que mantengan, mejoren o restauren un tejido dañado o la función del órgano entero ¹. Implica el desarrollo y aplicación de tecnologías biomédicas que combinan el uso de biomateriales, células y factores de crecimiento con la finalidad de crear un material de implante bioartificial que induzca la restauración de la estructura y la función del tejido dañado ². Esta disciplina científica surge como consecuencia de la necesidad de proporcionar equivalentes funcionales de tejidos nativos que puedan ser implantados. Con el incremento de las expectativas de vida y el envejecimiento de la población, esta necesidad continúa creciendo año tras año. Con fines en la aplicación clínica, la ingeniería de tejidos propone de modo general el siguiente procedimiento:

- a) Aislamiento y expansión de células *in vitro*. Preferiblemente células madre autólogas.
- b) Cultivo de las células sobre biomateriales adecuados que actúan como matriz de soporte. El empleo de biomateriales bien solos o en combinación con otros factores (por ejemplo proteínas de matriz extracelular), simula la matriz extracelular del tejido de interés y permiten un control del microambiente celular. Además, en el caso de implantación, permiten posicionar las células en la región que se pretende regenerar.
- c) Incorporación de factores tróficos u otros tipos celulares que favorezcan la regeneración y el proceso de angiogénesis.
- d) Implantación del sustituto biológico construido en el paciente con la finalidad de facilitar la regeneración del tejido (ver Figura 1).

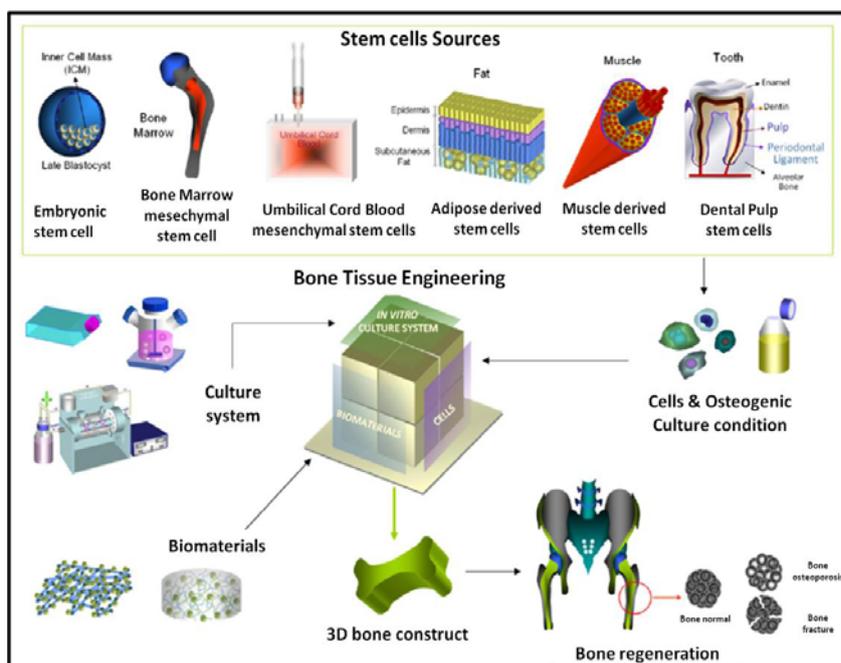


Figura 1. Imagen representativa del procedimiento aplicado en la ingeniería de tejidos para la regeneración de tejidos dañados. La figura ilustra las diferentes fuentes de células madre de tejidos adultos y un ejemplo en la regeneración de tejido óseo. Obtenido de Seong y col. ³

Tomando en cuenta esta información, resulta evidente que el éxito en la aplicación de estos procedimientos depende en gran medida de la comprensión de la biología de las células madre, el desarrollo de biomateriales adecuados, y la elucidación respuesta tras la interacción célula-biomaterial. En el campo de la ingeniería de tejidos se han desarrollado otras aplicaciones en las cuales se emplean los cultivos tridimensionales como modelos *in vitro* para evaluar: a) el comportamiento de células madre en ambientes tridimensionales ⁴, b) el estudio de procesos fisiológicos o enfermedades ^{5,6} c) El mecanismo de acción o toxicidad de productos farmacéuticos, cosméticos y alimentarios ^{7,8} d) la biocompatibilidad y la respuesta de un tipo celular de interés (por ejemplo células madre mesenquimales adultas) frente nuevos biomateriales ⁹⁻¹¹.

Independientemente de su aplicación, la construcción de un cultivo tridimensional *in vitro* requiere la previa caracterización del entorno microambiental del tejido nativo. De esta manera, se identifican las principales señales *in vivo* que guían los procesos de proliferación, diferenciación y funcionalización de dicho tejido. En un organismo vivo, las células están rodeadas por otras células y embebidas en una matriz extracelular (ECM) que define la arquitectura, la señalización, y la biomecánica de la microambiente celular. Adicionalmente existe un suministro de nutrientes y metabolitos mediante de una red de capilares sanguíneos. De manera que todos los procesos celulares están mediados por una variedad de señales moleculares, químicas, estructurales, mecánicas y eléctricas combinadas en un contexto espacio-temporal ¹². La Figura 2 muestra los principales aspectos que influyen en el comportamiento celular en función del microambiente.

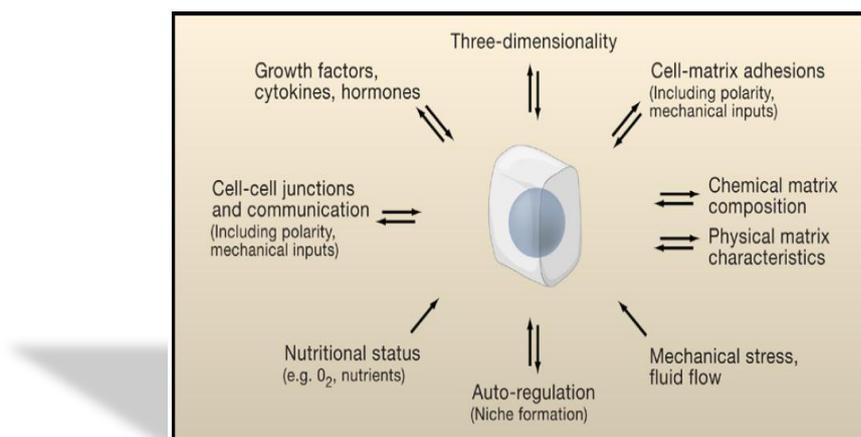


Figura 2. Factores microambientales que afectan el comportamiento celular. Obtenido de Yamada y col. ¹³

La complejidad del contexto de las células en el tejido nativo, no puede mimetizarse en el laboratorio bajo condiciones de un cultivo celular bidimensional (2D), pues las interacciones célula-célula y célula-

matriz varían significativamente en este contexto ¹³. Hasta hace algunos años, ésta fue la mayor limitación en el estudio de las respuestas celulares *in vitro*. En respuesta a esta problemática numerosas técnicas de cultivo tridimensional han sido desarrollados en los últimos años ^{14,15}, lo que ha permitido la creación de un microambiente celular en el laboratorio más parecido al que se encuentra en los organismos vivos. Asimismo, se han publicado numerosas investigaciones realizando comparaciones sistemáticas en la respuesta celular entre cultivos 2D y 3D, creándose inclusive portales especializados que exponen y resumen toda la información descrita en trabajos científicos publicados ¹⁶.

La complejidad de los sistemas de 3D se hace evidente con un número de parámetros a tener en cuenta. Los criterios más importantes son la elección del biomaterial, el origen de las células y los métodos de cultivo aplicados. Dichos parámetros varían considerablemente en la práctica en función al tejido de estudio.

1.2. El hueso y la Ingeniería de tejidos del hueso

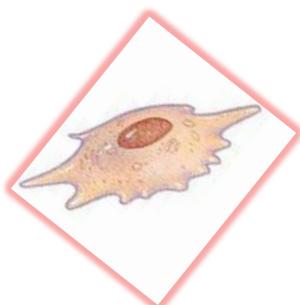
1.2.1. Estructura del hueso: Células y matriz extracelular ósea

El hueso es un órgano complejo constituido fundamentalmente por tejido óseo, aunque funciona de manera concertada con otros tejidos tales como el cartilaginoso, adiposo, nervioso y sanguíneo. Los huesos forman parte del sistema esquelético y constituyen el marco estructural del cuerpo. Sus principales funciones son la protección de los órganos internos, la proporción de puntos de inserción para músculos y tendones que participan en el movimiento corporal, y el almacenamiento y homeostasis de iones tales como calcio y fósforo. Adicionalmente en su interior se encuentra tanto la médula ósea roja (donde se originan todas las células sanguíneas), como la médula ósea amarilla.

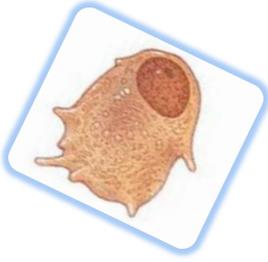
El tejido óseo es un tejido conectivo especializado altamente vascularizado y presenta una ECM mineralizada que ocupa un mayor volumen que las células residentes. El hueso se forma a partir de una serie de eventos rigurosamente orquestados por los diferentes tipos celulares que interactúan entre sí y con la ECM.

La matriz ósea está compuesta por una fase inorgánica (biom minerales) y una orgánica (biopolímeros). La fase biomineral o inorgánica, está formada por fosfatos de calcio complejos $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ similares a la hidroxiapatita, y en menor medida contiene otros elementos como carbonato (CO_3), magnesio (Mg), sodio (Na) y fluoruro (HF). La fase orgánica o biopolímeros está constituida de proteínas de matriz extracelular, siendo la proteína más abundante el Colágeno tipo I (COL). En menor medida se encuentra ácido hialurónico y otras Glucoproteínas (trombospondinas, condroitinsulfato y queratansulfato), Glucosaminoglucanos (osteocalcina, osteonectina y osteopontina) y sialoproteínas del hueso (BSP), que tienen gran relevancia en la constitución de la matriz y la fijación de los iones Ca^{+2} para la formación de la fase inorgánica¹⁷.

La síntesis de la matriz y su alto grado de organización es función de las células que constituyen el hueso, las cuales se describen brevemente a continuación:



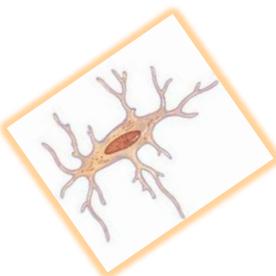
- **Células Osteoprogenitoras:** células madre indiferenciadas de origen mesenquimal que dan origen a los osteoblastos mediante el proceso de osteogénesis (ver sección 1.3 y 1.4).



- **Osteoblastos:** son células originadas a partir de células osteoprogenitoras. Son responsables de la secreción de los componentes orgánicos (ver Tabla 1) y de la premineralización de la matriz. Además de la secreción de proteínas de ECM, sintetizan la enzima fosfatasa alcalina (ALP), y expresan marcadores genéticos tales como factores de transcripción (Runx2, Osterix y Dlx5) así como proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), involucradas en los procesos de diferenciación celular (ver sección 1.4). La ECM premineralizada secretada por los osteoblastos (osteoides), proporciona un microambiente que favorece la mineralización, pues altas concentraciones de estas proteínas, inducen un incremento de la actividad fosfatasa de la enzima ALP, induciendo un incremento en los niveles de fosfato. Por su parte, la osteocalcina fija iones calcio e incrementa la concentración local de este ión^{18,19}. Así pues, los osteoblastos pueden considerarse las células responsables de la síntesis de la matriz ósea y del mantenimiento de su integridad.

Colágeno Tipo I (COL)
Colágeno tipo V (COL 5)
Osteocalcina (OC)
Osteonectina (ON)
Osteopontina (OP)
Fibronectina (FN)
Proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs)
Ácido hialurónico
Condroitinsulfato
Queratansulfato
Enzima fosfatasa alcalina (ALP)
Factores de transcripción (runx 2, Dlx5, Osterix, etc)

Tabla 1. Productos osteoblásticos. Principales proteínas, enzimas y factores de crecimiento producidos por los osteoblastos. Obtenido de Jayakumar y col.¹⁸



- **Osteocitos:** son células derivadas de los osteoblastos, que quedan atrapadas en la ECM mineralizada que han secretado. El 90 % de las células que constituyen el hueso maduro son osteocitos, y aunque son metabólicamente son poco activos, tienen una función importante en el control extracelular de calcio y fosfato. Tienen una elevada relación núcleo/citoplasma y presentan múltiples extensiones citoplasmáticas similares a dendritas que se proyectan a través de los canaliculos, formando una red celular compleja que conecta a las células adyacentes. Además tienen una función de mecanosensores y se comunican de forma paracrina con osteoblastos y células progenitoras^{19,20}.



- **Osteoclastos:** son células multinucleadas gigantes cuyo origen deriva de las células hematopoyéticas, específicamente del linaje de macrófagos. Participan en el proceso de remodelación ósea mediante la liberación de hidrolasas ácidas y protones que inducen la desmineralización de la matriz a través del incremento de la solubilidad de los cristales de

apatita y la destrucción de la fase orgánica.

Para comprender la macroestructura del hueso, se utiliza por lo general el hueso largo como modelo (por ejemplo el fémur), pues permite la visualización óptima de todas las partes de un hueso. Un hueso largo tiene dos partes: la diáfisis y la epífisis. La diáfisis es el eje tubular que se extiende entre los extremos proximal y distal del hueso. La cavidad central localizada en la diáfisis, se denomina la cavidad medular, y es donde se localiza la médula (ver Figura 3A). La cavidad medular, tiene un revestimiento membranoso denominado endostio y corresponde a la zona donde se produce tanto el crecimiento, como la reparación y remodelación del hueso (con presencia de células osteoprogenitoras y osteoblastos). Por otra parte, la superficie exterior del hueso está delimitada por una membrana fibrosa llamada el periostio, la cual contiene además de células osteoprogenitoras y osteoblastos, vasos sanguíneos, nervios, y vasos linfáticos que nutren al hueso. También se unen a esta zona los tendones y ligamentos. El periostio, cubre toda la superficie exterior, excepto en la zona de la epífisis que se une a otros huesos (articulaciones), y que están cubiertas con cartílago articular.

Existen dos tipos de tejido óseo, el esponjoso y el compacto. La diferencia entre ambos es su organización microestructural. El hueso esponjoso es más ligero y frágil que el compacto, y se localiza en las zonas epifisarias del hueso. Las células están organizadas en láminas intersticiales que forman una gran red de trabéculas con numerosas cavidades interconectadas. En algunos huesos, estos espacios intertrabeculares alojan a la médula ósea roja (ver Figura 3 B).

El tejido óseo compacto, es el más denso y fuerte, localizándose bajo el periostio y en las diáfisis de los huesos largos, donde aporta apoyo y protección. La unidad estructural microscópica del hueso compacto es la osteona, también denominado sistema de Havers. Cada osteona se compone de láminas concéntricas de matriz calcificada llamadas lamelas. En el centro de cada osteona, se localiza el canal central o canal de Havers que contiene vasos sanguíneos, nervios, y vasos linfáticos. Las ramificaciones de estos vasos y nervios se denominan canales de Volkmann y se extienden hacia el periostio y endostio. En la frontera de laminillas adyacentes se localizan los osteocitos embebidos en lagunas y que se comunican entre sí mediante sus largas extensiones citoplasmáticas a través de los canales de Volkmann y finalmente hasta el canal central (ver Figura 3 C).

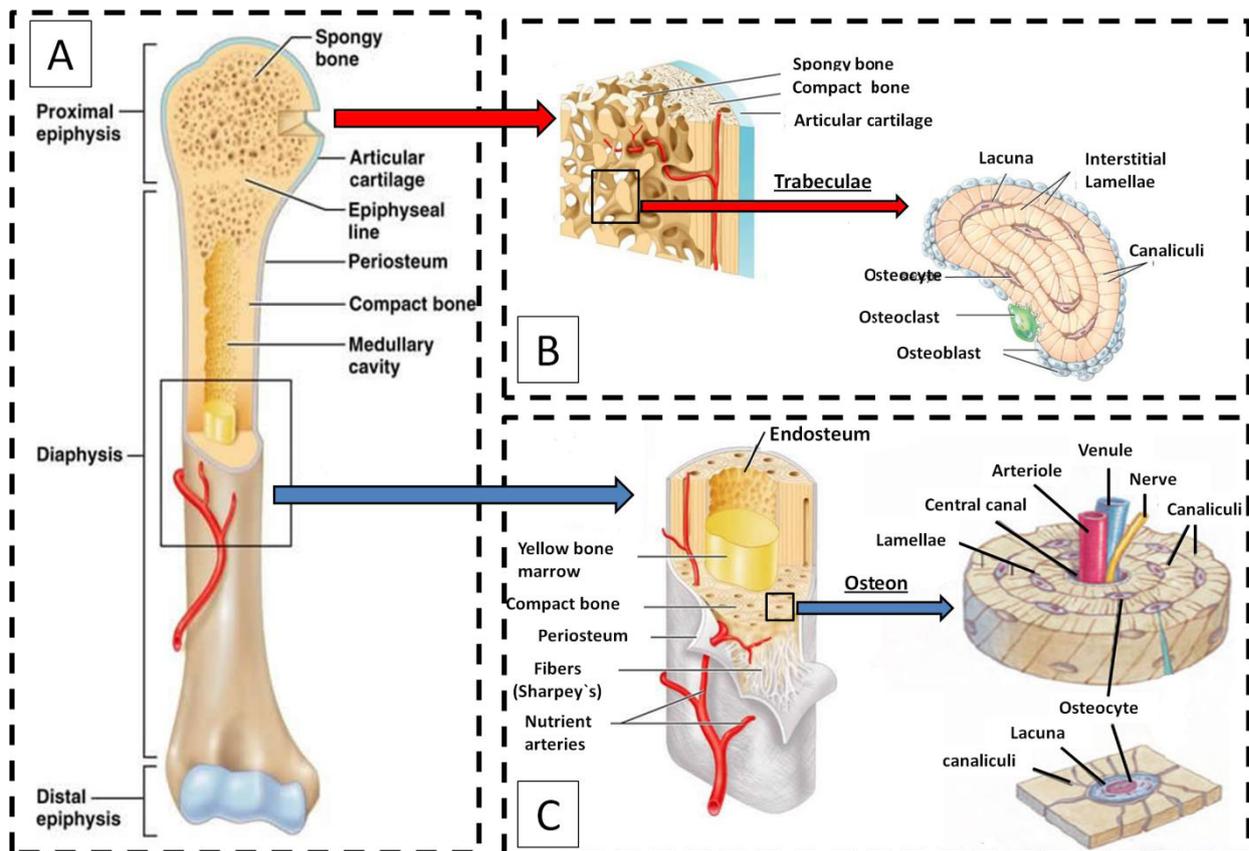


Figura 3. Organización histológica del hueso. A) Macroestructura del hueso. Esquema representativo de la anatomía de un hueso largo donde se distingue la diáfisis (zona central alargada) y la epífisis (extremos). B) Estructura del hueso esponjoso. Se representan las trabéculas y la organización de los diferentes tipos celulares (osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) en placas lamelares. C) Estructura del hueso compacto. Detalle de la osteona, donde se observan las lamelas concéntricas alrededor del canal central donde se localizan los vasos sanguíneos y el nervio. Además de detalla un osteocito dentro de la laguna y los canaliculos. Modificado de <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap06/lecture1.html>

1.2.2. Remodelación, daño y reparación del tejido óseo

El hueso tiene una estructura altamente dinámica, en la cual hay un proceso constante de renovación del tejido óseo. Dicho proceso se denomina “ciclo de la remodelación ósea”, e implica la resorción (degradación) de tejidos viejos o dañados (función que realizan los osteoclastos) y la formación de nuevo tejido óseo (función realizada por los osteoblastos). Es un proceso altamente regulado que determina la densidad ósea y en el que intervienen un conjunto de hormonas, vitaminas y factores de crecimiento que controlan el equilibrio del proceso. En individuos de edades avanzadas (mayores de 60 años), los procesos de remodelación ósea tienden a desequilibrarse debido a cambios hormonales y una reducción del número de células madre osteoprogenitoras (1/10.000 células madre en recién nacidos decae a 1/2.000.000 cel en edades avanzadas)²¹. Por lo tanto ocurre una disminución de la masa ósea que conlleva a una mayor fragilidad de los huesos y un incremento del riesgo de fracturas.

El hueso tiene una elevada capacidad de autoregeneración tras una fractura, siempre y cuando la pérdida del tejido óseo no supere cierto tamaño. Sin embargo, la gravedad de las fracturas es variable y cuando las roturas superan un tamaño crítico, el tiempo de reparación puede ser muy largo o simplemente no ocurrir produciéndose las denominadas fracturas no consolidadas.

El proceso de reparación del hueso, es similar al de cualquier tejido. Se inicia con la formación de un coágulo sanguíneo en el lugar de la herida generando una respuesta inflamatoria que implica la secreción de moléculas proinflamatorias y la migración de neutrófilos y macrófagos hacia la zona de la lesión. A continuación los vasos sanguíneos (específicamente capilares) y fibroblastos invaden la zona formando un tejido fibroso, el cual está constituido por grandes cantidades de Colágeno secretado por los fibroblastos. El tejido fibroso da origen a pequeños núcleos de tejido cartilaginoso, los cuales proliferan y cubren toda la zona afectada formando un callo fibrocartilaginoso. Paralelamente, las células madre mesenquimales localizadas en el endostio y periostio son activadas por diversas señales e inician procesos de diferenciación osteogénica y la formación de nuevo hueso alrededor del callo. A continuación el nuevo tejido óseo invade el callo fibrocartilaginoso y tras la mineralización de la matriz se transforma en un callo óseo (osificación endocondral). Finalmente y mediante procesos de remodelación ósea, se restablece la estructura y función del hueso (ver Figura 4) ²²⁻²⁴. Las principales moléculas de señalización involucradas en el proceso de reparación ósea se indican en la Tabla 2.

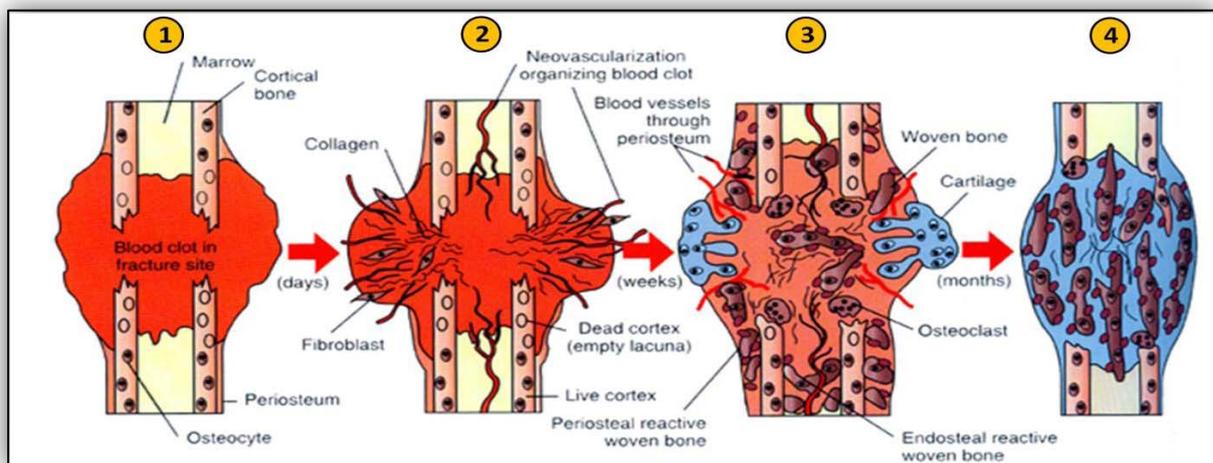


Figura 4. Proceso de reparación de un hueso fracturado. 1) Formación del coágulo sanguíneo. **2)** Invasión de vasos sanguíneos y fibroblastos, formación del callo fibrocartilaginoso. **3)** Formación del callo óseo. **4)** Remodelación ósea.

Cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α)

Source: macrophages and other inflammatory cells, cells of mesenchymal origin
Chemotactic effect on other inflammatory cells, stimulation of extracellular matrix synthesis, angiogenesis, recruitment of endogenous fibrogenic cells to the injury site, and at later stages bone resorption
Increased levels from days 1 to 3 and during bone remodelling

Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)

Source: degranulating platelets, inflammatory cells, endothelium, extracellular matrix, chondrocytes, osteoblasts
Targeted cells: MSCs, osteoprogenitor cells, osteoblasts, chondrocytes
Potent mitogenic and chemotactic for bone forming cells, chemotactic for macrophages
Expressed from very early stages throughout fracture healing

Platelet-derived Growth Factor PDGF

Source: degranulating platelets, macrophages, monocytes (during the granulation stage) and endothelial cells, osteoblasts (at later stages)
Targeted cells: mesenchymal and inflammatory cells, osteoblasts
Mitogenic for mesenchymal cells and osteoblasts, chemotactic for inflammatory and mesenchymal cells
Released at very early stages of fracture healing

Bone morphogenetic proteins (BMPs)

Source: osteoprogenitor and mesenchymal cells, osteoblasts, bone extracellular matrix and chondrocytes
Targeted cells: mesenchymal and osteoprogenitor cells, osteoblasts
Differentiation of undifferentiated mesenchymal cells into chondrocytes and osteoblasts and osteoprogenitors into osteoblasts
Various temporal expression patterns

Fibroblast Growth Factor (FGFs)

Source: monocytes, macrophages, mesenchymal cells, osteoblasts, chondrocytes
Targeted cells: mesenchymal and epithelial cells, osteoblasts and chondrocytes
Angiogenic and mitogenic for mesenchymal and epithelial cells, osteoblasts, chondrocytes
 α -FGF mainly effects chondrocyte proliferation, β -FGF (more potent) involved in chondrocytes maturation and bone resorption
Expressed from the early stages until osteoblasts formation

Insulin Growth Factor (IGFs)

Source: bone matrix, endothelial and mesenchymal cells (in granulation stage) and osteoblasts and non-hyperthrophic chondrocytes (in bone and cartilage formation)
Targeted cells: MSCs, endothelial cells, osteoblasts, chondrocytes
IGF-I: mesenchymal and osteoprogenitor cells recruitment and proliferation, expressed throughout fracture healing
IGF-II: cell proliferation and protein synthesis during endochondral ossification

Metalloproteinases (MMPs)

Source: the extracellular matrix
Degradation of the cartilage and bone allowing the invasion of blood vessels during the final stages of endochondral ossification and bone remodelling

VEGFs

Potent stimulators of endothelial cell proliferation
Expressed during endochondral formation and bone formation

Angiopoietin (1 and 2)

Formation of larger vessel structures, development of co-lateral branches from existing vessels
Expressed from the early stages throughout fracture healing

Tabla 2. Principales moléculas de señalización involucradas en el proceso de reparación del hueso. Se indican las fuentes, células blanco y sus principales funciones. Obtenido de Dimitriou y col.²²

Debido a la complejidad del tejido óseo y la relevante función que tiene en el organismo, cualquier desequilibrio en este órgano tiene un impacto importante sobre el individuo. Cambios hormonales severos (por ejemplo en la menopausia), enfermedades como la osteoporosis, tumores óseos o pérdidas

de piezas óseas grandes por traumatismos, pueden superar los mecanismos propios de reparación y formación de nuevo hueso requiriendo intervenciones quirúrgicas de gran envergadura.

Los desórdenes músculoesqueléticos son la causa más común de dolor severo y discapacidad física a largo plazo en todo el mundo. Afectan de manera significativa el estado psicosocial de individuos que padecen la afección y a sus familiares ^{25,26}. Se ha determinado que este tipo de desórdenes representa una carga importante para el sistema sanitario del país, debido a que el 20 % del presupuesto sanitario se utiliza en tratamientos de grandes lesiones óseas. En Europa, de 20 a 30 % de los adultos se ven afectados por enfermedades musculoesquelético ^{27,28}. Por ejemplo, la osteoartritis es una de las diez principales causas de discapacidad en los países de la UE, mientras que el dolor de espalda es la principal causa de incapacidad laboral. Asimismo, los trastornos musculoesqueléticos son la causa más común de problemas de salud que limitan el trabajo, encontrándose que el 60 % de las personas solicitan la jubilación anticipada por esta causa ²⁵. La sustitución o regeneración de grandes cantidades de hueso sigue siendo hoy día uno de los principales retos clínicos, y la ingeniería de tejidos emerge como una de las estrategias más prometedoras.

1.2.3. Ingeniería de tejidos del hueso

Hasta hace algunos años, los tratamientos quirúrgicos reconstructivos del tejido óseo se basaban en la utilización de homotrasplantes (injerto procedente de otro organismo de la misma especie) o xenotrasplantes (injerto procedente de otras especies). Existen varias limitaciones asociadas a estos tratamientos tales como el limitado número de donantes, el coste y tiempo de ambas cirugías, el dolor asociado al donante, la limitación del tamaño de hueso que puede ser obtenido, y la respuesta inmunológica adversa. Ésta última representa una problemática adicional no deseada que puede comprometer la salud del paciente. Por otra parte en el caso de los xenotrasplantes, además de la reacción inmunológica adversa hay que añadir el alto riesgo asociado a la transmisión de enfermedades al individuo receptor ^{29,30}. Estas razones explican el hecho de que el porcentaje de éxito de este tipo de cirugías sea menor al deseado.

La problemática descrita, impulsó la demanda clínica de materiales de origen sintético que no desencadenen una respuesta inmunitaria y que además sean adaptables y manipulables para el uso en implantes óseos. En este sentido, se fabrican materiales de base metálica, cerámicos, poliméricos y combinaciones de dos o más tipos. Aunque éstos materiales inducen una reacción adversa inferior, su

capacidad de inducción y generación de nuevo hueso es menor que la producida por los implantes naturales^{31,32}.

Con la finalidad de mejorar el efecto inductor de los materiales, investigadores cuya línea de trabajo está centrada en ingeniería de tejidos, han desarrollado estrategias que permiten cultivar células de mamífero utilizando como matriz ciertos biomateriales sintéticos. El principal objetivo es crear un material de implante "bioartificial" que induzca la restauración de la estructura y función del tejido dañado³³. Particularmente, el uso de células autólogas para crear el tejido *in vitro* utilizando el biomaterial como sustrato, es una solución adecuada para evitar el rechazo inmunológico al injerto mencionado en párrafos anteriores (ver Figura 5). A pesar de que estas técnicas han sido utilizadas de manera exitosa, por ejemplo en injertos de piel³⁴, es una estrategia que presenta grandes dificultades logísticas, prácticas, que en muchos casos es invasiva, y que requiere grandes inversiones de dinero. Otro enfoque, es el uso del biomaterial en conjunto con factores de crecimiento, por ejemplo la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), que son capaces de inducir el proceso de osteogénesis en las células progenitoras residentes. Sin embargo, este tipo de procedimientos se ha asociado con la formación de hueso aberrantes³⁵, neurotoxicidad³⁶, el desarrollo del cáncer³⁷.

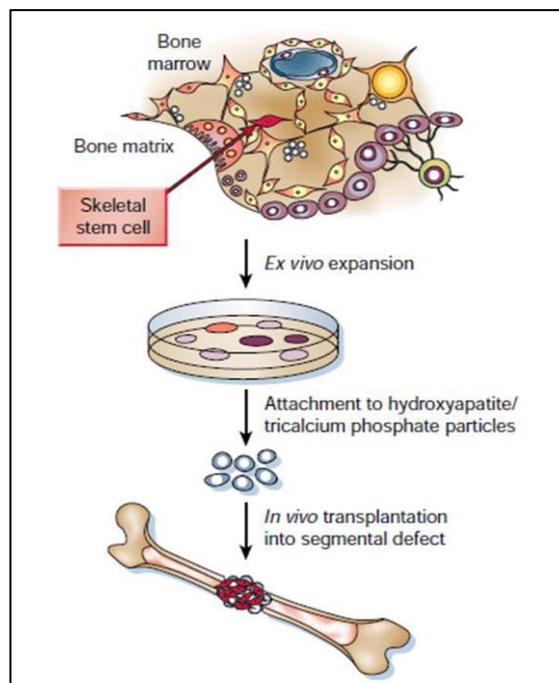


Figura 5. Ingeniería de tejidos del hueso. Construcción de implante bioartificial biomaterial-células mesenquimales autólogas *in vitro*, e implantación en defecto óseo. Obtenido y modificado de Bianco y col.³⁸

Las dificultades técnicas y los problemas descritos, se reflejan en el limitado número de ensayos clínicos en los que se han tratado defectos óseos empleando biomateriales combinados con células³⁹ (ver Tabla

3). Sin embargo, existen numerosos estudios preclínicos con diversos modelos animales que han producido resultados prometedores ⁴⁰. En este sentido, los investigadores de este campo siguen trabajando en la optimización del proceso de aislamiento y expansión de las células, el diseño de nuevos materiales y la optimización del proceso de construcción de implantes bioartificiales (material-células).

Principal investigator	Year	Cell source	Scaffold	Patients	Area of reconstruction	Salient features	Evaluation	Reported outcome
R.Quarto	2001	Bone marrow	100% hydroxyapatite	3	Long bone defects (1 tibia, 1 ulna, 1 humerus)	(1) First clinical trial in humans using hMSCs (2) Patients with long bone defects selected (3) Patients had good clinical recovery (3) No side effects even after 6-7 years followup	Radiology CT scan Angiography	No quantification of new bone formed. Good integration of the host bone with the implanted scaffolds
H. Hibi	2006	Bone marrow	Platelet gel	1	Alveolar cleft defect	(1) First study using platelet gel as the scaffolding material	Serial Ct scans	Comparable bone formation to that described in literature with autologous bone grafts
Y.Soleymani	2007	Bone marrow	HA/TCP	6	Maxillary sinus augmentation	(1) Good bone formation in all scaffolds (2) Mean amount of new bone regenerated was 41.3% (3) When compared to the Vacnati study, stark difference in the amount fo bone formed, probably due to location of defect or cell source	Radiology Biopsy	Reported successful with mean bone regenerate as 41.34% and good osseointegration
H.Krecic-Stres	2007	Bone marrow	Porous calcium triphosphate granules	1	Femoral defect	(1) autologous bone graft was mixed with TECs made with MSCs and scaffolds in ratio of 1 : 2 to fill the defect	Radiology	Good clinical recovery. No bone quantification performed
Gert Meijer	2008	Bone marrow	Hydroxyapatite scaffolds	6	Intraoral osseous defects	(1) Only study which performed a biopsy to not just to quantify the amount of bone formed but also the location of bone on the scaffold. This helped identify if the bone was formed due to osteoconduction alone or as a result of osteo conduction with de novo bone sytnthesis. (2) Demonstrated the donor donor variation with hMSCs	Radiology Biopsy	5 patients had no new bone
K. Mesimaki	2009	Adipose tissue	β -TCP	1	Maxillary reconstruction	(1) First clinical study to use autologous MSCs derived from adipose tissue and expanded employing good manufacturing protocols (GMP) to heal a bone defect. (2) Use of rhBMP-2 to promote bone formation <i>in vivo</i> . (3) Use of a microvascular flap reconstruction surgery for bone tissue engineering	Radiology biopsy	8-month followup indicated presence of mature bone. No quantification of the amount of bone formed is provided. Good clinical course
Jun Lee	2010	Bone marrow	Freeze dried Autologous cancellous bone	1	Mandible reconstruction	(1) Repair of a large segmental defect (15 cm) (2) Injection of MSCs with fibrin glue into the defect site. (3) Use of autologous cancellous freeze dried bone as a tray to hold the MSCs in place.	Biopsy radiology	New bone formation after 4 months. No quantification provided. Goo clinical recovery

Tabla 3. Resumen de los estudios clínicos realizados en humanos utilizando ingeniería de tejidos. Obtenido de Chatterjea y col ³⁹.

1.2.3.1. Biomateriales en la reconstrucción de tejido óseo

Los biomateriales se definen como sustitutos biológicos que mantienen, mejoran o restauran la función de órganos y tejidos dañados. La demanda clínica de materiales empleados en la regeneración o sustitución de hueso, se ha incrementado significativamente en la última década. La razón principal se basa en que, a diferencia de los implantes naturales (homotransplantes y xenotransplantes), los biomateriales inducen una menor respuesta inmunológica adversa, son más adaptables y manipulables^{31,32}. El diseño de biomateriales específicos para la regeneración de hueso está orientado a la simulación de las condiciones microambientales del tejido óseo, con la finalidad de generar una respuesta celular deseada tanto *in vitro* como *in vivo*. En este sentido se afirma que el biomaterial ha de funcionar como una ECM sintética temporal que soporte la adhesión, proliferación, diferenciación y la estructuración del nuevo tejido⁴¹. Surgen así cuatro conceptos que definen las características claves que ha de tener un biomaterial diseñado para la ingeniería de tejidos del hueso:

- Biocompatibilidad: es la capacidad del material para inducir las respuestas celulares y funcionales deseadas⁴² (ver sección 1.2.4).
- Osteoinductividad: capacidad del material de inducir la diferenciación de células progenitoras hacia linaje osteogénico, en ausencia de factores osteogénicos externos⁴³.
- Osteoconductividad: capacidad del material para funcionar como soporte y guiar la formación de nuevo hueso⁴³.
- Osteointegración: capacidad del material de integrarse al hueso circundante, al ser implantado en una herida.

Las cuatro características mencionadas, dependen principalmente de las propiedades físico-químicas de los materiales. En función de su composición química, se pueden mencionar cuatro grupos de materiales empleados para la ingeniería de tejidos del hueso: metálicos, cerámicos, poliméricos (naturales o sintéticos) y compuestos (combinación de dos o más tipos). En la Figura 6 se muestran ejemplos de los biomateriales más comunes dentro de cada grupo.

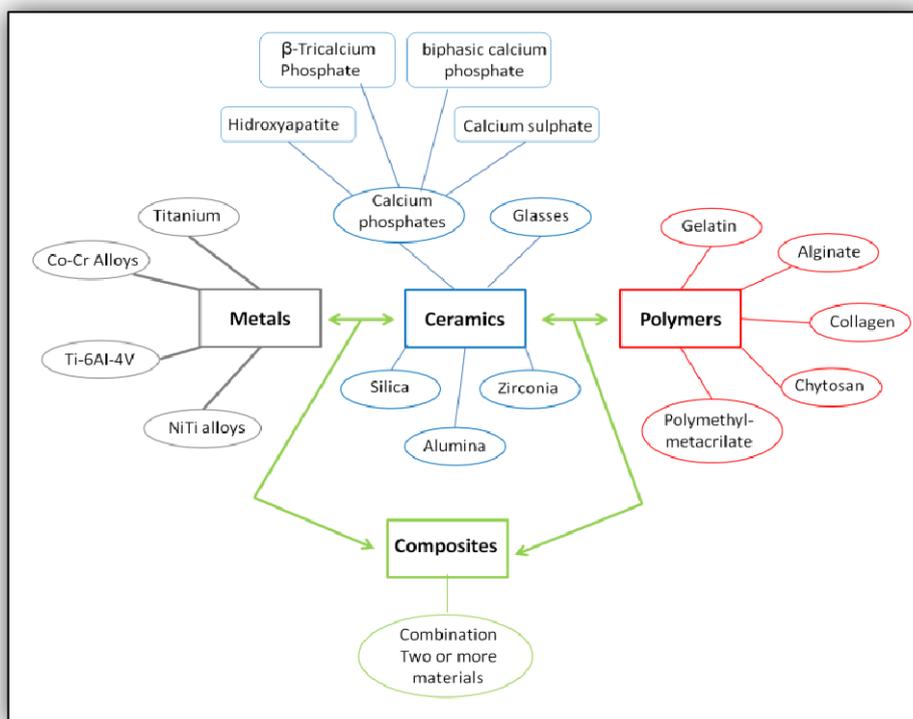


Figura 6. Tipos de biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos del hueso en función de su composición química. Obtenido de Neuman y col.³²

Los primeros materiales utilizados se desarrollaron en el período 1960-1970, y eran de base metálica, principalmente de titanio. Su principal aplicación era la sustitución estructural del hueso sin causar efectos tóxicos⁴⁴. Sin embargo, su baja bioactividad y la formación de tejidos fibrosos que encapsulaban el implante dificultaban la regeneración del hueso suponiendo un problema importante⁴⁵. A partir de los años 80, se han venido desarrollando y comercializando materiales cerámicos (fosfatos de calcio, vidrios cerámicos, entre otros), poliméricos y compuestos. El uso de estos ha demostrado ser más exitoso en la inducción de respuestas biológicas apropiadas^{46,47}.

Los materiales cerámicos se consideran uno de los grupos de biomateriales más prometedores en esta aplicación. En general se definen como materiales inorgánicos que tienen una combinación de iones unidos de forma covalente. Se caracterizan por ser bioactivos, reabsorbibles, tienen gran resistencia a la compresión, baja tracción, alta superficie de tensión, alto grado de humectación, resistencia al desgaste, alta rigidez y resistencia a la oxidación⁴⁸. Dichas características hacen que sean excelentes candidatos para su aplicación como implantes óseos. Numerosos productos cerámicos están disponibles comercialmente desde hace algunos años. La Figura 7 recoge algunos ejemplos. A pesar de ello, se sigue trabajando en el diseño y creación de implantes “ideales” que presenten características óptimas para la regeneración del tejido óseo.

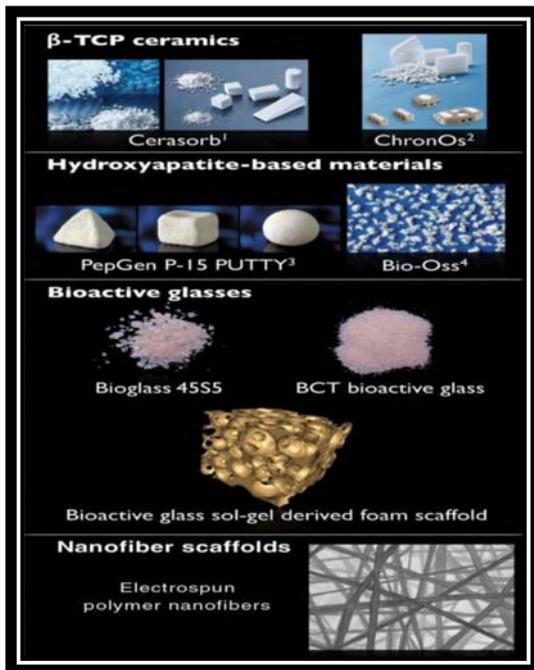


Figura 7. Ejemplos de materiales cerámicos comerciales utilizados como sustitutos óseos. 1) Curasan AG. 2) Synthes. 3) Courtesy of Dentsply Tulsa Dental Specialties. 4) Geistlich. Obtenido de Stevens y col.⁴⁹

1.2.3.2. Materiales Cerámicos de fosfato de calcio

Los materiales cerámicos de fosfato de calcio, son los biomateriales más comúnmente utilizados como sustitutos óseos. Las principales razones son la similitud de su composición química con la del hueso y propiedades fundamentales tales como su alta Osteoconductividad, buena biocompatibilidad y su elevada capacidad de osteointegración. Además algunos tipos de cerámicas de fosfato cálcico pueden ser osteoinductivas^{32,43}. Estas propiedades dependen en gran medida de las características físicas y químicas de estos materiales, por lo que a continuación se describen las más importantes:

1.2.3.2.1. Composición química

Por definición, los fosfatos de calcio son minerales que contienen calcio (Ca^{2+}), junto con ortofosfatos (PO_4^{3-}), metafosfatos o pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) y en ocasiones iones de hidrógeno o hidroxilo⁵⁰. Existen numerosos tipos de cerámicas de fosfatos de calcio en función de su composición química, aunque solo ciertos tipos son útiles para aplicaciones biomédicas. En este sentido, los materiales más comunes son el beta fosfato tricálcico (β -TCP), la hidroxiapatita (HA) y fosfato de calcio bifásico (BCP), siendo este último la combinación de β -TCP y HA⁵¹.

1.2.3.2.2. Estructura

La estructura tridimensional del material es una de las principales características para mimetizar la ECM del hueso. Influye directamente sobre las capacidades osteoinductivas y osteoconductoras del material. A continuación se describen brevemente los aspectos más importantes y su impacto en la respuesta biológica:

- **Tamaño y forma del material:** para aplicaciones *in vivo* depende directamente del tamaño del defecto óseo. Sin embargo, en aplicaciones relacionadas con cultivos tridimensionales *in vitro* (por ejemplo para evaluar la interacción células-biomaterial), el tamaño y forma del material se diseña en función de conveniencia y funcionalidad para facilitar el análisis sistemático a nivel celular y molecular ⁴³. Los biomateriales de fosfato cálcico están disponibles en numerosas formas: polvo, granulados, bloques densos, bloques porosos, formulaciones inyectables, cementos, entre otros (ver Figura 8).



Figura 8. Biomateriales de fosfato de calcio. Ejemplo de diferentes formas disponibles de materiales cerámicos de fosfatos de calcio.

- **Poro-tamaño del poro:** la presencia de poros en los biomateriales son necesarios, porque permiten la migración y proliferación de los osteoblastos y células mesenquimales, así como la vascularización y difusión de nutrientes. El tamaño del poro se puede dividir en macro-poros ($\geq 100 \mu\text{m}$) y microporos ($\leq 10 \mu\text{m}$), siendo ambos parámetros importantes para la biodegradabilidad y Osteoconductoras del material ⁵². En la Tabla 4 se indica el efecto biológico inducido en función del tamaño del poro en un biomaterial.

Pore sizes of a 3D scaffold	A biochemical effect or function
<1 μm	Interaction with proteins Responsible for bioactivity
1–20 μm	Type of cells attracted Cellular development Orientation and directionality of cellular ingrowth
100–1000 μm	Cellular growth Bone ingrowth Predominant function in the mechanical strength
>1000 μm	Implant functionality Implant shape Implant esthetics

Tabla 4. Diametro medio de los poros en biomateriales cerámicos de fosfato de calcio y su efecto biológico. Obtenido de Sánchez-Salcedo y col.⁵³

- **Porosidad:** numerosos estudios han demostrado que una alta porosidad favorece la osteogénesis, pues se incrementa la superficie del material para la deposición de ECM, la adhesión y proliferación celular⁵⁴. Además permite una mayor penetración de las células circundantes del tejido en el implante y por lo tanto incrementa su Osteointegración⁵⁵. Es importante destacar que aunque el aumento de la porosidad y tamaño de poro facilitan el crecimiento del hueso, por el contrario tiene efectos no deseados al reducir las propiedades mecánicas de la estructura, comprometiendo la integridad del andamio⁵².
- **Interconectividad:** determina la geometría del nuevo tejido resultante⁵⁶. La conexión espacial del sistema de poros tiene un efecto decisivo en el crecimiento interno de hueso nuevo, especialmente a largo plazo^{43,57}.

1.2.3.2.3. Propiedades mecánicas

La propiedad más común en la caracterización del comportamiento mecánico de los sustitutos óseos es su resistencia a la compresión. Aunque también se tienen en cuenta la resistencia a la tracción, resistencia a la flexión, elasticidad, dureza, entre otros⁴⁸. Puesto que estos materiales están destinados a ser utilizados como sustitutos de hueso, es importante tener en cuenta que la resistencia a la compresión de las gamas de huesos corticales humanos están entre 90 y 230 MPa (con resistencias a la tracción que van desde 90 hasta 190 MPa), mientras que la resistencia a la compresión de rangos de hueso esponjoso está entre 2 y 45 MPa⁴³.

1.2.3.2.4. Biodegradabilidad

La biodegradabilidad se define como la capacidad de degradación de todos los componentes que forman el material en el sistema donde será implantado. Además de ser biodegradable, los productos de degradación han de ser eliminados por el cuerpo sin generar problemas inmunogénicos o sistémicos. *In vivo*, la degradación puede conseguirse mediante disolución químico-física o mediada por células (enzimática). En el hueso, la población de células responsables son los osteoclastos y los macrófagos ⁵⁸. Idealmente la tasa de degradación ha de ser similar a la de formación de nuevo hueso, ya que debe servir inicialmente como molde durante el proceso de regeneración, pero que con el tiempo ha de desaparecer, quedando únicamente el nuevo tejido. Las cerámicas de fosfato de calcio, tienen una tasa de degradación lenta (parecida a la del hueso) y la velocidad depende directamente de su composición química. La biodegradación del β -TCP es más lenta que la de la HA; mientras que la del BCP depende de la relación HA/TCP. Sus principales productos de degradación son iones calcio e iones fosfato, los cuales tienen un papel importante en el proceso de biomineralización del hueso ⁵⁹. Este es otro de los motivos por los cuales estos materiales cerámicos son candidatos atractivos como sustitutos óseos.

1.2.3.2.5. Estímulos bioquímicos para incrementar la biofuncionalidad

La incorporación de señales bioquímicas a los materiales, tiene como objetivo principal proveer estímulos específicos para incrementar la adhesión celular, proliferación, diferenciación y vascularización ⁵⁶. Particularmente se ha demostrado que el incremento en la adhesión celular al biomaterial se traduce en una regulación de la actividad transcripcional y la expresión génica ⁴⁹. Independientemente de las características físico-químicas de las cerámicas de fosfatos de calcio, se ha demostrado que su combinación con factores de crecimiento solubles (por ejemplo BMPs), proteínas de ECM (por ejemplo Colágeno, fibronectina y osteopontina, entre otros) o pequeños fragmentos peptídicos (por ejemplo Arg-Gly-Asp (RGD)) incrementan la osteogénesis y la formación de nuevo hueso ^{2,9,30,60-62}. Particularmente la modificación de superficies de los materiales cerámicos con proteínas de ECM tiene un gran interés en la ingeniería de tejidos, ya que permite de una forma relativamente sencilla incrementar la bioactividad del material. Además, los resultados obtenidos por algunos investigadores sugieren que la ECM aporta señales de diferenciación celular más potente que un cóctel de factores inductores solubles ⁴.

La ECM de un tejido está formada por muchas macromoléculas tales como proteoglicanos, Colágenos, laminina y fibronectina que a su vez retienen factores de crecimiento que brindan a las células

circundantes un nicho particular. Las secuencias de muchas proteínas de ECM son reconocidas por integrinas, lo que desencadena la activación de cascadas de señalización que regulan el comportamiento y diferenciación celular. Por lo tanto, el recubrimiento de materiales con proteínas de ECM puede ser una estrategia interesante para inducir el comportamiento deseado de las células tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, es una estrategia muy interesante en los materiales cerámicos de fosfato de calcio, teniendo en cuenta que su composición química facilita la adhesión de proteínas¹⁷.

1.2.4 Evaluación de la Biocompatibilidad de materiales

Tal como se mencionó en la sección 1.2.3.1, la biocompatibilidad es la capacidad del material para inducir las respuestas celulares y funcionales deseadas⁴². La evaluación de éste parámetro tiene gran relevancia, pues la determinación de la respuesta celular ante el material permite establecer posibles efectos adversos e instaurar medidas de seguridad del producto antes de ser comercializado. Esto finalmente se traduce en la reducción del riesgo de efectos adversos en el paciente. Los parámetros generales para la evaluación de la biocompatibilidad han sido establecidos por varias organizaciones a nivel mundial tales como la “American Society for Testing and Materials” (ASTM), “American Dental Association” (ADA), “National Institutes of Health” (NIH), “Food and Drug Administration” (FDA), e “International Organization for Standardization” (ISO)⁶³. Esta última, ha publicado la norma ISO 10993 “Biological Evaluation of medical devices”, documento constituido por 17 partes donde se describen una serie de estrategias aceptadas internacionalmente para la evaluación de biomateriales (ver Tabla 5). Las pruebas de biocompatibilidad deben incluir el estudio de la respuesta biológica inducidas por el biomaterial mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*⁶⁴.

Part	Title
1	Evaluation and testing
2	Animal welfare requirements
3	Test for genotoxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity
4	Selection of test for interactions with blood
5	Test for cytotoxicity-In vitro methods
6	Test for local effects after implantation
7	Ethylene oxide sterilization residuals
8	Clinical investigation of medical devices
9	Degradation of materials related to biological testing
10	Test for irritation and sensitization
11	Test for systemic toxicity
12	Sample preparation and reference materials
13	Identification and quantification of degradation products from polymers
14	Identification and quantification of degradation products from ceramics
15	Identification and quantification of degradation products from coated and uncoated metals and alloys
16	Toxicokinetic study design for degradation products and leachables
17	Glutaraldehyde and formaldehyde residues in industrially sterilized medical devices

Tabla 5. Norma ISO 10993. Partes que constituyen la ISO 10993 “Biological Evaluation of medical devices”. Obtenido de Bollen y col.⁶⁴

Particularmente, la realización de pruebas de biocompatibilidad *in vitro* ha adquirido una gran importancia, ya que además de reducir el número de animales empleados en las pruebas, se ha determinado que existe una correlación importante en la determinación de la respuesta celular en cultivos y la posterior respuesta del sistema *in vivo*, quizás con la única excepción de aquellos procesos relacionados con mecanismos complejos, generalmente asociados al sistema inmunológico. Este hecho hace que actualmente la determinación de biocompatibilidad *in vitro* en el estudio de un biomaterial tenga un gran valor en la documentación regulatoria ⁶⁵.

Uno de los puntos claves en el estudio de la biocompatibilidad *in vitro* es la determinación de la citotoxicidad directa e indirecta generada por los biomateriales. En este sentido, la norma ISO 10993-5 describe las pruebas que deben realizarse para determinar la respuesta biológica. Según la norma se han de tomar en cuenta parámetros de punto final o "end points" en las categorías de evaluación de la morfología celular, viabilidad celular, proliferación celular y aspectos del metabolismo celular en presencia del material y/o sus productos de degradación. Estos parámetros deben ser analizados de manera cualitativa y cuantitativa. Otros aspectos que menciona la guía y que se han de tener en cuenta para la evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* son:

- Las condiciones de preparación de los biomateriales antes de ser sometido a las pruebas.
- Las condiciones de preparación de los líquidos de extracción para las pruebas de citotoxicidad indirecta.
- El tipo de cultivos celulares a emplear. Es importante destacar que hacen énfasis en la utilización de líneas primarias.
- Las condiciones del medio de cultivo.
- El número de réplicas necesarias.
- Los procedimientos normalizados de los ensayos de toxicidad, indicando los controles que deben ser utilizados.

Tal como se ha mencionado en párrafos anteriores, se considera que los materiales cerámicos de fosfato de calcio por lo general son biocompatibles. Sin embargo, es importante resaltar que cuando se diseña un nuevo material, es necesaria la realización de todas las pruebas de biocompatibilidad tanto *in vitro* como *in vivo* que dicta la norma ISO 10993-5 antes de su comercialización.

1.3. Células madre mesenquimales adultas: definición y papel en la ingeniería de tejidos

Las células madre mesenquimales (MSCs) son un grupo de células multi-potentes localizadas en órganos y tejidos adultos, tales como la médula ósea, ligamentos, músculos y tejido adiposo, entre otros ⁶⁶. En los tejidos adultos, las MSCs permanecen en un nicho específico (ver Figura 9) siendo su principal función la homeostasis del tejido en el que residen y la regeneración en caso de daño ⁶⁷. La presencia de estas células en el tejido conectivo de diversos órganos ha sido demostrada no solo en humanos, sino en otras especies incluyendo perro, conejo, rata, cerdo y aves, entre otros ⁶⁸⁻⁷².

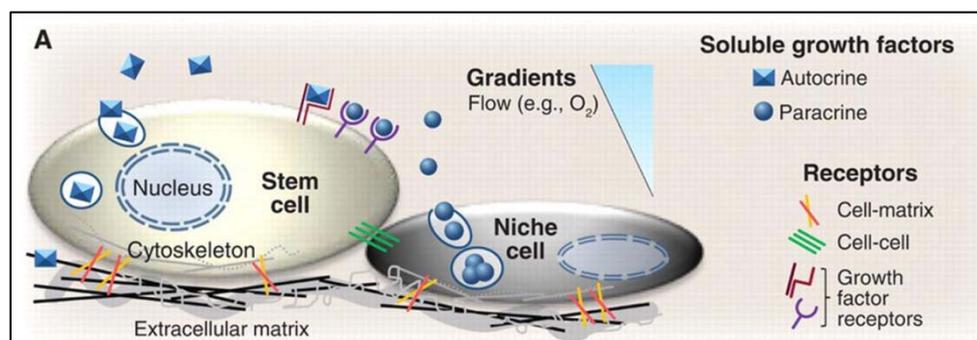


Figura 9. Esquema ilustrativo del nicho de las células madre mesenquimales. El nicho es el microambiente que regula la supervivencia, renovación y diferenciación de las células madre, lo que incluye factores de crecimiento, matriz extracelular, contacto célula-célula y célula-matriz. Obtenido de Discher y col. ⁴

Pueden definirse como células indiferenciadas capaces de dividirse asimétricamente generando como resultado por una parte una célula hija idéntica y por otra parte una célula con la capacidad de transformarse en una célula comprometida hacia un linaje particular ⁷³. Pueden autorenovarse durante varias generaciones sin experimentar senescencia mientras mantienen su capacidad de diferenciarse a múltiples linajes tales como hueso, cartílago, músculo y tejido adiposo ⁷⁴ (ver Figura 10). A pesar de que inicialmente se pensaba que se diferenciaban únicamente a linajes provenientes del mesodermo (hueso, cartílago y tejido adiposo), investigaciones posteriores han demostrado que también pueden diferenciarse a células de linajes ectodérmico y endodérmico ^{75,76} (ver Figura 11). De esta manera las células MSCs pueden generar células de las tres capas germinales y por lo tanto podrían ser consideradas pluripotentes. A pesar de ello al existir algunos resultados controvertidos en el tema, la pluripotencialidad de estas células sigue siendo hoy día tema de debate.

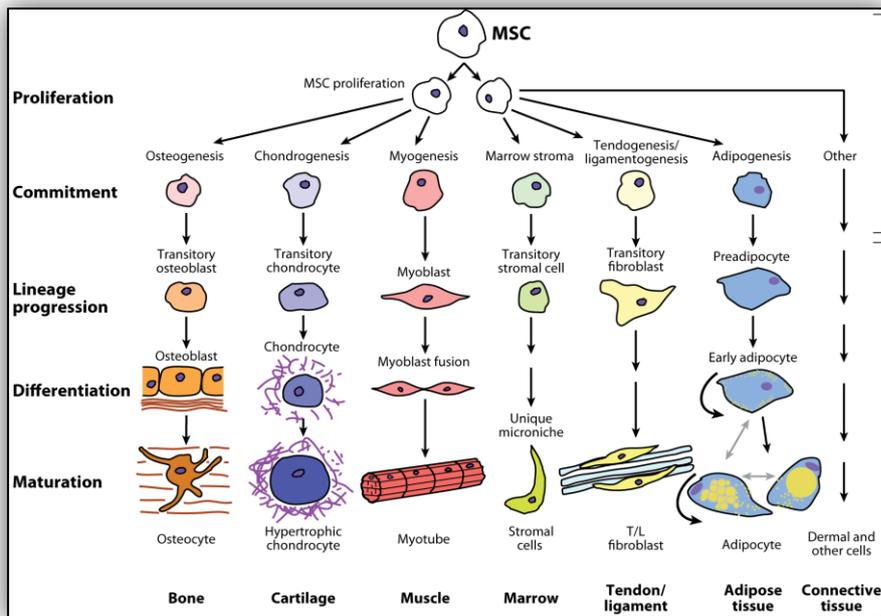
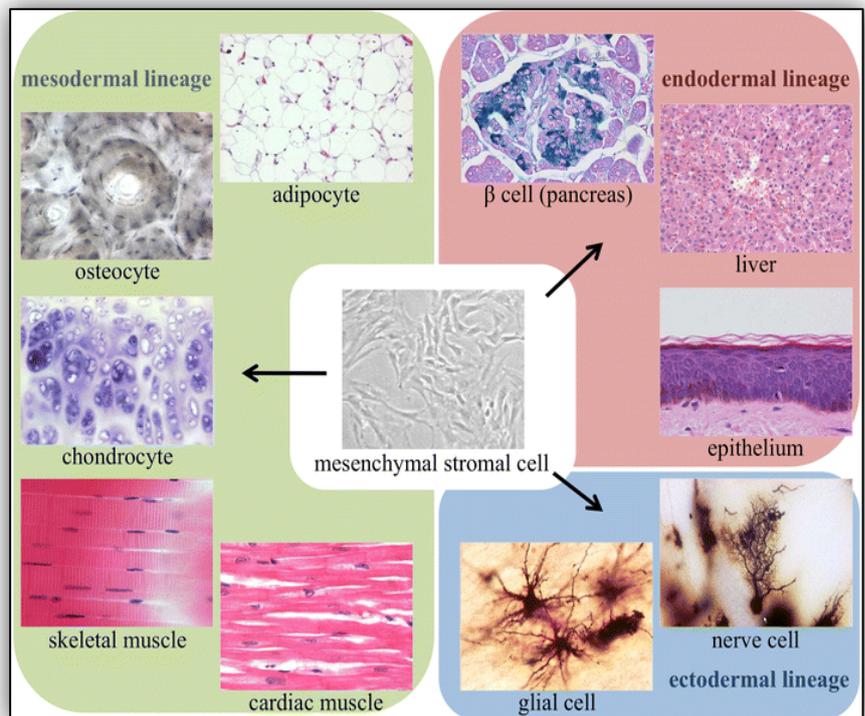


Figura 10. Esquema ilustrativo de la capacidad de diferenciación a múltiples linajes de las células madres mesenquimales adultas. Obtenido de Singer y col.⁷⁴

Figura 11. Diferenciación de células mesenquimales adultas hacia células de linajes mesodérmico endodérmico y ectodérmico. Obtenido de Kuroda y col.⁷⁷



Bajo condiciones *in vitro* presentan las siguientes características:

- Se adhieren al plástico y bajo condiciones de proliferación (generalmente medio DMEM 1g/L suplementado con 10 % FBS) presentan una morfología tipo fibroblástica.

- Su inmunofenotipo es positivo (expresión $\geq 95\%$) para los antígenos de superficie CD29, CD44, CD71, CD73, CD90 (Thy-1), CD105 (endoglina), CD166 (ALCAM), Stro-1 e ICAM-1. Además deben ser negativos (expresión $\leq 2\%$) para los marcadores hematopoyéticos y endoteliales CD11, CD14, CD31, CD34, CD45 y HLA-DR
- Capacidad de diferenciarse a diferentes fenotipos, incluyendo el osteoblástico, condroblástico y adipogénico, cuando son cultivadas bajo condiciones específicas empleando medios inductores.

Algunas de las características de las células MSCs mencionadas anteriormente, pueden variar ligeramente en función del tejido de origen (posiblemente debido a las diferencias en el microambiente del mismo) y los métodos de aislamiento empleados. Por consiguiente, la “International Society for Cellular Therapy” en el año 2006 estableció un conjunto de criterios mínimos que deben cumplirse para la identificación de las células MSCs ⁷⁸. Dichos criterios se indican en la Tabla 6.

1 Adherence to plastic in standard culture conditions		
2 Phenotype	Positive ($\geq 95\%+$)	Negative ($\leq 2\%+$)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 or CD11b
		CD79 α or CD19
		HLA-DR
3 <i>In vitro</i> differentiation: osteoblasts, adipocytes, chondroblasts (demonstrated by staining of <i>in vitro</i> cell culture)		

Tabla 6. Criterios mínimos establecidos por la “International Society for Cellular Therapy” para la identificación de las células mesenquimales (MSCs). Los criterios se basan en: 1) la adhesión de las células al plástico, 2) expresión positiva ($\geq 95\%$) de antígenos CD73, CD90 y CD105 y negativa ($\leq 2\%$) de CD14, CD34, CD45, CD79 α y HLA-DR. 3) Diferenciación a linajes osteoblástico, adipogénico y condroblástico demostrado mediante tinciones de Rojo Alizarina, Oil red y Azul Alcian respectivamente. Obtenido de Dominici y col. ⁷⁸

La plasticidad de las células MSCs, su fácil obtención y su gran capacidad inmunomodulatoria, sugiere que es un tipo celular ideal para su utilización en el campo de la ingeniería de tejidos ⁷⁹. En este sentido, además de las características generales descritas para las células MSCs, se han de tener en cuenta otros criterios que también favorezcan su uso en este campo ⁸⁰:

- El aislamiento debe proporcionar una cantidad abundante de células (millones o billones).
- El procedimiento de aislamiento debe ser poco invasivo y provocar una morbilidad mínima del paciente.

- Su implantación ha de ser segura independientemente si es un trasplante autólogo o alogénico.
- Toda la metodología aplicada ha de ser adaptada para cumplir las normas de buenas prácticas de manufactura.
- Se debe tener en cuenta toda la normativa aplicable, así como consideraciones éticas.

La capacidad de satisfacer estos criterios depende en gran medida de la fuente o el tejido de origen de las células. Tanto la cantidad de material de partida como el número de células MSCs presentes se consideran parámetros claves. Las primeras células MSCs aisladas, las más estudiadas y las más utilizadas hasta el momento tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* en el campo de la ingeniería de tejidos, son las células mesenquimales de la médula ósea (BM-MSCs) ⁸¹⁻⁸⁵. Sin embargo, los procedimientos de aislamiento de estas células son dolorosos, requieren por lo general anestesia general o espinal y se obtiene un bajo número de células después de aplicar el protocolo de aislamiento (aproximadamente 1 BM-MSCs por cada 10^5 células estromales). Este último hecho además implica desde el punto de vista práctico, que es necesaria su expansión *in vitro* para obtener un número de células clínicamente significativo. Este paso además de requerir tiempo, es costoso e implica un riesgo de contaminación y pérdida de células ⁸⁶. Esta problemática ha impulsado la investigación en células MSCs provenientes de otras fuentes.

Particularmente las células mesenquimales procedentes de tejido adiposo (ADSCs) han despertado un gran interés en los últimos años. Comparado con las células BM-MSCs, las ADSCs son fáciles de obtener, su aislamiento provoca una leve morbilidad en los donantes, el procedimiento es poco invasivo y en un volumen pequeño de grasa hay un gran número de células MSCs ($2-8 \times 10^8$ cel/300 mL grasa). Además, al igual que las BM-MSCs, proliferan rápidamente en cultivo y mantienen sus características de células madre mesenquimales tras su expansión y criopreservación ^{66,87,88}. Todas estas características cumplen con los criterios mencionados en párrafos anteriores que se han de tener en cuenta la selección de un tipo celular particular en el campo de la ingeniería de tejidos.

1.3.1. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSCs)

Las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs), son una población de células mesenquimales que pueden ser aisladas de la fracción vascular estromal del tejido adiposo^{86,89}. Algunas evidencias sugieren que dentro del tejido adiposo blanco, esta población de células tiene una localización perivascular donde coexiste con otros tipos celulares tales como adipocitos, pericitos, células hematopoyéticas, endoteliales y musculares lisas^{90,91} (ver Figura 12).

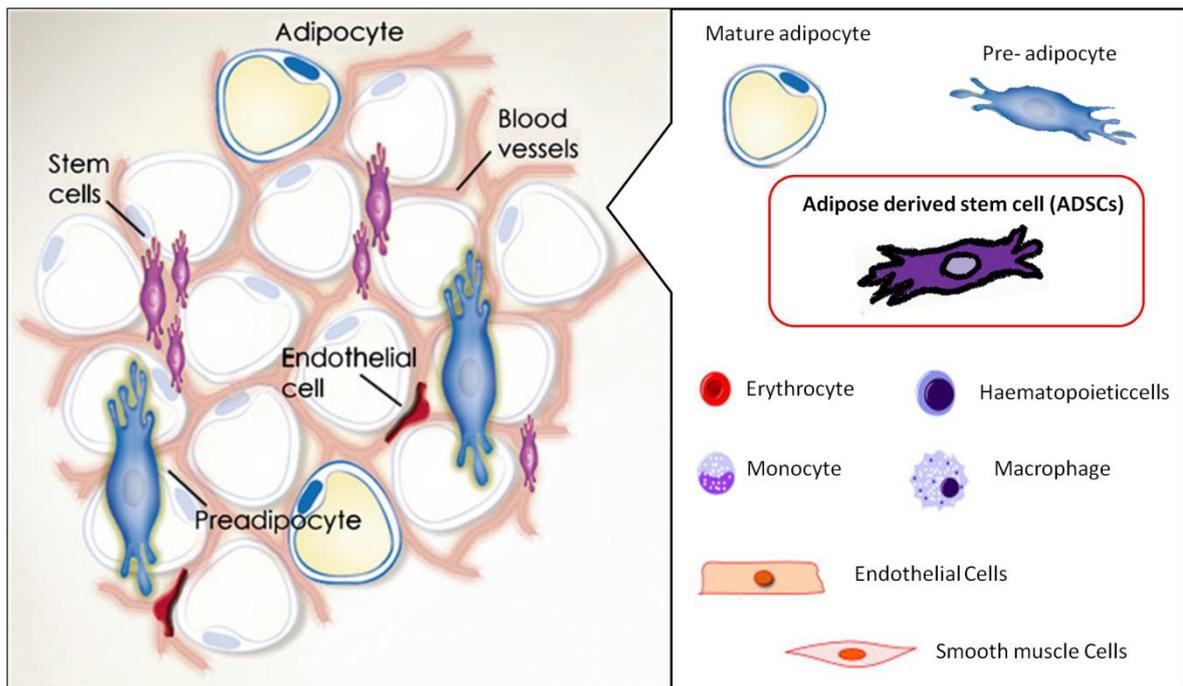


Figura 12. Diferentes tipos celulares que coexisten con las células madre mesenquimales en el tejido adiposo blanco. Las células madre mesenquimales presentan una localización peri-vascular. Modificado de Ong y col.⁹²

En humanos, los principales depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneos se localizan en glúteos, muslos y abdomen (ver Figura 13 A). Estos depósitos son fácilmente accesibles y se extraen en grandes cantidades mediante un procedimiento mínimamente invasivo denominado liposucción (extracción de grasa mediante aspiración). Con el incremento de la obesidad, miles de liposucciones se realizan al año en todo el mundo, y el producto del lipoaspirado finalmente se descarta como residuo médico⁸⁰. Esto sugiere que es un excelente material biológico de partida como fuente para la obtención de células madre mesenquimales autólogas. A partir de 1 gramo de lipoaspirado, se pueden obtener entre $0,5 \times 10^4$ y 2×10^5 células madres, las variaciones en el número de células obtenidas puede variar en función de la edad del donante, la zona de extracción del tejido y el método de aislamiento aplicado^{87,93}.

Además del lipoaspirado, se pueden obtener las células ADSCs a partir de biopsias de secciones de tejido adiposo, aunque es un procedimiento menos común en la cirugía plástica y reconstructiva.

El producto de lipoaspirado está constituido por dos capas claramente definidas. La fase inferior corresponde a una fase líquida formada principalmente por solución salina (inyectada durante el proceso) y eritrocitos; mientras que en la fase superior corresponde principalmente a los adipocitos y las células del endotelio y estroma circundante⁹⁴. El protocolo general de aislamiento de las células ADSCs utiliza la enzima colagenasa para la digestión del tejido adiposo (fase superior del lipoaspirado), seguido por centrifugaciones para separar la fracción vascular estromal (donde se localizan las células ADSCs) de los adipocitos y la fracción líquida constituida mayoritariamente por tejido sanguíneo (ver Figura 13 C). El primer aislamiento y caracterización de las células ADSCs, fue realizada por Zuk y colaboradores en el año 2001. Demostraron su capacidad de adhesión al plástico, la expresión de un inmunofenotipo característico de células mesenquimales, y su plasticidad mediante su diferenciación osteogénica, adipogénica, condrogénica y miogénica empleando medio de cultivo inductores⁸⁶.

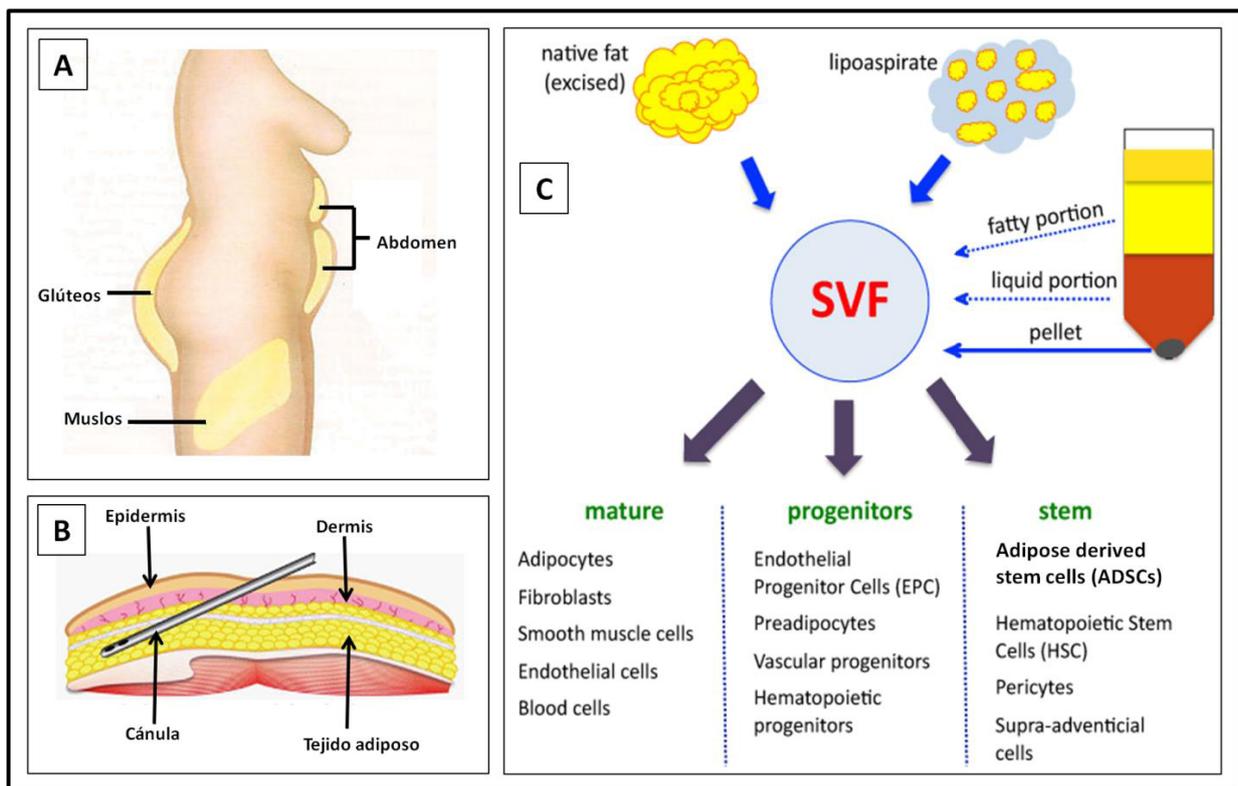


Figura 13. Tejido adiposo, lipoaspirados y células madres derivadas de tejido adiposo. A) principales zonas de acumulación de tejido adiposo blanco en humanos. B) Esquema representativo de un corte histológico longitudinal donde se observa la localización subcutánea del tejido adiposo. Además se representa una cánula empleada en las cirugías de liposucción para obtener los lipoaspirados. C) Representación de la obtención de la fracción vascular estromal (SVF) a partir del tejido adiposo, y los principales tipos celulares que están presentes en el mismo. Las células ADSCs representan aproximadamente un 10 % de la SVF. Modificado de <http://stemcellassays.com/2013/05/breaking-fat-svf/>

El aislado fresco de la SVF es una mezcla heterogénea de células endoteliales, pericitos y células musculares lisas, entre otros. Sin embargo, una vez sembrado el producto del aislamiento en una placa de cultivo bajo condiciones estándar y tras la realización de lavados, se obtiene una población celular bastante homogénea de MSCs^{86,95}.

In vitro, las células ADSCs tienen un fenotipo fibroblastoide y un tiempo de duplicación celular que varía entre 2 y 4 días dependiendo del medio de cultivo celular utilizado y el número de pases. Su alta tasa de actividad proliferativa y la capacidad de diferenciación a múltiples linajes, se mantiene hasta pases elevados. El inmunofenotipo de las ADSCs recién aisladas o con pases bajos, ha sido comparado con el de las células a pases elevados (pase \geq 5). Los resultados indican que si bien hay cierta variedad en la expresión de marcadores de las células recién aisladas, a partir de pases 2 o 3 las células expresan de manera uniforme los marcadores característicos de células madre mesenquimales (positivas para CD10, CD13, CD29, CD 44, CD49e, CD73, CD90, CD105, y CD166; y negativas para CD11b, CD14, CD31, CD45 y HLA -DR)⁹⁵⁻⁹⁷. Un detalle importante a destacar, es que las células ADSCs tienen una expresión elevada del marcador CD90 inclusive a pases muy elevados. Este marcador ha sido asociado con células osteoprogenitoras o con una elevada capacidad de diferenciación osteogénica bajo señales de inducción específicas^{98,99}.

Además de las características mencionadas en párrafos anteriores, las cuales dan una ventaja importante a las células provenientes del tejido adiposo (ADSCs) respecto a las obtenidas a partir de otras fuentes. Existen dos características adicionales que han despertado gran interés en los últimos años alrededor de las células ADSCs por las implicaciones que tienen en el campo de la ingeniería de tejidos. Por una parte, al igual que las MSCs provenientes de otras fuentes, no expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), ni de moléculas coestimuladoras en la superficie celular¹⁰⁰. Esto ha permitido, como han demostrado algunos ensayos *in vivo*, la realización de trasplantes alogénicos de las células hADSCs con reacciones inmunes mínimas en el huésped. Además se consideran Inmunomoduladoras, ya que suprimen la proliferación de linfocitos alogénicos activados, inhiben la producción de citoquinas inflamatorias e inducen la de citoquinas antiinflamatorias¹⁰¹. Por otra parte, diversos análisis han revelado que las células ADSCs secretan una variedad importante de factores solubles proangiogénicos, antiapoptóticos y otras citoquinas. Algunos ejemplos que pueden citarse son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF -1), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-10 (IL-10) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), entre otros¹⁰²⁻¹⁰⁴. Este hecho es de suma importancia pues sugiere que, además de diferenciarse a otros tipos celulares, las células hADSCs son capaces de inducir la formación de vasos sanguíneos mediante la liberación de factores de crecimiento proangiogénicos y

regular la respuesta inflamatoria frente a daños tisulares. Este hecho ha sido demostrado en experimentos *in vitro* e *in vivo*¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

Finalmente en la Figura 14 se resumen las características o propiedades biológicas en las que se basa el potencial terapéutico de las células hADSCs en el campo de la ingeniería de tejidos.

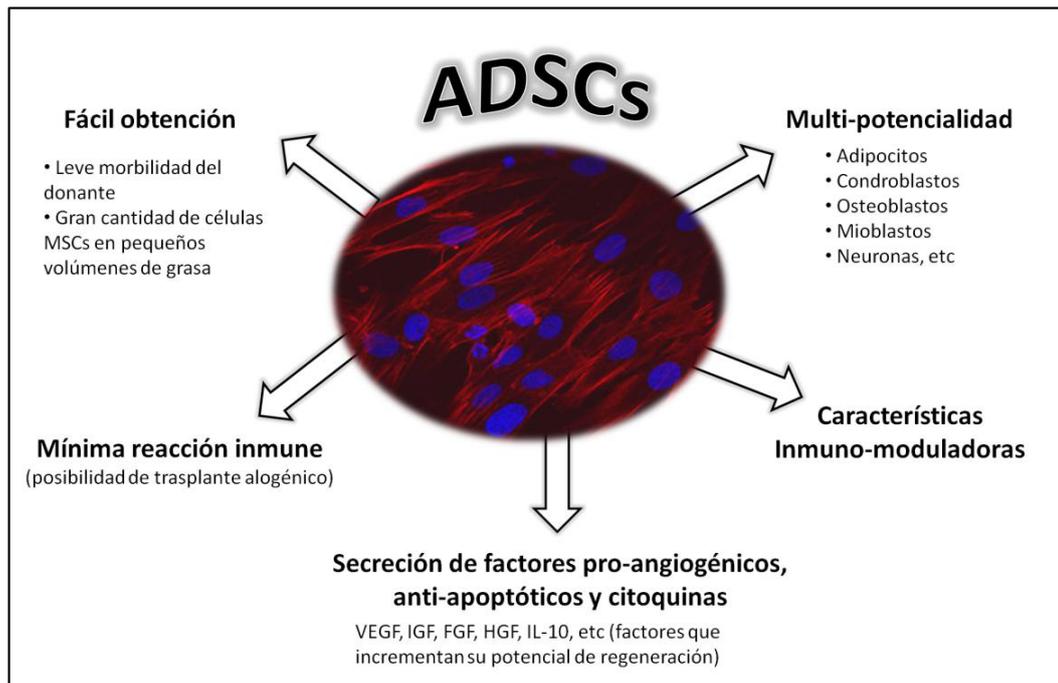


Figura 14. Propiedades biológicas de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSCs) y su potencial en la ingeniería de tejidos.

1.4. Células madre mesenquimales (MSCs) y osteogénesis

La osteogénesis es el proceso mediante el cual se produce la formación de nuevo hueso en etapas prenatales (durante la organogénesis) y postnatales. En humanos, ocurre a lo largo de toda la vida, pues es un órgano que está en constante remodelación; además se estimula de manera importante en caso de fracturas o lesiones óseas. Es un proceso complejo que incluye diversos tipos celulares (MSCs, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), factores solubles (citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, vitaminas) y la ECM secretadas por dichas células, estímulos mecánicos y la vascularización²⁴.

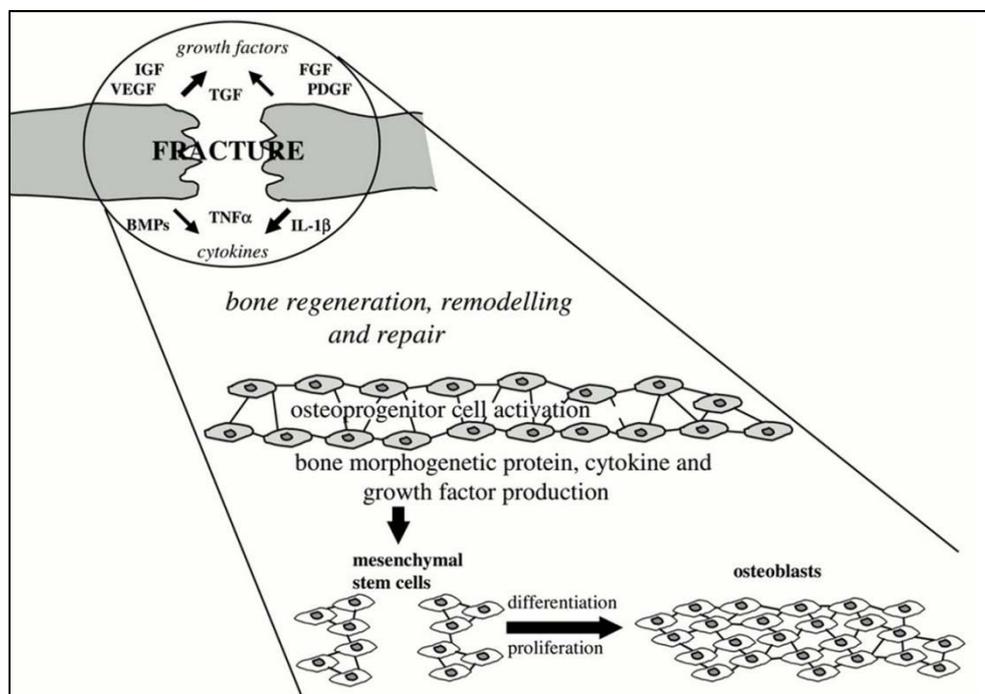


Figura 15. Proceso de regeneración, remodelación y reparación del hueso y factores implicados. Las lesiones, estimulan la producción de factores de crecimiento y citoquinas, cuya función es estimular a las células mesenquimales a diferenciarse en células osteoprogenitoras y finalmente osteoblastos. Los osteoblastos, son la piedra angular de las células formadoras de hueso. Obtenido de Braddock y col.¹⁰⁹

La osteogénesis implica la activación de un conjunto de mecanismos celulares y moleculares, que conllevan a la diferenciación de las células MSCs residentes hacia un linaje osteogénico. En general, el proceso puede ser subdividido en tres etapas: a) proliferación, b) síntesis y maduración de la ECM, y c) mineralización (ver Figura 16)¹¹⁰. Cada una de estas etapas está caracterizada por la expresión de diferentes marcadores osteogénicos, siendo los más comunes la enzima fosfatasa alcalina (ALP), Colágeno tipo I (COL), osteopontina (OPN), sialoproteína del hueso (BSP), osteocalcina (OC) y osteonectina (ON). En general, la expresión de ALP, BSP, ON y COL se consideran marcadores tempranos

e intermedios de diferenciación, mientras que la OC se considera un marcador tardío. Por otra parte la OPN aparece en estadios tempranos y tardíos de la diferenciación, mas no en los intermedios.

En función de la expresión de estos marcadores, se consideran diferentes fenotipos dentro del linaje osteogénico. Así, las células madre mesenquimales (MSCs) dan lugar a las células osteoprogenitoras (presentes en la etapa de proliferación), preosteoblastos (células que inician la diferenciación y síntesis de ECM), osteoblastos maduros (sintetizan la matriz ósea mineralizada) y finalmente a los osteocitos que son células especializadas embebidas en la matriz mineralizada que dan soporte a la estructura ósea (ver Figura 16) ^{111,112}.

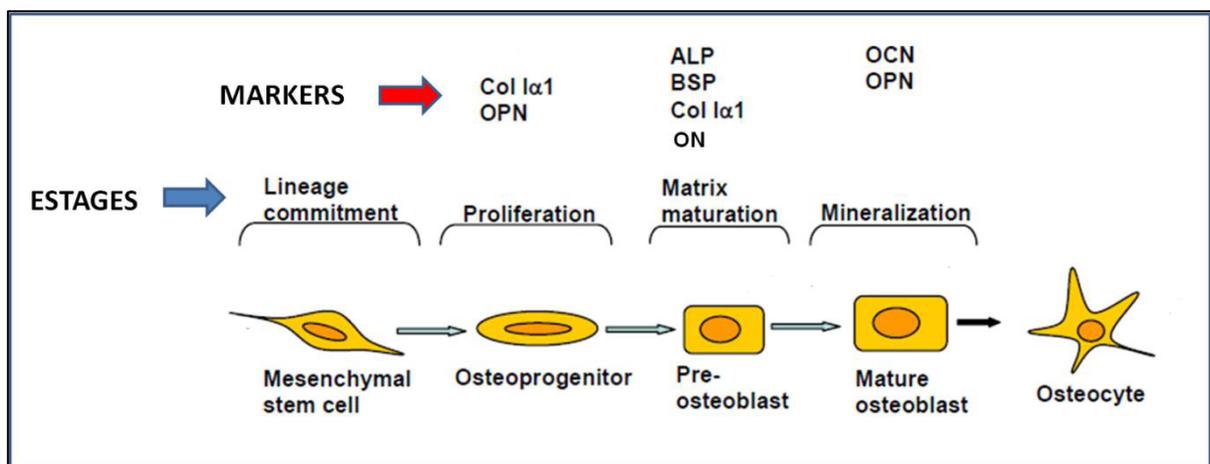


Figura 16. Proceso de diferenciación osteogénica. Etapas del proceso de diferenciación de células madre mesenquimales (MSCs) hacia linaje osteogénico y factores o proteínas característicos de cada fase. Modificado de Favus y col. ¹¹⁰

Se ha demostrado que existen múltiples vías de señalización que participan en la diferenciación de células mesenquimales hacia el linaje osteogénico. En particular, la vía que involucra las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) tiene un papel fundamental ¹¹³. Dichas proteínas, son un subgrupo de la familia de citoquinas multifuncionales del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) e inician la cascada de señalización a través de los receptores tipo I y II de las BMPs (BMPR). La evaluación del papel individual de cada uno de los tipos de BMPs es compleja, pues *in vivo* existe una mezcla de todos los tipos de BMPs e *in vitro* se han hecho pocos estudios que utilicen el mismo modelo experimental ¹¹¹. A pesar de esto, en función de los trabajos publicados, se considera que las BMPs 2, 4 y 7 son osteogénicas, ya que inducen la formación de hueso ectópico *in vivo*, y la transformación de células MSCs en osteoblastos ^{114,115}. A diferencia de éstas, la BMP-3 es un regulador negativo que inhibe la diferenciación de las células progenitoras a osteoblastos ¹¹⁶.

La activación de los receptores BMPR, conducen a la fosforilación de las proteínas Smad 1, 5 y 8 (Smad Reguladores o Smad-R), las cuales forman un complejo con Smad 4 (Smad-Co) que se moviliza al núcleo y estimula la transcripción de genes diana ¹¹⁷. La transcripción de estos genes puede ser bien por la unión directa del complejo Smad-R fosforilado/Smad4 al DNA o a través de su interacción con coactivadores o factores de transcripción ¹¹⁸. En las células osteoprogenitoras, la cascada de señalización de las BMPs da lugar a la expresión de los factores de transcripción Dlx5, Msx2 y Runx-2 (también denominado Cbfa1), que durante las fases tempranas de la diferenciación osteogénica regulan la proliferación de las células osteoprogenitoras e inducen su diferenciación hacia osteoblastos. Estos factores de transcripción, son considerados los principales elementos reguladores del proceso de formación del hueso ¹¹⁹. El factor Runx-2 inducido en las células osteoprogenitoras interactúa directamente con las Smad-R (específicamente la Smad 1 y la Smad 5) induciendo la diferenciación a células osteoblásticas, mediante la inducción de la expresión de proteínas tales como ALP, COL, OP y OC (ver Figura 17). Existe otro factor de transcripción que tiene un papel clave en la diferenciación osteoblástica denominado Osterix (Osx) ¹²⁰. Su expresión es inducida por Dlx5, Msx2 y Runx-2, siendo éste último su principal regulador en la cascada transcripcional de la diferenciación ^{121,122}. Su expresión se ha detectado en osteoblastos, pero no en células osteoprogenitoras, de manera que se considera un marcador tardío del proceso osteogénico ²⁴ (ver Figura 18).

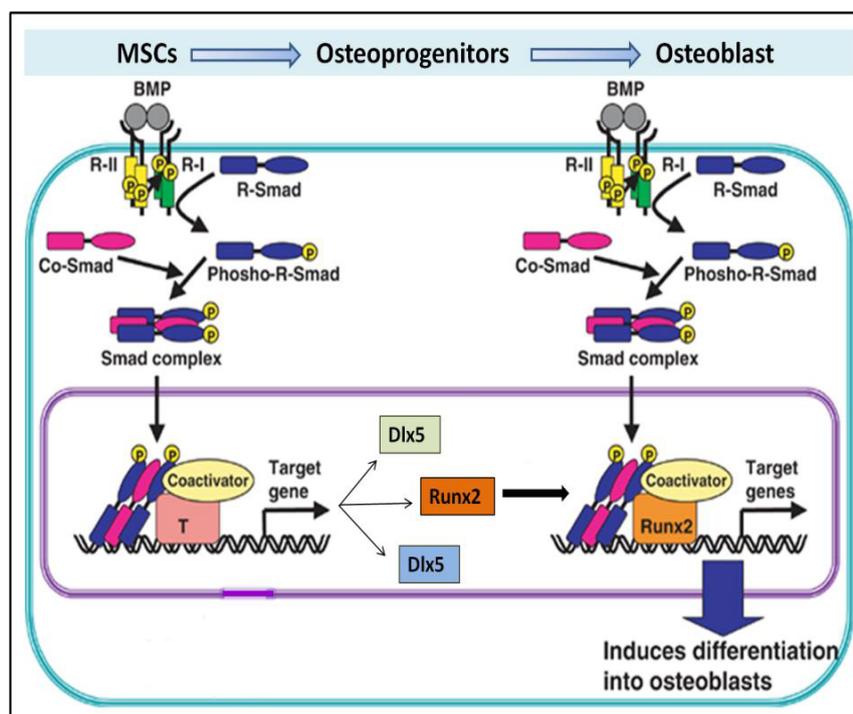


Figura 17. Inducción de la diferenciación osteoblástica de células progenitoras mediante la ruta de señalización de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). La activación de los receptores tipo I y II de las BMPs (BMPR), induce la fosforilación de Smad 1, 5 y 8 (Smad-R), las cuales forman un complejo con la Smad 4 (Smad-Co). Este complejo es transportado al núcleo donde induce la expresión de Runx2, Dlx5 y Msx2. A su vez Runx 2 interactúa con las R-Smad y otras proteínas e induce la diferenciación osteoblástica. Obtenido de Miyazono y col. ¹¹⁸

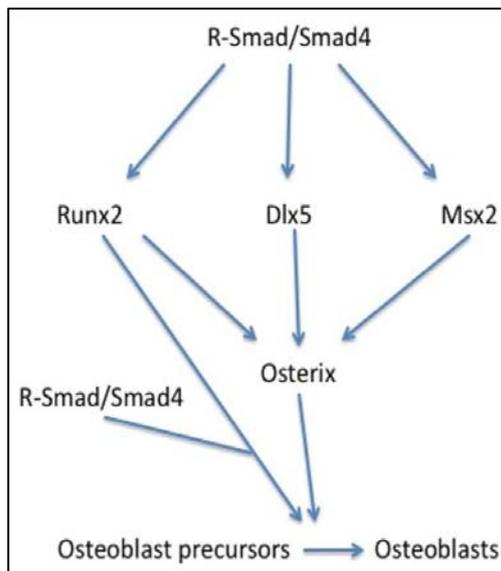


Figura 18. Señalización de las BMPs en la diferenciación osteogénica. La expresión de las moléculas Runx2, Dlx5 y Msx2 inducida por las BMPs, a su vez induce la expresión de Osterix (Osx). Estos cuatro factores inducen la transcripción de numerosos genes involucrados en la diferenciación osteoblástica.

Existen una serie de factores que inhiben la ruta de diferenciación osteogénica a través de las BMPs. Por ejemplo las proteínas Smad 6 y 7 (Smad inhibitorias o Smad-I), actúan como competidores de las Smad-R por el sitio de unión con Smad 4, lo que trae como consecuencia una inhibición del proceso de diferenciación ¹²². El factor noggin es un inhibidor específico de la BMP-2 ¹²³, mientras que TWIST es una proteína antiosteogénica, pues se une a Runx-2 inhibiendo su actividad ¹²⁴.

Por otra parte, se ha descrito otra ruta de diferenciación osteogénica en la que participan otros miembros de la familia de las TGF- β no pertenecientes al subgrupo de las BMPs (activina, nodal, mioestatina y TGF- β_5). La ruta es similar a la descrita previamente para las BMPs, pero en este caso al activarse los receptores I y II (ALK-4 y ALK-5), se induce la fosforilación de los factores Smad 2 y 3, los cuales se acoplan a Smad 4, el complejo se moviliza al núcleo y estimula la transcripción de los genes diana (ver Figura 19) ¹²⁵.

De los datos disponibles en la literatura existen resultados claramente contrastados respecto a la acción del grupo de factores de la familia TGF- β no pertenecientes al subgrupo de las BMPs. Se ha demostrado que *in vitro* induce la expresión de marcadores tempranos de la diferenciación osteoblástica (Ej. La enzima ALP) en células MSCs de médula ósea y la línea celular C2C12; pero inhiben la expresión de Runx2, OC y la mineralización de la ECM en osteoblastos primarios y líneas celulares que se diferencian a osteoblastos en cultivo ^{126,127}. Por otra parte se ha descrito que *in vivo* estimulan la proliferación y reclutamiento de precursores osteoblásticos en los lugares de reparación y, por el contrario, parecen ser menos necesarios o incluso inhibir, los últimos pasos del proceso de diferenciación osteogénica. Este último planteamiento, abre la posibilidad a un cierto sinergismo donde las rutas activadas por el TGF- β estén implicadas en el proceso de proliferación de las células progenitoras y producción de factores

tempranos de diferenciación, mientras que las BMPs estarían implicadas en etapas tempranas y tardías del proceso de diferenciación¹²⁸ (ver Figura 20).

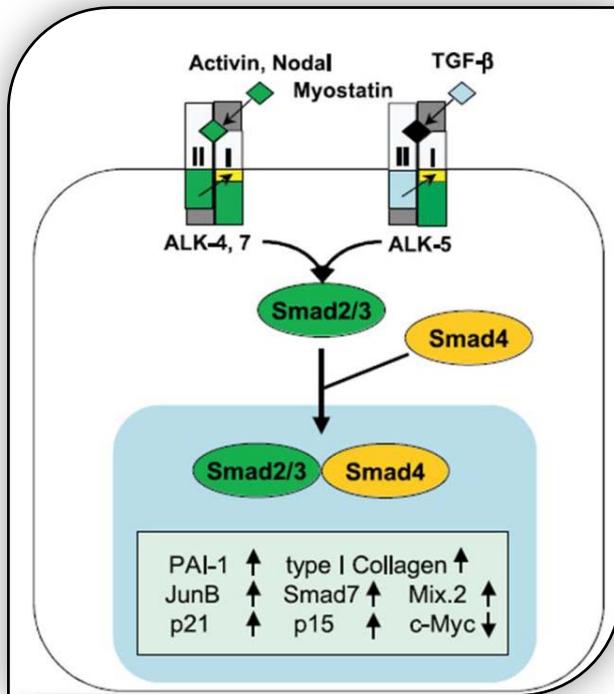
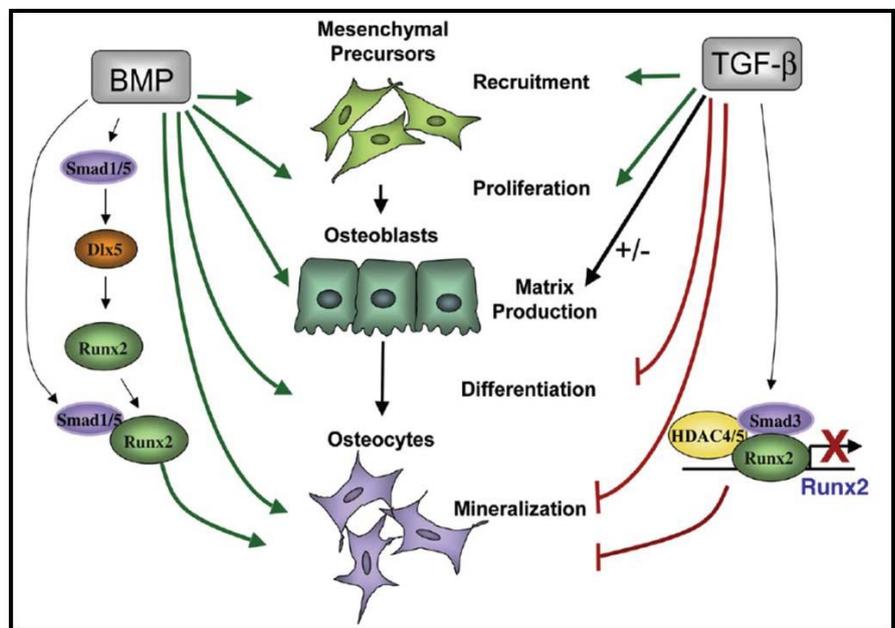


Figura 19. Inducción de la ruta de diferenciación osteogénica mediante miembros de la familia TGF-β no pertenecientes al subgrupo de las BMPs. A diferencia de lo descrito en la ruta de las BMPs, en este caso se fosforilan las Smad 2 y 3, que a su vez forman el complejo con la Smad 4, que es transportado al núcleo donde se induce la transcripción de proteínas blanco tales como Colágeno tipo I (COL), Smad 7, entre otros. Obtenido de Miyazawa y col.¹²⁵

Figura 20. Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y proteínas morfológicas del hueso (BMPs) en la diferenciación osteogénica. TGF-β induce el incremento de la proliferación de células mesenquimales precursoras (células osteoprogenitoras), pero inhibe las fases finales del proceso de diferenciación mediante Smad 3. BMPs inducen la expresión de Dlx5, y Runx2 que promueve la progresión del proceso de diferenciación osteogénico. Obtenido de Derynck y col.¹²⁸



Finalmente, cabe mencionar que también ha sido demostrado que otros factores tales como las proteínas de ECM, el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) o la hormona paratiroidea (PTH), también pueden activar diversas rutas de señalización que conlleva a la expresión y activación de Runx-2 y por ende finalmente a la inducción de la ruta de diferenciación osteogénica¹²⁹. Dichas rutas pueden

depender o no de la participación de las Smad, y en este sentido se denominan ruta canónica o no canónica respectivamente. Una visión general de estas rutas de señalización se muestra en la Figura 21.

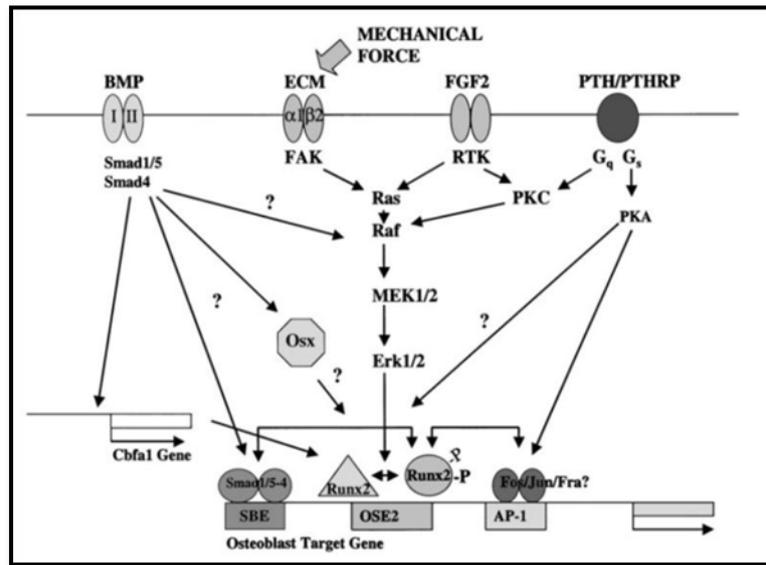


Figura 21. Vista general de las rutas de señalización que pueden afectar la expresión de Runx-2. Además de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), otros factores tales como la interacción de la matriz extracelular (ECM) con integrinas de membrana, el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y la hormona paratiroides (PTH) pueden influir en la expresión del factor Runx2 y por ende en la diferenciación osteoblástica. Obtenido de Franceschi y col.¹²⁹

La inducción de la diferenciación *in vitro* de células MSCs hacia osteoblastos, se ha conseguido mediante la utilización de factores inductores en el medio de cultivo tales como la dexametasona (DMS) y el ácido ascórbico⁸⁶. Asimismo, se induce o se potencia su diferenciación mediante la adición de proteínas BMPs osteogénicas (por ejemplo BMP7)¹³⁰, o su cultivo en matrices tridimensionales (biomateriales) diseñadas para la ingeniería de tejidos del hueso¹³¹.

De modo general, la evaluación del proceso de diferenciación de las células MSCs hacia el linaje osteogénico *in vitro* independiente si se realiza el cultivo de las células en 2D (plástico) o 3D (biomateriales) debe incluir:

- Detección de la mineralización de la ECM, mediante tinción histológica con rojo de Alizarina o von Kossá.
- Determinación de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), mediante ensayos bioquímicos.
- Análisis cualitativos y cuantitativos de la expresión de marcadores osteogénicos tales como ALP, ON, OP, OC, COL y BMPs, entre otros.

1.5. Células madres mesenquimales (MSCs) y materiales cerámicos de fosfato de calcio: interacción célula-biomaterial y osteogénesis.

La interacción de las células MSCs con cualquier biomaterial y la construcción de un implante bioartificial (constructo células-biomaterial) con potencial uso en la ingeniería de tejidos del hueso, dependen de tres fases críticas:

- La adhesión inicial y supervivencia de las células MSCs sobre el material.
- La proliferación de las células una vez adheridas al material.
- La diferenciación de las MSCs hacia un linaje osteoblástico.

La rapidez y la fuerza con la que las células puedan adherirse al biomaterial, puede determina el éxito del establecimiento del cultivo tridimensional independientemente de su aplicación. Una adhesión temprana significa que un mayor número de células están concentradas en el material y pueden comenzar antes a hacer *spreading*. Por otra parte una adhesión lenta o tardía implica que las células están un largo período de tiempo sin adherirse, lo que puede implicar un decrecimiento de la viabilidad celular ⁶².

Los principales mediadores de la adhesión de las células al sustrato son las integrinas, una clase de receptores transmembrana que forman una unión física directa entre el citoesqueleto y la ECM. La adhesión mediada por integrinas, es un proceso complejo altamente regulado, que depende de la interacción del receptor con secuencias de aminoácidos que forman parte de proteínas de la ECM ¹³². La adhesión mediada por integrinas además, está involucrada en la adhesión célula-célula y en la inducción de cascadas de señalización intracelular que están relacionadas con diversos procesos tales como la proliferación y diferenciación celular.

Es conocido, que las integrinas juegan un papel fundamental en el desarrollo, organización, mantenimiento y reparación de varios tejidos, permitiendo el anclaje y activación de señales que dirigen los proceso de supervivencia, migración, progresión del ciclo celular y expresión de diversos fenotipos. Adicionalmente, algunas investigaciones sugieren que tanto las señales mecánicas inherentes a la unión de integrinas a la ECM como los factores de transcripción activados mediante las rutas de señalización, son importantes reguladores de la diferenciación de células MSCs hacia el linaje osteogénico *in vitro*

^{133,134}

La adhesión de las células a los biomateriales también está mediada por las integrinas. Algunas evidencias sugieren que las diferentes respuestas de las células MSCs sobre biomateriales, pueden estar determinadas por la capacidad del material de absorber proteínas de ECM. Esto se debe a que, por lo general, los materiales sintéticos no facilitan por sí mismos la adhesión celular^{135,136}. En este sentido, las proteínas de ECM presentes en la superficie del material pueden provenir de: a) el medio del cultivo (específicamente las proteínas contenidas en el suero), b) la modificación de la superficie del material con recubrimientos proteicos (por ejemplo la aplicación de FN, COL y fibronectina, entre otros), y/o c) la secreción de proteínas propias de las células¹³⁷. También pueden darse uniones entre las células y los materiales mediante uniones no específicas a través de fuerzas no covalentes. Sin embargo, nunca alcanza los efectos producidos por la unión específica de integrinas a la ECM⁶².

La información proporcionada hasta el momento, pone de manifiesto que la adhesión es el primer paso y el más crítico en la interacción célula-material y de la calidad de esta fase dependen la proliferación y diferenciación celular posterior. Además nos indica que la adhesión depende en gran medida de la ECM, ya que además de proveer un soporte estructural, aporta señales bioquímicas que modulan la adhesión y el fenotipo celular mediante las integrinas.

En secciones anteriores hemos explicado las características y ventajas del uso de las células madre mesenquimales de tejidos adultos y materiales cerámicos de fosfato de calcio en la ingeniería de tejido del hueso. Son numerosos los trabajos que evalúan la interacción de las MSCs con diferentes tipos de materiales cerámicos de calcio con y sin modificaciones de la superficie celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Dennis y col., evaluaron la biocompatibilidad y el potencial osteogénico de células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSCs) en una cerámica de carbonato de calcio no porosa, demostrando que las células son capaces de adherirse y proliferar, sin embargo, bajo esta condición la producción de proteínas de ECM asociada al fenotipo osteoblástico es baja¹³⁸. Toquet y col.¹³⁹, evaluaron el comportamiento *in vitro* de células BM-MSCs sobre discos porosos de fosfato de calcio bifásico (BCP) empleando un medio de cultivo con factores inductores de la diferenciación osteogénica (dexametasona, glicerol 2 fosfato y ácido ascórbico). Sus resultados indican que además de adherirse y proliferar, se observa un incremento significativo de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) y la deposición de proteínas de ECM mineralizadas únicamente en el medio de cultivo con factores inductores. Ambos resultados sugieren que la porosidad del material juega un papel importante en el proceso osteogénico. En este contexto, Kasten y col.¹⁴⁰, examinaron la influencia de la porosidad (25 %, 65 % y 75 %) de material cerámico de beta fosfato tricálcico (β -TCP) en formato de bloque, sobre la diferenciación osteogénica de células BM-MSCs *in vitro* e *in vivo*. Sus resultados *in vitro* muestran un incremento significativo de la proteína total únicamente sobre los materiales de β -TCP con porosidades de 65 % y 75 %; sin embargo la actividad de la enzima (ALP) incrementó significativamente en los tres

materiales alcanzando niveles similares entre sí. Por otra parte, el análisis bioquímico e histológico de muestras provenientes de implantes subcutáneos de los constructos células BM-MSCs-Biomateriales (β -TCP 25 %, 65 % y 75 %) en ratones, indicó que la actividad ALP y la mineralización de la matriz fue superior al utilizar el material de β -TCP 65 %, respecto a los de 25 % y 75 %. Estos resultados indican que una mayor porosidad no necesariamente está asociada a una mayor formación de hueso, sino que otros parámetros tales como la estructura de la superficie (la cual varía en función de la porosidad) también tiene un papel importante influyendo en la producción de proteína de ECM por parte de las células.

Además de la capacidad de adhesión, proliferación y de producir una matriz celular mineralizada, estudios más recientes demuestran que tras cultivar células MSCs sobre matrices tridimensionales de fosfato de calcio se induce la expresión de genes asociados a rutas de diferenciación osteogénica. Cordonnier y col.¹⁴¹, cultivaron células BM-MSCs sobre un material cerámico granulado de BCP y determinaron que tras 21 días el biomaterial es capaz de inducir un incremento significativo de los genes fosfatasa alcalina (ALP), proteína morfogenética del hueso 2 (BMP-2) y sialoproteína del hueso (BSP), respecto a células cultivadas en plástico. Bernhardt y col.¹⁴², cultivaron células BM-MSCs humanas sobre discos de β -TCP con grandes canales interconectados, bajo condiciones de cultivo estático o dinámico (perfusión). Sus datos indican que en ambas condiciones las células fueron capaces de adherirse, proliferar y diferenciarse hacia un fenotipo osteoblástico, mostrando un incremento significativo en la expresión de marcadores osteogénicos tales como ALP, BSP, osteonectina (ON) y osteocalcina (OC).

Si bien la porosidad, tamaño de los poros y composición química influyen en la retención de las células en el material cerámico, tal como se indicó en párrafos anteriores la adhesión inicial parece depender en gran medida de la capacidad de absorción de la superficie del material. En este contexto, Dennis y col.¹⁴³, demostraron que el recubrimiento de la superficie de materiales cerámicos de hidroxiapatita con fibronectina o laminina, promueve una mayor adhesión *in vitro* de células BM-MSCs e incrementa la velocidad de formación de hueso *in vivo*. Zang y col.⁹, consiguieron demostrar que el tratamiento de la superficie de materiales cerámicos granulados de BCP con fibronectina recombinante y cadherina 11, induce un incremento de la actividad de la enzima ALP y la expresión de OC en células BM-MSCs, respecto al material sin recubrir. Por el contrario Tsai y col.¹⁴⁴, encontraron que el recubrimiento de la superficie de un material cerámico con Colágeno, promueve la proliferación celular tardía y la osteogénesis evidenciando un incremento de la mineralización de la ECM, incremento de la actividad de la enzima ALP y la expresión de Runx2 y OC. Sin embargo, no consiguen observar diferencias significativas respecto al material solo, cuando aplican recubrimientos con fibronectina, laminina, gelatina y polyisina.

Estos datos demuestran que la creación de un microambiente celular que contenga una fase biomineral (material cerámico de calcio) y otra polimérica (proteínas de recubrimiento), situación que cabe destacar es similar a la encontrada en el tejido óseo, puede ser un factor crucial para obtener un constructo con un elevado potencial osteogénico. En este sentido, la modificación de la superficie de los biomateriales con proteínas de ECM, sigue siendo una de las principales estrategias utilizadas en el campo de la ingeniería de tejidos del hueso para incrementar la bioactividad del material.

A pesar de que las células madre mesenquimales del tejido adiposo (ADSCs) tienen grandes ventajas respecto a las de la médula ósea (ver sección 1.3.1), existen en la literatura un menor número de referencias bibliográficas acerca de su interacción con biomateriales. Particularmente, existe una información limitada respecto a su interacción con materiales cerámicos de fosfato de calcio. Esto puede deberse a que su aislamiento, caracterización y la identificación de su uso potencial en la ingeniería de tejidos es más reciente. A pesar de ello, en los últimos cuatro años ha habido un incremento significativo en el número de publicaciones. Hattori y col.¹⁴⁵, determinaron la diferenciación osteogénica de células ADSCs cultivadas sobre discos porosos de β -TCP tras 4 semanas de cultivo con medio inductor *in vitro*. Asimismo, observaron que la implantación ectópica del constructo ADSCs-disco β -TCP en ratones, induce la formación de hueso tras 8 semanas. Liu y col.¹⁰, compararon la respuesta *in vitro* de células ADSCs sobre materiales cerámicos de akermanita y β -TCP. Sus resultados indican que las células ADSCs son capaces de adherirse y proliferar en ambas cerámicas sin mostrar signos de citotoxicidad. Además, Tras 7 y 10 días de cultivo empleando un medio de cultivo inductor, detectaron la expresión de los genes osteogénicos Runx2, ALP, OC y COL. Marino y col.¹⁴⁶, demostraron que biomateriales tridimensionales de β -TCP inducen la diferenciación *in vitro* de células ADSCs en ausencia de factores inductores en el medio de cultivo. Además, evidencian que las cultivadas en discos de β -TCP muestran un incremento significativo de la actividad de la enzima ALP y la secreción de OC, respecto a las células crecidas en plástico. Los resultados de Ling y col.¹⁴⁷, apoyan los datos obtenidos por Marino y col.¹⁴⁶, demostrando que *in vitro* el biomaterial de β -TCP (en ausencia de factores inductores) induce mineralización de la ECM y la sobreexpresión de los marcadores ALP, OC y COL1. Aunque también demuestran que la presencia de BMP-2 en el medio de cultivo potencia los efectos de diferenciación osteogénica. Adicionalmente, tras implantaciones ectópicas del biomaterial solo y el constructo ADSCs-biomaterial, demuestran que la presencia de las células incrementa significativamente la formación de nuevo hueso en ratones.

1.6. Células endoteliales como moduladoras de la osteogénesis de células madre mesenquimales: osteogénesis y vascularización *in vitro*

Hasta el momento hemos mencionado varios factores que se tienen en consideración en la ingeniería de tejidos del hueso, con la finalidad de inducir la diferenciación de células madre mesenquimales hacia un linaje osteogénico y crear un implante bioartificial que favorezca la reparación de un tejido dañado. Algunos factores que se han mencionado en párrafos anteriores son: el diseño de un material con características físico-químicas particulares, el recubrimiento de la superficie de materiales con proteínas de ECM que favorezcan la adhesión celular y la adición de factores inductores solubles en el medio de cultivo.

Hasta hace algunos años, en la construcción del implante bioartificial con la finalidad de reparar un defecto óseo, únicamente se tomaban en cuenta factores que favorecieran la osteogénesis. Sin embargo, tras la realización de numerosos estudios *in vivo* se observó que tras implantar el constructo células-biomaterial, una vascularización inadecuada conllevó a una limitación en la difusión de nutrientes y oxígeno, induciendo la muerte de las células adheridas al biomaterial.

La formación de una red capilar alrededor del implante, actúa como un sistema de transporte para las hormonas y la eliminación de productos de desecho y sustancias tóxicas. Adicionalmente las células endoteliales presentes en las paredes de los vasos sanguíneos, liberan factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o factores tales como las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs)¹⁴⁸. Además, tal como se explicó en la sección 1.2.2, en los procesos de reparación del hueso tras un daño, la invasión de los vasos sanguíneos en la zona de la fractura es fundamental para la regeneración y restauración del tejido.

Tras la implantación de un constructo células-biomaterial, los vasos sanguíneos del huésped generalmente invaden el constructo y se forman redes vasculares mediante el proceso de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes). Este fenómeno en parte ocurre, debido a las señales secretadas por las células implantadas en respuesta a la hipoxia. Sin embargo, esta invasión vascular espontánea, se limita a varias décimas de micrómetros por día, lo que significa que el tiempo necesario para la vascularización completa de un implante de varios milímetros es del orden de semanas¹⁴⁹. Se han propuesto varias estrategias para mejorar la vascularización de los constructos células-biomaterial. Dichas estrategias incluyen variaciones en el diseño de los biomateriales, la adición de factores angiogénicos, la prevascularización *in vivo* y la prevascularización *in vitro*.

La estrategia de prevascularización *in vitro* ha despertado un gran interés en los últimos años. Se basa en la observación de que las células endoteliales son capaces de formar estructuras o redes vasculares *in vitro* cuando son cocultivadas con células formadoras de hueso (MSCs, osteoprogenitoras y osteoblastos) ^{150,151}. Tras la implantación, estas redes hacen anastomosis con las redes capilares del huésped y facilitan la vascularización completa del constructo y por ende la difusión de oxígeno y nutrientes ¹⁴⁹. Resulta evidente que el éxito de esta estrategia, depende de la comunicación celular entre las células endoteliales y las células formadoras de hueso. Una gran cantidad de datos muestra que existe una relación funcional íntima entre endotelio vascular del tejido óseo y los osteoblastos, y que ésta comunicación célula-célula podría ser crucial para el desarrollo, remodelación y reparación del hueso ¹⁵². Hallazgos histológicos indican que los osteoblastos y las células osteoprogenitoras tienen una localización adyacente a los vasos sanguíneos en el sitio de formación de hueso nuevo, lo que indica que ambos tipos celulares comparten microambiente.

La interacción entre las células formadoras de hueso y las células endoteliales depende de varios parámetros tales como la fuente de las mismas, el estadio de diferenciación de ambos tipos celulares, el número de pases de las células y del tipo sistema de cultivo (2D o 3D). A pesar de ello, y de modo general los resultados obtenidos por algunos investigadores sugieren que las células endoteliales inducen la diferenciación de las células MSCs hacia un fenotipo osteoblástico, por lo que podrían ser consideradas como un factor mediador de la osteoinducción. Asimismo, las células madre mesenquimales inducen la reorganización de las células endoteliales y la formación de estructuras organizadas tipo redes vasculares.

Xue y col. ¹⁵³, demostraron que el cocultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) con células BM-MSCs sobre plástico, induce un incremento en la expresión de la enzima ALP. Pedersen y col. ¹⁵⁴, utilizando el mismo sistema de cultivo, demostraron que bajo condiciones de estimulación osteogénica (medio de cultivo con factores inductores), las células HUVEC forman estructuras similares a capilares sobre la capa de células BM-MSCs. Tras 6 días de cultivo se establece una red interconectada que presenta varios lúmenes, lo que recuerda a un plexus vascular. La formación de las estructuras, está acompañada de la sobreexpresión de marcadores vasculares tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina (Ang1), angiopoyetina (Ang2) y el factor de Von Willebrands (vWF). Adicionalmente, reportan la diferenciación de las células MSCs que se localizan alrededor de las redes capilares formadas por las células HUVEC, hacia un fenotipo perivascular o de células murales, puesto que expresan los marcadores de actina de músculo liso alfa (α -SMA) y la proteína de músculo liso 22 (SM22). Ambos marcadores son positivos en pericitos y células de musculatura lisa, los cuales están fuertemente asociados con la maduración vascular *in vivo* y la formación de un plexus vascular estable (ver Figura 22) ¹⁵⁵.

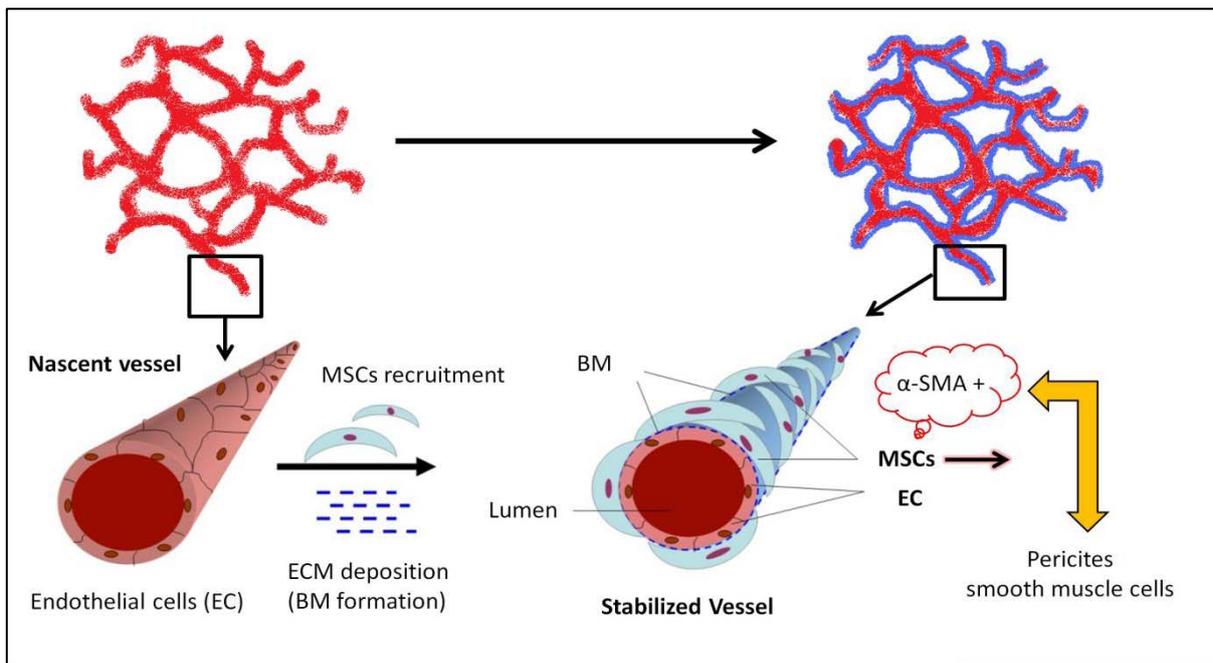


Figura 22. Formación y maduración de vasos tipo capilares. Tras estímulos angiogénicos, las células endoteliales (EC) migran y forman uniones especializadas que dan origen a estructuras tubulares con un lumen central y que forman grandes redes. Paralelamente, las células madre mesenquimales (MSCs) migran y se localizan alrededor de las células EC, donde posteriormente se diferencian a pericitos y células musculares expresando el marcador denominado actina alfa de músculo liso (α -SMA). Adicionalmente, se produce la producción de proteínas de matriz extracelular (ECM) tales como fibronectina, Colágeno tipo IV y laminina, que forman la membrana basal de los vasos sanguíneos (BM). Este último proceso es la maduración o estabilización del vaso, que presentando esta estructura se denomina capilar. Modificado de Jiang y col.¹⁵⁵.

Resultados similares han sido obtenidos por Merfeld y col.¹⁵⁶, al cocultivar células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADSCs) con células endoteliales de sangre de vena de cordón umbilical, en un medio de cultivo libre de factores de crecimiento diferentes a los aportados por el suero. Además de detectar la expresión de α -SMA en las células ADSCs localizadas alrededor de las estructuras vasculares, detectaron el incremento en la producción de proteínas de ECM características de la membrana basal de los vasos sanguíneos tales como laminina, Colágeno tipo IV y fibronectina. También demostraron que la formación de las redes capilares, no depende únicamente de la comunicación paracrina mediante factores solubles liberados al medio de cultivo, sino que se requiere del contacto directo entre ambos tipos celulares y su interacción bidireccional.

La comunicación de las células mesenquimales y osteoblastos con las células endoteliales es compleja e involucra: a) la interacción directa célula- célula mediante uniones gap que comunica los citoplasmas de ambos tipos celulares. b) La activación de vías de señalización mediante factores que son liberados al medio extracelular por ambos tipos celulares. Por ejemplo las células endoteliales secretan BMP-2, factor de crecimiento de la insulina (IGF), endotelina 1 (ET-1), TGF- β y FGF, entre otros; los cuales tal como se mencionó en la sección 1.4, modulan la diferenciación de células mesenquimales hacia un

fenotipo osteoblástico. Por su parte, durante este proceso de diferenciación osteoblástica, las células osteoprogenitoras incrementan la expresión de factores tales como las VEGF, BMP-2, BMP-4, BMP-7, TGF- β y PTH, entre otros; que además de regular el proceso de diferenciación osteogénica, también influyen en la supervivencia, proliferación y diferenciación de células endoteliales hacia un fenotipo vascular (ver Figura 23)¹⁴⁸. A pesar de que hay muchos factores implicados en la comunicación de entre las células formadoras de hueso (MSCs, osteoprogenitoras y osteoblastos) y las células endoteliales, se considera que el que tiene mayor relevancia es el VEGF, ya que induce la proliferación, migración y formación de estructuras similares a capilares^{157,158}.

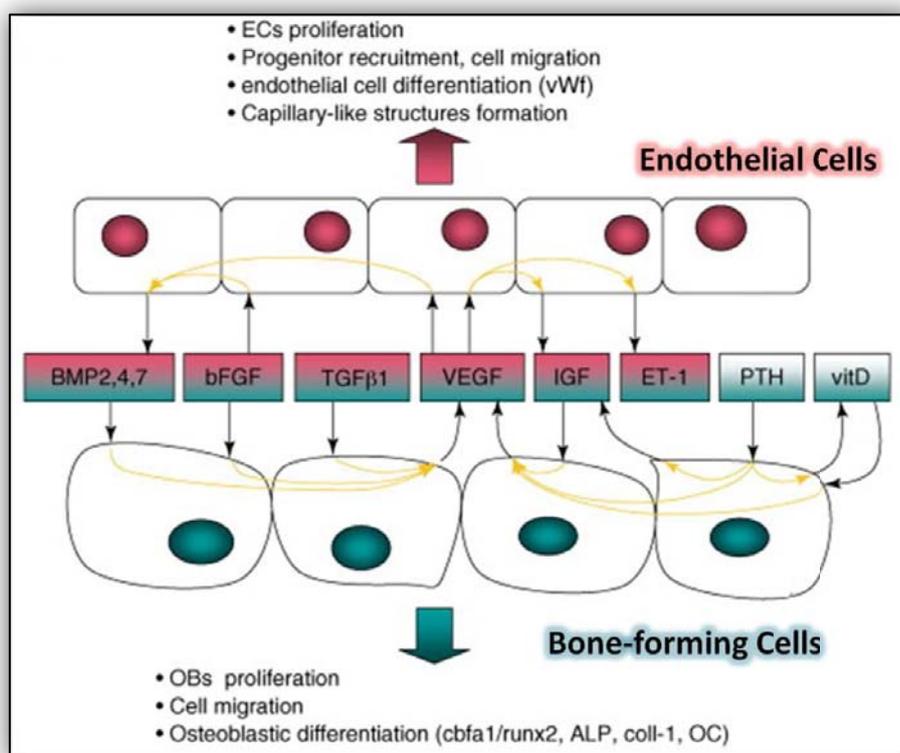


Figura 23. Factores implicados en la comunicación entre las células formadoras de hueso (MSCs, osteoprogenitoras y osteoblastos) y las células endoteliales. Algunos de los factores implicados son: Proteínas morfogénicas del hueso 2, 4 y 7 (BMP2, 4, 7), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de la insulina (IGF), endotelina 1 (ET-1), paratohormona (PTH) y vitamina D (vit D). La interacción de estos factores con ambos tipos celulares (flechas negras) induce la activación de cascadas de señalización que activan la expresión de otros factores o proteínas (flechas amarillas) que regulan funciones celulares tales como la proliferación, migración y diferenciación celular. Modificado de Grellier y col.¹⁴⁸

2. OBJETIVOS

Es conocido que las células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADSCs) tienen un gran potencial dentro del campo de la ingeniería de tejidos debido a su fácil obtención, capacidad de diferenciación a múltiples linajes, propiedades Inmunomoduladoras y producción de factores proangiogénicos y antiapoptóticos. También es conocido que dentro de la ingeniería de tejidos del hueso, los materiales cerámicos de fosfato de calcio son ampliamente utilizados como biomateriales, debido a su similitud con la fase mineral del tejido óseo. Además, su combinación con proteínas de matriz extracelular (ECM) o factores osteoinductores (por ejemplo factores de crecimiento y células endoteliales, entre otros) puede incrementar la bioactividad del constructo células-biomaterial. A pesar de ello, pocos trabajos existen en la literatura que evalúen la repuesta (biocompatibilidad y diferenciación osteogénica) de células ADSCs frente a biomateriales cerámicos de fosfatos de calcio, empleando recubrimientos con proteínas de ECM y/o el cocultivo de células ADSCs con células endoteliales, como factores claves para el incremento de la inducción de las células hacia linajes osteogénicos.

Hipótesis

El recubrimiento de materiales cerámicos de fosfato de calcio con proteínas de matriz extracelular (ECM) claves en el proceso de diferenciación osteogénica, tales como el colágeno (COL) y la fibronectina (FN), puede influenciar positivamente la inducción del proceso de diferenciación osteogénica de células ADSCs. Asimismo, el cocultivo de células ADSCs con células endoteliales, puede potenciar la diferenciación osteogénica de las células ADSCs y angiogénica de las endoteliales. Posiblemente la combinación de estos factores clave, puede contribuir a la creación de un constructo células-biomaterial con potencial uso en la reconstrucción de defectos óseos.

Objetivo Principal

Evaluar la biocompatibilidad y analizar el proceso de diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo (ADSCs) frente a materiales cerámicos de fosfato de calcio con o sin proteínas de matriz extracelular y células endoteliales.

Para cumplir con este objetivo se definieron los siguientes subobjetivos:

- ❖ Aislar y caracterizar células madre derivadas de tejido adiposo humano (hADSCs) y canino (cADSCs) mediante su inmunofenotipo y capacidad de diferenciación a múltiples linajes.

- ❖ Estudiar la capacidad de diferenciación osteogénica de células hADSCs y cADSCs en comparación con líneas celulares de osteoblastos murinos (MC3T3-E1) y humanos (hFOB 1.19).
- ❖ Estandarizar la metodología de trabajo con biomateriales cerámicos y estudiar la toxicidad, adhesión y proliferación (biocompatibilidad) del material cerámico KeraOs® con o sin recubrimientos empleando fibroblastos dérmicos humanos (HDF).
- ❖ Comparar la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica de células hADSCs frente a los biomateriales Bio-Oss®, Bone Ceramic®, Cerasorb® y KeraOs®.
- ❖ Valorar el efecto del recubrimiento del material KeraOs® con fibronectina, colágeno y una mezcla de fibronectina/colágeno sobre la biocompatibilidad y la expresión de diferentes marcadores de diferenciación osteogénica.
- ❖ Evaluar el efecto del cocultivo de las células hADSCs y endoteliales (HUVEC) sobre la respuesta osteogénica y angiogénica.

Como un objetivo accesorio, nos planteamos estudiar el efecto del biomaterial KeraOs® combinado con fibronectina y células madre mesenquimales autólogas derivadas de tejido adiposo, sobre la regeneración ósea de perros Beagles. Dicho estudio se realizó en colaboración con la unidad de cirugía bucal y maxilofacial de la Universidad de Barcelona y el grupo de investigación de patología y terapéutica odontológica y maxilofacial del IDIBELL. Nuestra participación consistió en el aislamiento de las células madres derivadas de tejido adiposo canino y su cultivo sobre el material cerámico KeraOs® para su implantación en los defectos mandibulares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos, Materiales y Equipos

3.1.1 Soluciones Tampón

Solución	Abreviatura	Composición
Tampón fosfato salino Dulbecco`s 1X	D-PBS	H ₂ O , 0.1M NaCl, 2.6 M KCl, 1.4 M KH ₂ PO ₄ , 8 mM Na ₂ HPO ₄ , pH=7.4
Tampón fosfato salino Dulbecco`s 1X – EDTA	D-PBS/EDTA	D-PBS , 0.5M EDTA, pH=7.4
Tampón fosfato salino Dulbecco`s 1X con calcio y magnesio	D-PBS Ca ⁺² Mg ²⁺	D-PBS, 0.5 mM MgCl ₂ .6 H ₂ O, 1.12 mM CaCl ₂ . 2 H ₂ O, pH=7.4
Tampón fosfato (1M)	PB	1 M K ₂ HPO ₄ , 1 M NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O.
Tampón de lisis de eritrocitos	EBL	H ₂ O, 5.7 mM KO ₂ HPO ₄ , 155mM NH ₄ CL, 0.1 mM EDTA, pH 7.2
Tampón FACS	TF	D-PBS Ca ⁺² Mg ²⁺ , 400 µg/mL BSA
Tampón de permeabilización	TP	D-PBS, 20mM Glicina, 0.1 % Tritón X-100.
Tampón de bloqueo	TB	D- PBS, 20mM Glicina, 1 % BSA
Tampón de lavados	TL	D- PBS, 20mM Glicina

Tabla 7. Soluciones Tampón

3.1.2 Medios de Cultivo comerciales

Producto	Abreviatura	Casa comercial	Referencia
Medio Eagle modificado por Dulbecco 1 g/L Glucosa	DMEM 1 g/L	Lonza	BE12-707F
Medio Eagle modificado por Dulbecco 4,5 g/L Glucosa	DMEM 4 g/L	Lonza	BE12-917F
Medio Ham`s F12	Ham`s F12	Lonza	BE12-615F
Medio Mínimo esencial 199	MEM 199	Gibco	22571-020
Medio Mínimo esencial alfa	α MEM	Gibco	22571-020
Medio endotelial basal 2	EBM-2 TM	Lonza	CC3162
Medio de crecimiento endotelial 2 (kit)	EGM-2 TM	Lonza	CC3156

Tabla 8. Medios de cultivo comerciales

3.1.3 Suplementos de medios de cultivo

Producto	Abreviatura	Concentración	Casa comercial	Referencia
Suero Fetal Bovino	FBS	100%	Lab Clinic	A15-101
Suero de Caballo	HS	100%	Gibco	16050-122
Penicilina/Estreptomicina	P/E	10.000 U/mL - 10.000 µg/mL	Lonza	DE17602F
Geneticina G418	G418	500 mg/mL	Gibco	11811-031
L-Glutamina	L-Gln	200 mM	Lonza	17905C
HEPES		1 M	Lonza	BE17-737
Piruvato sódico	Pyr	100 mM	Lonza	BE13-115
Suplemento de crecimiento endotelial	ECGS	3 mg/mL	Upstate	02-102
Heparina	Hep	10 mg/mL	Sigma	H3149
Ácido ascórbico		50 mg/mL	Sigma	A4403
Dexametasona	DMS	1 mM	Sigma	D-4902
Glicerol 2 fosfato	Gly 2P	100 mM	Sigma	G9891
Solución Insulina- Transferrina-Selenio- Etanolamina	ITS	100X	Gibco	51500-056
Factor de crecimiento transformante	TGF-β1	2 mg/mL	R&D Systems	240-B
Hydrocortisona		50 µg/mL	Sigma	H0888
1-Isobutil-1-metilxantina	IBMX	45 mM	Sigma	I5879
Indometacina		20 mM	Sigma	I7378
Insulina		174 µM	Sigma	I3536
L-Prolina	L-Pro	1M	Sigma	P5607

Tabla 9. Suplementos de medios de cultivo

3.1.4 Enzimas

Enzima	Concentración	Casa comercial	Referencia
Tripsina-EDTA	0.5 g/L- 0.2 g/L	Sigma	T3924
Tripsina-EDTA Endo	2.5 g/L- 0.38 g/L	Gibco	25200-056
Colagenasa tipo II-S	25 g/mL	Sigma	C-1764

Tabla 10. Enzimas

3.1.5 Medios de Cultivo celular

Medio de cultivo	Abreviatura	Composición
Medio proliferativo	PM	DMEM 1 g/L, 10 % FBS, 100 U/mL P/E, 2 mM L-Gln y 10 mM HEPES
Medio proliferativo MC3T3	PM-MC3T3	α -MEM, 20 % FBS, 100 U/mL P/E, 2 mM L-Gln
Medio osteogénico MC3T3	OM MC3T3	α -MEM, 20 % FBS, 100 U/mL P/E, 2 mM L-Gln, 50 μ g/mL ácido ascórbico, 50 μ g/mL Kanamicina.
Medio hFOB 1.19	PM hFOB 1.19	Ham's F12 y DMEM 4 g/Lsin rojo fenol (proporción 1:1), 100 U/mL P/E, 2 mM L-Gln y 0,2 mg/mL G418
Medio endotelial basal	EB	MEM 199, 20 % FBS, 100 U/mL P/E, 2 mM L-Gln, 1mM piruvato sódico y 10 mM HEPES
Medio endotelial	EM	MEM 199, 20 % FBS, 100 U/mL P/E, 2 mM L-Gln, 1 mM piruvato sódico y 10 mM HEPES, 0.1 mg/mL Heparina y 30 μ g/mL ECGS
Medio endotelial basal 2	EBM-2	EBM-2 TM , 2 % FBS
Medio endotelial de crecimiento 2	EGM-2	EBM-2 TM , 2 % FBS, 0.4 % hFGF-2, 0.1 % VEGF, 0.1 % R3-IGF-1, 0.1% hEGF, 0.04 % hidrocortisona, 0.1 % ácido ascórbico, 0.1 % heparina y 0.1 % gentamicina (GA-100)
Medio osteogénico	OM	DMEM 1 g/L, 10% FBS, 100 U/mL P/E, 2 mM L-Gln , 10 mM HEPES, 50 μ g/mL Ac. Ascórbico, 1 μ M DMS y 10mM Gly 2P.
Medio adipogénico	AM	DMEM 1 g/L, 10% FBS, 100 U/mL P/E, 2 mM L-Gln, 10 mM HEPES, 0.5 mM IBMX, 1 μ M DMS, 200 μ M Indometacina y 10 μ M Insulina
Medio miogénico	MM	DMEM 1 g/L, 10% FBS, 5% HS, 100 U/mL P/E, 0.1 μ M DMS y 50 μ M Hidrocortisona
Medio condrogénico	CM	DMEM 1 g/L, 170 μ M Ac. Ascórbico, 350 μ M L-Pro y 0,4% ITS.

Tabla 11. Medios de cultivo celular

3.1.6 Proteínas de Recubrimiento

Nombre	Abreviación	Especie	Casa comercial	Referencia	Concentración
Fibronectina	FN	Humano	BD	356008	1 mg/mL
Colágeno tipo I: Theracol (GMP)	COL	Humano	Sewon Cellontech Co., Ltd.	SWC-COL10	10 mg/mL
Albúmina	HAS	Humano	Sigma	A9080	100%
Plasma AB de suero	P	Humano	Sigma	H4522	100%
Gelatina tipo A		Porcino	Sigma	G1890	1% (P/V)

Tabla 12. Proteínas empleadas para el recubrimiento de superficies

3.1.7 Kits

Nombre	Componentes	Casa comercial	Referencia
Sensolyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay	<ul style="list-style-type: none"> • PNPP Solution substrate • Buffer de lisis 10X • Stop solution • Triton 100X • Alkaline phosphate standard 	AnaSpec/TebuBio	72146
BCA protein Assay Kit	<ul style="list-style-type: none"> • BCA reagent A • BCA reagent B • Albúmin standard 	Pierce	23227
RNeasy MinElute Cleanup Kit	<ul style="list-style-type: none"> • RNeasy MinElute Spin columns • RLT buffer • REP buffer 	Qiagen	74204
SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix	<ul style="list-style-type: none"> • 2X RT Reaction Mix • RT Enzyme Mix 	Invitrogen	11752-50
SyBR®GreenER™ qPCR SuperMix 2X	<ul style="list-style-type: none"> • dNTPs • Buffer • DNA polimerasa • SyBR Green 	Invitrogen	11761-500
RT ² First Strand cDNA kit	<ul style="list-style-type: none"> • GE: 5X gDNA Elimination Buffer • BC3: 5X Reverse Transcription Buffer 3 • P2: Primer and External Control Mix • RE3: RT Enzyme Mix 3 	Qiagen	C-03/330401
Human Osteogenesis RT ² Profiler™ PCR Array	<ul style="list-style-type: none"> • RT² SYBR Green/ROX PCR Master Mix • Human Osteogenesis RT² Profiler™ PCR Array 96-well Plate 	SABioscience/ Qiagen	PAHS-026C-2

Tabla 13. Kits

3.1.8 Otros Reactivos

Producto	Abreviatura	Concentración	Casa comercial	Referencia
Alamar Blue®	AB	100 %	Invitrogen	DAL1100
Reactivo de proliferación WST-1	WST-1	100 %	Roche	11644807001
Paraformaldehído	PF	4 %		
Glutaraldehído		2,5 %		
Azul de Toluidina		1 % (P/V)	Fluka	89640
Rojo de Alizarina		2 % (P/V) pH= 5.5	Sigma	A-5533
Oil Red O		0.3 % (P/V)	Sigma	O0625
Azul Alcian		1 % (P/V) pH= 2.5	Sigma	A3157
Falloidina-TRITC		5 mg/mL	Sigma	P1951
BisBenzimide trihydrochloride H33342 (Hoescht)		1 mM	Sigma	14533
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium			Sigma	F4680
Vybrant™ DIL			Molecular Probes	V-22885
Vybrant™ DIO			Molecular Probes	V-22886
Trizol			Invitrogen	15596-026
Cloroformo		≥ 99.5%	Sigma	C2432
Etanol		Absoluto	Panreac	131086
Isopropanol		≥99.5%	Panreac	631090

Tabla 14. Otros reactivos

3.1.9 Material de cultivo celular

- Botellas de cultivo T75, Nunc (Cat # Z707546).
- Placas de 12 pocillos, Falcon (Cat # 734-0055)
- Placas de 24 pocillos, Falcon (Cat # 734-0020)
- Placas de Petri de 35 mm, Falcon (Cat # 353001)
- Malla de nylon de 100 μm , Falcon (Cat # 352360)
- Placas de 12 pocillos Netwell™ Inserts, Corning (Cat # 3480).

3.1.10 Equipos

- Microscopio de contraste de fases, Nikon TS100.
- Microscopio estereoscópico, Leica MZFL III. CCiTUB
- Microscopio fluorescencia invertido, Leica DMIRB. CCiTUB
- Microscopio confocal, Leica SP2. CCiTUB
- Microscopio de Barrido, QUANTA 200. CCiTUB
- Lector de placas absorbancia y fluorescencia. TECAN Infinity PRO 200.
- Termociclador (PCR), Eppendorf.
- Termociclador de PCR en tiempo real, Applied Biosystems StepOne™ System.
- Termociclador de PCR en tiempo real (arrays), Applied Biosystems StepOnePlus™ System.
- Citómetro de flujo. BekmanCoulter Cutomics FC500. CCiTUB
- Instalaciones de cultivo celular (cabinas de flujo laminar vertical, incubadores de CO₂, baño de 37°C, entre otros).

3.2 Tipos celulares: características y condiciones de mantenimiento de cultivos sobre plástico

3.2.1 Células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo humano (hADSCs)

Origen: aislamiento a partir de tejido adiposo humano (ver sección 3.3.1)

Tipo celular: línea primaria de células progenitoras mesenquimales humanas.

Morfología: células adherentes con morfología tipo fibroblastoide.

Medio de cultivo de mantenimiento y proliferación: medio PM (ver Tabla 11)

Descongelación: se descongela el criovial en baño a 37°C con agitación manual. Rápidamente se añade 1 mL de medio PM y se centrifuga durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio PM. Por último se siembran todas las células en una botella T75 con 10 mL de medio PM y se introducen en el incubador.

Condiciones de Incubación: 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad.

Cambio de medio: cada 3 a 4 días

Subcultivo: alcanzada una confluencia máxima del 70%, se lava el cultivo con 5 mL de D- PBS y se des-adhieren las células utilizando 40 µL/cm² de tripsina/EDTA. A continuación se añaden 140 µL/cm² de medio PM para inactivar la tripsina y se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio PM. Finalmente se siembran entre 5.000 y 7.000 cel/cm² en una botella T75 con 10 mL de medio PM y se introducen en el incubador.

Criopreservación: 1x10⁶ células en 1 mL de medio de congelación (90% FBS y 10% DMSO) frío. Almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido.

3.2.2 Células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo canino (cADSCs)

Origen: aislamiento a partir de panículo adiposo de perros de raza Beagle (ver sección 3.3.2)

Tipo celular: línea primaria de células progenitoras mesenquimales caninas.

Morfología: células adherentes con morfología tipo fibroblastoide.

Medio de cultivo de mantenimiento y proliferación: medio PM (ver Tabla 11)

Descongelación: se descongela el criovial en baño a 37 °C con agitación manual. Rápidamente se añade 1 mL de medio PM y se centrifuga durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio PM. Finalmente se siembran todas las células en una botella T75 con 10 mL de medio PM y se introducen en el incubador.

Condiciones de Incubación: 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad.

Cambio de medio: cada 3 a 4 días

Subcultivo: alcanzada una confluencia máxima del 70 %, se lava el cultivo con 5 mL de D- PBS y se desadhieren las células utilizando 40 µL/cm² de tripsina/EDTA. A continuación se añaden 140 µL/cm² de medio PM para inactivar la tripsina y se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio PM. A continuación se siembran entre 5.000 y 7.000 cel/cm² en una botella T75 con 10 mL de medio PM y se introducen en el incubador.

Criopreservación: 1x10⁶ células en 1 mL de medio de congelación (90% FBS y 10% DMSO) frío. Almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido.

3.2.3 Línea celular de osteoblastos murinos MC3T3-E1 (MC3T3)

Origen: células procedentes de calvaria embrionaria de ratón adquiridas en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (#ACC210).

Tipo celular: línea celular de osteoblastos murinos.

Morfología: células adherentes con morfología tipo fibroblastoide.

Medio de cultivo mantenimiento y proliferación: medio PM MC3T3 (ver Tabla 11)

Descongelación: se descongela el criovial en baño a 37 °C con agitación manual. Rápidamente se añade 1mL de medio PM MC3T3 y se centrifuga 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio de cultivo. Por último se siembran todas las células en una botella T75 con 10 mL de PM MC3T3 y se introducen en incubador.

Condiciones de Incubación: 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad.

Cambio de medio: cada 2 a 3 días

Subcultivo: alcanzada una confluencia máxima del 80 %, se lava el cultivo con 5 mL de D- PBS y se desadhieren las células utilizando 40 µL/cm² de tripsina/EDTA. A continuación se añade 160 µL/cm² de medio PM MC3T3 para inactivar la tripsina y se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio. A continuación se siembran entre 10.000 y 12.000 cel/cm² en una botella T75 con 10 mL de medio PM MC3T3 y se introducen en el incubador.

Diferenciación osteogénica: sembrar las células a 10.000 cel/cm² y mantener a 37°C, 5% CO₂ y 90% humedad durante 21 días con medio MC3T3 OM (ver Tabla 11). Realizar cambios de medios cada 3-4 días.

Conservación: congelar 1x10⁶ células en 1 mL de medio de congelación (90 % FBS y 10 % DMSO) frío. Almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido.

3.2.4 Línea de osteoblastos embrionarios humanos (hFOB 1.19)

Origen: células procedentes de hueso embrionario humano adquiridas en la ATCC (CRL-11372).

Tipo celular: línea celular de osteoblastos embrionarios inmortalizada con antígeno T SV40.

Morfología: células adherentes con morfología tipo fibroblástica.

Medio de cultivo mantenimiento y proliferación: medio PM hFOB 1.19 (ver Tabla 11).

Descongelación: se descongela el criovial en baño a 37 °C con agitación manual. Rápidamente se añade 1 mL de medio PM hFOB. 1.19 y se centrifuga 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio de cultivo. Por último se siembran todas las células en una botella T75 con 10 mL de medio PM hFOB. 1.19 y se introducen en incubador.

Condiciones de Incubación: temperatura de 33.5 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad.

Cambio de medio: cada 2 a 3 días.

Subcultivo: alcanzada una confluencia máxima del 80 % confluencia, se lava el cultivo con 5 mL de D- PBS y se desadhieren las células utilizando 40 µL/cm² de tripsina/EDTA. A continuación se añade 160 µL/cm² de medio PM hFOB. 1.19 para inactivar la tripsina y se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio. A continuación se siembran entre 10.000 y 12.000 cel/cm² en una botella T75 con 10 mL de medio PM hFOB. 1.19 y se introducen en el incubador.

Diferenciación osteogénica: sembrar las células a 10.000 cel/cm² y mantener a 39,5 °C, 5% CO₂ y 90% humedad durante 21 días con medio hFOB 1.19 PM (ver Tabla 11). Realizar cambios de medios cada 3-4 días.

Conservación: congelar 1x10⁶ células en 1 mL de medio de congelación (90% FBS y 10% DMSO). Almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido.

3.2.5 Fibroblastos dérmicos humanos (HDF)

Origen: células procedentes de piel de fimosis de niño.

Tipo celular: línea primaria de fibroblastos dérmicos humanos dérmicos.

Morfología: células adherentes con morfología tipo fibroblástica.

Medio de cultivo de mantenimiento y proliferación: medio PM (ver Tabla 11).

Descongelación: se descongela el criovial en baño a 37 °C con agitación manual. Rápidamente se añade 1 mL de medio PM y se centrifuga durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio PM. Por último se siembran todas las células en una botella T75 con 10 mL de medio PM y se introducen en el incubador.

Condiciones de Incubación: 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad.

Cambio de medio: cada 3 a 4 días

Subcultivo: alcanzada una confluencia máxima del 80 %, se lava el cultivo con 5 mL de D- PBS y se desadhieren las células utilizando 40 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de tripsina/EDTA. A continuación se añaden 160 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de medio PM para inactivar la tripsina y se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2 mL de medio PM. Finalmente se siembran 10.000 cel/cm^2 en una botella T75 con 10 mL de medio PM y se introducen en el incubador.

Criopreservación: 1×10^6 células en 1 mL de medio de congelación (90% FBS y 10% DMSO) frío. Almacenamiento en nitrógeno líquido.

3.2.6 Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)

Origen: aislamiento a partir de vena de cordón umbilical humano.

Tipo celular: cultivo primario de células endoteliales venosas humanas.

Morfología: células adherentes con morfología tipo epitelioide.

Medio de cultivo y proliferación: medio EM (ver Tabla 11).

Acondicionamiento de la botella de cultivo: para que las células HUVEC se adhieran a la botella de cultivo es necesario realizar un recubrimiento de la superficie con gelatina tipo A. Para ello se añaden 3 mL de la solución de gelatina al 1 % a una botella T75 incubando durante 2 horas a 37 °C. A continuación se hace un lavado con 5 mL de D-PBS, se añaden 10 mL de medio BM y se incuba la botella durante 20 min a 37 °C, 5% CO_2 y 90 % humedad.

Descongelación: se descongela el criovial en el baño a 37°C con agitación manual. Rápidamente se añade 1 mL de medio BM y se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 10 mL de medio EM. Por último se elimina el medio BM de la botella acondicionada y se siembran todas las células provenientes del criovial. Finalmente se introducen en el incubador.

Incubación: temperatura de 37 °C, 5 % CO_2 y 90 % humedad.

Cambio de medio: cada 2 a 3 días

Subcultivo: alcanzada una confluencia máxima del 80 %, se realizan dos lavados al cultivo con 5 mL de PBS-EDTA y desadhieren las células utilizando 40 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de tripsina/EDTA endo (ver Tabla 10). A continuación se añaden 140 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de medio BM para inactivar la tripsina y se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 10 mL de medio EM. A continuación se siembran entre 12.000 y 15.000 cel/cm^2 en una botella T75 previamente acondicionada.

Criopreservación: 1×10^6 células en 1 mL de medio de congelación (90% FBS y 10% DMSO) frío. Almacenamiento en nitrógeno líquido.

3.3 Aislamientos celulares

3.3.1 Células hADSCs

Las células madre mesenquimales humanas han sido obtenidas a partir de fluidos residuales de tejido adiposo subcutáneo (lipoaspirados) de 4 donantes suministrados por la Clínica Planas de Barcelona (Dr. Jorge Planas y Dr. Carlos del Cacho). Todas las muestras se han obtenido previo consentimiento informado para la investigación. Las características de los donantes se detallan en la Tabla 15.

El aislamiento de las células se ha realizado empleando la metodología descrita por Zuk y col.,⁸⁶ con algunas modificaciones realizadas previamente por miembros de nuestro grupo de laboratorio, las cuales permiten incrementar la eficiencia del aislamiento (ver Figura 24).

Las muestras de lipoaspirados han sido suministradas en contenedores estériles Medi-Vac® y antes de iniciar el proceso se han mantenido en reposo a temperatura ambiente hasta observar la formación de dos fases claramente definidas. La inferior corresponde a la fase líquida sanguinolenta y la superior corresponde al tejido adiposo el cual presenta un color amarillento y consistencia semisólida. Posteriormente se aplicó el protocolo que se describe a continuación:

- a) Bajo condiciones de esterilidad se transfiere toda la fase adiposa a una botella estéril y se añade un volumen de D-PBS para lavar el tejido. Por ejemplo a 300 mL de tejido adiposo se le añaden 300 mL de D-PBS.
- b) El lavado se lleva a cabo pipeteando varias veces la muestra con el D-PBS tras lo cual se deja en reposo hasta que se separen nuevamente dos fases. Por último se extrae la fase acuosa-sanguinolenta, para lo cual se introduce la pipeta hasta el fondo de la botella y se aspira toda la fase líquida. Estos lavados se repiten varias veces hasta que la fase acuosa tenga un aspecto traslúcido.
- c) Se disgrega el tejido haciendo una digestión con 0.16 mg/mL de colagenasa tipo I a 37 °C durante 35 min con agitación manual cada 5 min. Finalizado el tiempo se neutraliza la actividad enzimática con 10 mL DMEM 1 g/L suplementado con 10 % de FBS.
- d) Se centrifuga la muestra a 1.200 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sedimento obtenido (fracción vascular estromal) se resuspende con 20 mL de Tampón de lisis (ver Tabla 7) y se incuba durante 10 min a temperatura ambiente.
- e) Se centrifuga la muestra a 1.200 rpm durante 10 min y el sedimento obtenido se resuspende en 5 mL de medio PM. Seguidamente se filtra la suspensión celular a través de una malla de nylon estéril de 100 µm.

- f) A la suspensión celular filtrada se le añaden 5 mL de medio PM y se realiza un conteo del número de células utilizando una cámara de Neubauer.
- g) Por último se realiza la siembra en una botella T75 con 12 mL medio PM a una densidad de 1×10^5 cel/cm² y se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂ y 90 % humedad.
- h) Tras 24 horas se realiza un lavado con 10 mL D-PBS con la finalidad de eliminar las células no adheridas y seguidamente se añaden 10 mL medio PM fresco al cultivo.
- i) El mantenimiento de los cultivos, expansiones, congelaciones y descongelaciones se realizan tal como se describe en la sección 3.2.1

Donante	Sexo	Edad	Tipo de extracción	Región de extracción
15	Mujer	20	Filtración	Trocánter derecho e izquierdo
23	Mujer	29	Filtración	Muslo derecho e izquierdo
30	Mujer	42	Filtración	Flancos
32	Hombre	42	Filtración	Abdomen

Tabla 15. Características de los donantes de muestras de lipoaspirados humanos

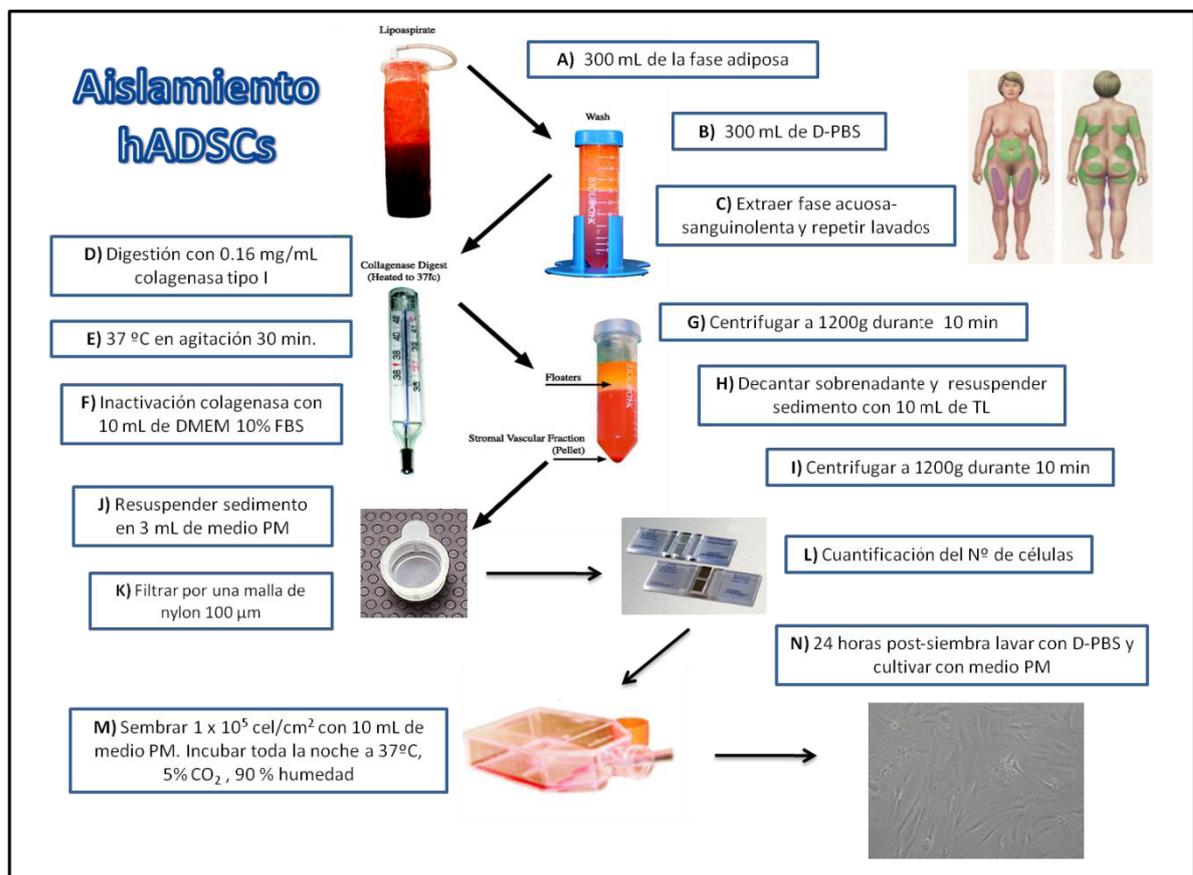


Figura 24. Aislamiento de células madre de tejido adiposo humano.

3.3.2 Células cADSCs

Las células madre mesenquimales caninas han sido obtenidas a partir de panículo adiposo extraído del área abdominal de 18 perros de raza Beagle mantenidos en el estabulario de Bellvitge de la Universitat de Barcelona. Para realizar el aislamiento se ha empleado un protocolo similar al descrito para el aislamiento de células madre de tejido adiposo humano. Sin embargo, debido a la naturaleza sólida de la muestra canina se realizaron modificaciones importantes en la fase inicial del proceso.

Las muestras de panículo adiposo con un peso aproximado de 10 gramos han sido suministradas en contenedores plásticos estériles. Posteriormente se aplicó el protocolo que se describe a continuación:

- a) Bajo condiciones de esterilidad se transfiere todo el tejido a tubos estériles de 50 mL y se realizan varios lavados con 25 mL de D-PBS hasta observar la fase acuosa con aspecto traslúcido.
- b) Se transfiere el tejido a una cápsula de petri y empleando material quirúrgico estéril se secciona el tejido en pequeños trozos (ver Figura 25)
- c) Se transfiere la muestra seccionada a un tubo estéril de 50 mL y se hacen varios lavados con 25 mL de D-PBS hasta eliminar la fase sanguinolenta.
- d) Se disgrega el tejido haciendo una digestión con colagenasa tipo I (0.20 mg/mL) a 37 °C durante 35 min con agitación manual cada 5 min. La actividad enzimática se neutraliza con DMEM 1 g/L suplementado con 10 % de FBS.
- e) A partir de este punto se continúa el proceso tal como se describió en el aislamiento de células progenitoras de tejido adiposo humano (ver sección 3.3.1 letras e-i).
- f) El mantenimiento de los cultivos, expansiones, congelaciones y descongelaciones se realizan tal como se describe en sección 3.2.2

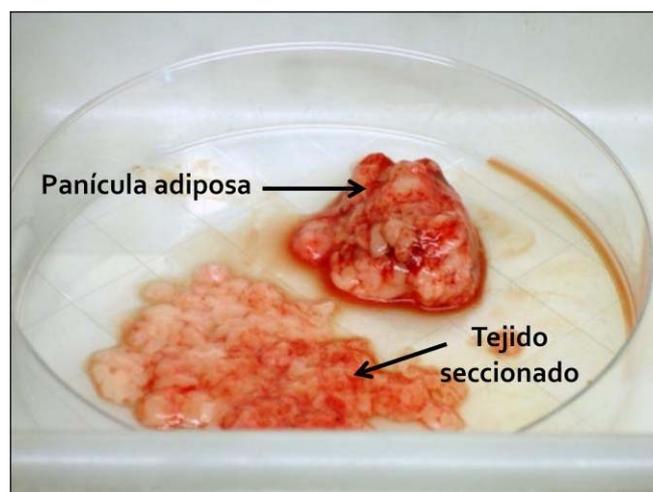


Figura 25. Panícula adiposa extraída del área abdominal de perros de raza Beagle.

3.4 Caracterización de células hADSCs y cADSCs

Con la finalidad de caracterizar las células aisladas (hADSCs y cADSCs) se han seguido los tres criterios establecidos por la International Society for Cellular Therapy ⁷⁸. **a)** Capacidad de adherencia de las células al plástico. **b)** Expresión ≥ 95 % de antígenos de superficie CD73, CD90 Y cd105 y expresión ≤ 2 % de CD14, CD34, CD45 y HLA-DR. **c)** Capacidad de diferenciación a múltiples linajes como por ejemplo adipogénico, condrogénico y osteogénico.

3.4.1 Expresión de antígenos de superficie: Citometría de flujo

Es una técnica que permite analizar cuantitativamente el fenotipo celular a través de la detección de antígenos que han sido marcados con anticuerpos que están unidos a una molécula fluorescente. El protocolo utilizado para detectar los antígenos de superficie característicos de células madre (ver Tabla 16) se describe a continuación:

- a)** Bajo condiciones de esterilidad se tripsinizan los cultivos de hADSCs y cADSCs de pases 1 a 6 y se resuspenden en tampón TF (ver Tabla 7) a una concentración de 100.000 cel/mL. Por cada anticuerpo a detectar se han de marcar al menos 100.000 células.
- b)** Se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1.000 rpm y se resuspende el sedimento con tampón TF frío (4°C).
- c)** Se realiza una centrifugación a 13.200 rpm durante 10 seg, se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1 mL de tampón TF (ver Tabla 7) suplementado con 20 % de FBS. Bajo esta condición se incuba la muestra durante 10 min a temperatura ambiente.
- d)** Se añaden 2 μ L de anticuerpo y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Es importante destacar que anticuerpos asociados a moléculas fluorescentes diferentes se utilizaron de manera simultánea en la misma muestra. Las parejas empleadas fueron: CD105 FITC/CD14 PE; CD34 FITC/CD73 PE; CD90 FITC/ CD45 PE; CD271 PE/ HLADR II FITC y PE/FITC.
- e)** Finalmente se realiza la lectura en el citómetro de flujo. Los datos obtenidos corresponden al porcentaje de células que han sido marcadas por el anticuerpo, menos el valor de su respectivo control negativo (IgG1 FITC o IgG1 FITC según el marcaje de cada anticuerpo).

Antígeno	Marcaje (fluorocromo)	Casa comercial	Dilución	Referencia
CD105	FITC	Serotec	1/25	MCA1557F
CD14	PE	BD Pharmigen	1/25	557742
CD34	FITC	BD Pharmigen	1/25	555821
CD73	PE	BD Pharmigen	1/25	550257
CD90	FITC	BD Pharmigen	1/25	555595
CD45	PE	BD Pharmigen	1/25	557748
HLADR II	FITC	BD Pharmigen	1/25	347400
CD271	PE	BD Pharmigen	1/25	557196
FITC-mouse IgG1	FITC	BD Pharmigen	1/25	555748
PE-mouse IgG1	PE	BD Pharmigen	1/25	555749

Tabla 16. Anticuerpos utilizados para caracterización de hADSCs y cADSCs mediante citometría de flujo.

Fluorocromo FITC: Isocianato de fluoresceína. Excitación: 490nm -Emisión: 514nm.

Fluorocromo PE: ficoeritrina. Excitación: 480nm - Emisión: 578nm.

3.4.2 Diferenciación a múltiples linajes

Para demostrar la capacidad de diferenciación a múltiples linajes, las hADSCs y cADSCs aisladas se sometieron a condiciones de cultivo particulares para inducir su diferenciación osteogénica, adipogénica, miogénica y condrogénica. Los protocolos empleados se describen a continuación:

3.4.2.1 Diferenciación Osteogénica

- a) Bajo condiciones de esterilidad se tripsinizan los cultivos de hADSCs y cADSCs, se cuentan las células en cámara de Neubauer y se siembran en placas de 24 pocillos a una densidad de 10.000 cel/cm² con 1 mL/pocillo de medio PM.
- b) Las placas sembradas se incuban a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad durante tres horas.
- c) Tras verificar la correcta adhesión de las células en el microscopio de contraste de fases, se elimina el medio de cultivo y se añade 1 mL/pocillo de medio OM (ver Tabla 11). Se mantienen los cultivos realizando cambios de medio cada 2-3 días.
- d) Transcurridos 7, 14 y/o 21 días, se procede a la verificación del fenotipo osteogénico mediante las técnicas de tinción con rojo de Alizarina (ver sección 3.8.2), detección bioquímica de la producción de fosfatasa alcalina (ver sección 3.11) y detección de marcadores osteogénicos mediante PCR en tiempo real (ver sección 3.14).

3.4.2.2 Diferenciación Adipogénica

- a) Bajo condiciones de esterilidad se tripsinizan los cultivos de hADSCs y cADSCs, se cuentan las células en cámara de Neubauer y se siembran en placas de 24 pocillos a una densidad de 10.000 cel/cm² con 1 mL/pocillo de medio PM.
- b) Las placas sembradas se incuban a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad durante 3 horas.
- c) Tras verificar la correcta adhesión de las células en el microscopio de contraste de fases, se elimina el medio de cultivo y se añade 1 mL/pocillo de medio AM (ver Tabla 11).
- d) Se mantienen los cultivos durante 21 días, realizando cambios de medio cada 3-4 días.
- e) Transcurrido el tiempo indicado se procede a la verificación del fenotipo adipogénico mediante la tinción Oil Red (ver sección 3.8.3).

3.4.2.3 Diferenciación Miogénica

- a) Bajo condiciones de esterilidad se tripsinizan los cultivos de hADSCs y cADSCs, se cuentan las células en cámara de Neubauer y se siembran en placas de 24 pocillos a una densidad de 10.000 cel/cm² con 1 mL/pocillo de medio PM.
- b) Las placas sembradas se incuban a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad durante tres horas.
- c) Tras verificar la correcta adhesión de las células en el microscopio de contraste de fases, se elimina el medio de cultivo y se añade 1 mL/pocillo de medio MM (ver Tabla 11).
- d) Se mantienen los cultivos durante 30 días, realizando cambios de medio cada 3-4 días.
- e) Transcurrido el tiempo indicado, se procede a la verificación del fenotipo miogénico mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos anti MyOD y anti Myosin heavy chain (ver sección 3.9).

3.4.2.4 Diferenciación Condrogénica

- a) Bajo condiciones de esterilidad se tripsinizan los cultivos de hADSCs y cADSCs, se cuentan las células en cámara de Neubauer y se resuspenden a una densidad de 200.000 cel/mL en medio CM (ver Tabla 11).
- b) Se transfiere 1 mL de la suspensión celular a un tubo de 15 mL y se centrifuga durante 10 min a 1.500 rpm. Se descarta el sobrenadante, se resuspende el sedimento en 1 mL de medio CM y se repite la centrifugación.

- c) Se introduce el tubo en el incubador y se mantiene a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % de humedad durante 24 horas.
- d) Transcurrido el tiempo se añade al medio de cultivo TGF-β (10 ng/mL) y se introduce nuevamente en el incubador.
- e) Se mantiene el cultivo durante 28 días realizando cambios de medio cada 3-4 días con medio CM suplementado con TGF-β.
- f) Transcurrido el tiempo indicado se procede a la verificación del fenotipo condrogénico mediante la tinción de Azul Alcian (ver sección 3.8.4).

3.5 Cultivo celular sobre biomateriales cerámicos de fosfato de calcio

3.5.1 Biomateriales

En el presente estudio se utilizó un material cerámico de beta fosfato tricálcico (β-TCP) denominado KeraOs y fabricado por la empresa Keramat, S.L. En las fases iniciales del proyecto, este material se encontraba en fase de desarrollo y fue suministrado en formato de disco y granulado (ver Figura 26). El material en formato de granulado, era el producto de mayor interés para su aplicación médica, y durante el desarrollo del proyecto se registró como un producto comercial denominado KeraOs[®]. Por su parte, el material en formato de disco fue proporcionado para facilitar la estandarización de la metodología, los estudios de biocompatibilidad y el análisis sistemático a nivel celular y molecular.

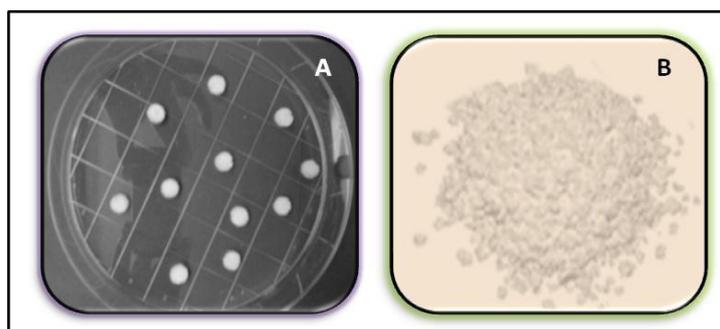


Figura 26. Imágenes representativas del material KeraOs[®]. A) formato de disco. B) formato granulado.

Con la finalidad de comparar la respuesta celular sobre los granulados KeraOs[®], se utilizaron tres materiales comerciales con el mismo formato, ampliamente utilizados en la regeneración de tejido óseo tal como son Bio-Oss[®], Cerasorb[®] y Bone Ceramic[®].

Las principales características de todos los materiales se describen a continuación:

- **KeraOs® (Keramit, Spain)** ¹⁵⁹ : es un material óseo sintético de β -TCP. Tiene una estructura porosa que ha sido producida empleando un molde de poliuretano. Presenta un sistema de macroporos interconectados de un tamaño promedio de 300 μm y microporos distribuidos de manera uniforme con un diámetro medio de 1 μm . Además presenta una porosidad del 27 % ¹⁶⁰. En el formato de granulado, el tamaño de los gránulos oscila entre 0.85 y 0.90 mm. El material proporcionado en formato de disco tiene una superficie de 2.8 cm^2 .
- **Bio-Oss® (Geistlich, Switzerland)** ¹⁶¹ : es material de hueso bovino inorgánico en forma de granulado que contiene calcio y fósforo en un ratio de 2:1 y posee un sistema tipo malla de macro y microporos interconectados. Dado a su origen natural, la porosidad y tamaño de los cristales es similar al hueso humano. El tamaño de los gránulos oscila entre 0.50 y 0.85 mm.
- **Bone Ceramic® (Straumann, Switzerland)** ¹⁶²: es un material óseo de origen sintético en forma de granulado. Es un fosfato de calcio bifásico (BCP) constituido de 60% hidroxiapatita (HA) y 40 % beta fosfato tricálcico (β -TCP). Tiene una porosidad del 90 % y sus macroporos tienen un diámetro de 100-150 μm de diámetro(Kauschke, et al., 2006). El tamaño de los gránulos oscila entre 0.85 y 0.90 mm.
- **Cerasorb® (Curasan, Germany)** ¹⁶³: es un material de origen sintético en forma de granulado constituida por β -TCP puro (pureza > 99 %). Posee un sistema de poros con un tamaño que varía entre 0.1 y 20 μm y están interconectados. Su porosidad es de 35 % \pm 5 % y el tamaño de los gránulos oscila entre 0.55 y 0.85 mm.

Biomaterial	Composición Química	Abreviación	Formato	Tamaño
KeraOs	Fosfato beta tricálcico (β -TCP)	KOd	Disco	2.8 cm^2
KeraOs®	Fosfato beta tricálcico (β -TCP)	KO	Granulado	0.85 - 0.90 mm
Bio-Oss®	Hueso bovino	BO	Granulado	0.50 - 0.85 mm
Bone Ceramic®	Fosfato de calcio bifásico (BCP)	BC	Granulado	0.50 - 0.85 mm
Cerasorb®	Fosfato beta tricálcico (β -TCP)	CS	Granulado	0.85 - 0.90 mm

Tabla 17. Biomateriales utilizados en el estudio.

3.5.2 Cultivo celular sobre biomateriales: acondicionamiento, aplicación de recubrimientos y siembra celular.

La siembra y cultivo de las células ha sido adaptado según el formato de disco o granulados de los biomateriales. Los protocolos llevados a cabo se describen a continuación:

3.5.2.1 Discos

Los discos han sido suministrados en bolsas individuales selladas y estériles. Veinticuatro horas antes de la siembra se transfieren a placas de 24 pocillos (un disco/pocillo) y se colocan tal como se muestran en la Figura 27.

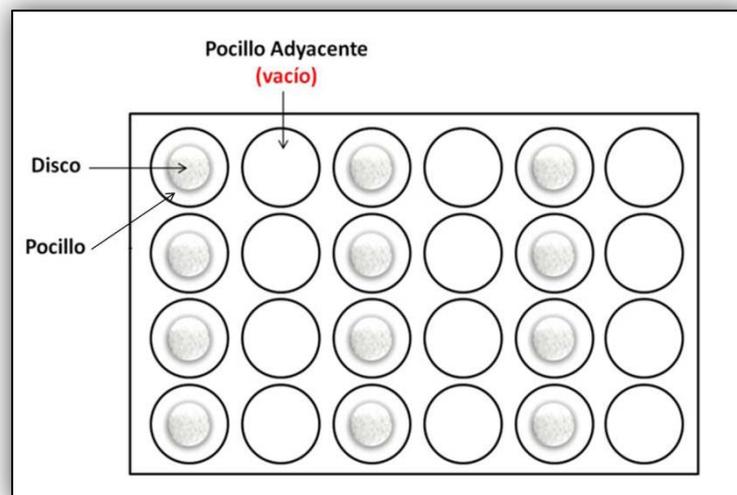


Figura 27. Configuración de discos de β -TCP (KOD) en placas de 24 pocillos antes de la siembra celular.

Seguidamente se aplica el siguiente procedimiento:

- a) Se hacen dos lavados a cada disco con 1 mL/pocillo de D-PBS con la finalidad de eliminar los restos solubles o sólidos del material.
- b) Se elimina todo el líquido residual y se deja la placa abierta al menos una hora dentro de la campana de flujo laminar para favorecer el secado completo del material.
- c) Seguidamente se continúa con alguna de las siguientes opciones:
 - *Acondicionamiento de discos:* se agregan 75 μ L/disco de medio PM sin FBS sobre el disco y se incuba durante 24 horas a 37 °C.
 - *Aplicación de recubrimientos:*

- Se agregan 75 μL /disco de la solución de fibronectina (FN) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Se distribuye la solución de FN gota a gota por la superficie del disco.
- Se incuban las muestras durante 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.
- Finalizado el tiempo de incubación se realiza un lavado con 1 mL/disco de D-PBS y se elimina todo el líquido residual.

d) Una vez acondicionados o recubiertos, se realiza la siembra de células sobre los discos (ver Figura 28), siguiendo los pasos que se indican a continuación:

- Cultivos de células HDF, hADSCs, o cADSCs se tripsinizan, se cuentan las células en cámara de Neubauer y se resuspenden en medio PM a las concentraciones indicadas en la Tabla 18. La densidad inicial de siembra se ha ajustado en función del tipo celular y tiempo de estudio tras realizar experimentos de estandarización.

Tipo celular	Nº cel/cm ²	Nº cel/ disco	Nº cel/mL	Tiempo de estudio
HDF	7.500	20.000	400.000	7 días
HDF	4.000	10.800	216.000	21 días
hADSCs	10.000	27.000	540.000	21 días
cADSCs	4.000	10.800	216.000	21 días

Tabla 18. Densidad de siembra de células HDF, hADSCs y cADSCs en discos KeraOs (KOD).

- Se distribuyen 50 μL de la suspensión celular gota a gota en la superficie de cada disco y se incuban las muestras a 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 y 90 % humedad durante 3 horas para favorecer la adhesión de las células.
- Con una pinza estéril se transfiere cada disco al pocillo adyacente de la placa. Este paso permite separar la población de células adheridas al disco de aquellas que no se han adherido y quedan unidas al plástico del pocillo inicial.
- Se añaden 1.5 mL/pocillo de medio PM o OM con 10% de Alamar Blue[®] (AB) tanto a las células adheridas al disco como a las no adheridas para cuantificar la viabilidad celular y el porcentaje de adhesión (ver sección 3.7).
- Se realizan cambios de medio cada 3 días durante todo el período del experimento.
- La respuesta celular se evalúa con los siguientes parámetros:

- Proliferación celular mediante el ensayo Alamar Blue® (ver sección 3.7).
- Morfología celular mediante microscopía estereoscópica, confocal y/o electrónica (ver sección 3.10).
- Fenotipo osteogénico mediante la cuantificación de la tinción Rojo de Alizarina (ver sección 3.8.2), actividad bioquímica de la enzima ALP (ver sección 3.11) y expresión de marcadores genéticos mediante PCR en tiempo real (ver sección 3.14).

Es importante destacar que paralelamente a la siembra de discos, se sembraron células sobre placas de plástico de 24 pocillos (controles) empleando la misma densidad celular (cel/cm^2) para cada tipo celular que se indica en la Tabla 18.

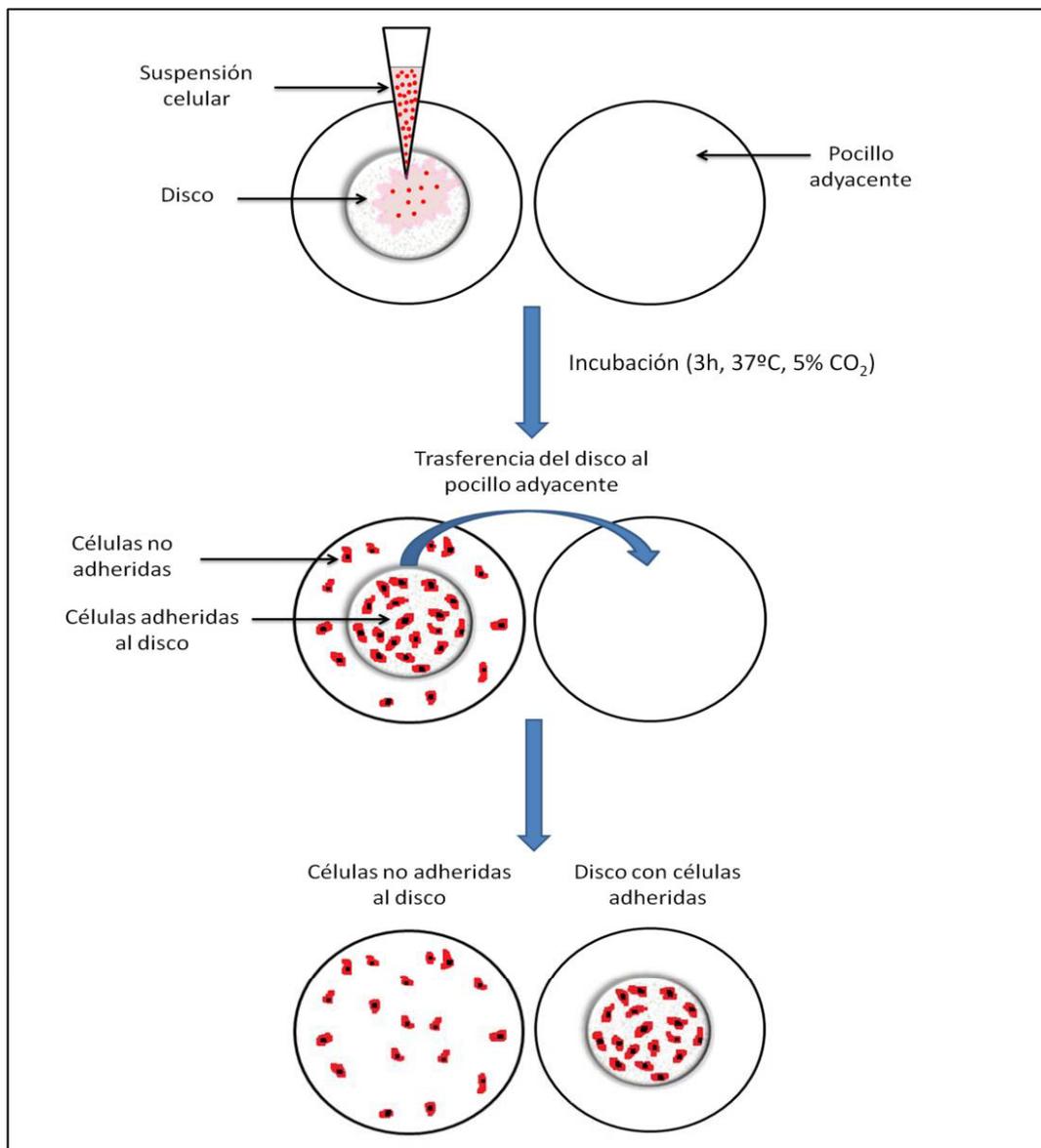


Figura 28. Representación gráfica del proceso de siembra celular sobre discos de β -TCP y separación de células adheridas y no adheridas al disco.

Los fibroblastos HDF (ver sección 3.2.5) se han utilizado para la puesta a punto de la metodología y la comprobación de la biocompatibilidad del material, tal como lo establece la ISO 10993-5 (Biological evaluation of medical devices). En este sentido el procedimiento que se muestra en esta sección es el protocolo definitivo que se ha seleccionado una vez que se han probado varias condiciones que afectan de manera importante el comportamiento de las células (adhesión y proliferación) al ser cultivadas sobre el biomaterial. Teniendo en cuenta la importancia del proceso de estandarización en este trabajo a continuación se indican las condiciones que se han ensayado empleando cultivos celulares de HDF:

- A. Densidad inicial de siembra (Nº cel/disco): 12.000 y 20.000 cel/disco
- B. Relación del volumen de acondicionamiento y siembra de discos ($\mu\text{L}/\mu\text{L}$): 100/50; 75/50 y 75/25.
- C. Proteínas de recubrimiento y concentraciones (ver Tabla 19).

Recubrimiento	Abreviación	Concentración
Fibronectina	FN	5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Colágeno tipo I	COL	5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Fibronectina/Colágeno	FN/COL	Mezcla 1:1
Albúmina	HSA	4 %
Plasma AB	P	50 y 100%

Tabla 19 . Proteínas y concentraciones probadas para el recubrimiento de discos KeraOs (KOd).

3.5.2.2 Granulados

Los cuatro tipos de materiales (ver tabla Tabla 17) han sido suministrados en frascos de cristal estériles que contienen un gramo del material en formato de granulado. Veinticuatro horas antes de la siembra se transfieren 500 mg de los granulados BO, BC, CS y KO a placas de 12 pocillos (Netwell™ Inserts, Corning) que contienen unos insertos constituidos por una malla de poliéster de 100 μm (ver Figura 29)



Figura 29. Fotografía de granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) en placas Netwell™.

Seguidamente se aplica el siguiente procedimiento:

- a) Se realizan dos lavados con 2 mL/pocillo de D-PBS con la finalidad de eliminar los restos solubles o sólidos del material.
- b) Se elimina completamente el líquido residual y se deja la placa abierta al menos una hora dentro de la campana de flujo laminar para favorecer el secado completo del material.
- c) Seguidamente se continúa con alguna de las siguientes opciones:
 - *Acondicionamiento de discos:* se agregan 500 µL/pocillo de medio PM sin FBS en la superficie del disco y se incuba durante 24 horas a 37 °C.
 - *Aplicación de recubrimientos:*
 - Se agregan 500 µL de la solución de recubrimiento a las concentraciones indicadas en la
 - Tabla 20 distribuyéndolas gota a gota por la superficie de los granulados.
 - Se incuban las muestras durante 24 horas a 37 °C.
 - Finalizado el tiempo de incubación se realiza un lavado con 2 mL/pocillo de D-PBS y se elimina todo el líquido residual.

Es importante destacar que la aplicación de recubrimientos sobre material granulado, se realizó únicamente sobre KeraOs® (KO)

Recubrimiento	Abreviación	Concentración
Fibronectina	FN	5 µg/cm ²
Colágeno tipo I	COL	5 µg/cm ²
Fibronectina/Colágeno (1:1)	FN/COL	5 µg/cm ²

Tabla 20. Proteína de matriz extracelular (ECM) utilizada para el recubrimiento de granulados KeraOs® (KO).

- d) Una vez acondicionados o recubiertos, se realiza la siembra de células sobre los granulados (ver Figura 31) siguiendo los pasos que se indican a continuación:
 - Cultivos de células HDF, hADSCs o cADSCs se tripsinizan, se cuentan las células en cámara de Neubauer y se resuspenden en medio PM a las concentraciones indicadas en

la Tabla 21. La densidad inicial de siembra se ajusta en función del tipo celular y tiempo del estudio, tras realizar experimentos de estandarización.

Tipo celular	Nº cel/cm ²	Nº cel/ 500 mg granulado	Nº cel/mL	Tiempo de estudio
HDF	7.500	30.000	60.000	7 días
HDF	4.000	16.000	32.000	21 días
hADSCs	10.000	40.000	80.000	21 días
cADSCs	7.500	30.000	60.000	21 días

Tabla 21. Densidad de siembra de fibroblastos dérmicos (HDF), células madre de tejido adiposo humanas (hADSCs) y células madre de tejido adiposo canino (cADSCs) sobre granulados Bio-Oss[®] (BO), Bone Ceramic[®] (BC), Cerasorb[®] (CS) y KeraOs[®] (KO).

- Se distribuyen 500 µL de la suspensión celular gota a gota por la superficie de los granulados (ver detalle en la Figura 30) y se incuban las muestras a 37 °C, 5 % de CO₂ y 90 % humedad durante 3 horas para favorecer la adhesión de las células.

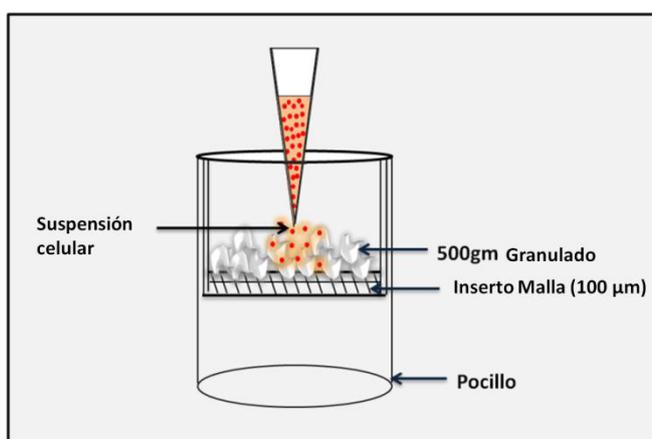


Figura 30. Representación esquemática de la siembra celular sobre granulados Bio-Oss[®] (BO), Bone Ceramic[®] (BC), Cerasorb[®] (CS) y KeraOs[®] (KO) colocados en placas Netwell[™].

- Tras las 3 horas de incubación, se transfiere cada inserto a una nueva placa. Este paso permite la separación de la población de células que se han adherido al material (constructos células-granulado) de las que no, las cuales pasan a través de la malla de 100 µm y quedan unidas al plástico del pocillo inicial.

- Se añaden 1.5 mL/pocillo de medio PM o OM con 10 % de AB tanto a las células adheridas al material (constructos células-granulados) como a las no adheridas (las que han quedado en el pocillo inicial) para cuantificar la viabilidad celular y calcular el porcentaje de adhesión (ver sección 3.7).
- Se realizan cambios de medio cada 3 días durante todo el período del experimento.
- La respuesta celular se evalúa con los siguientes parámetros:
 - Proliferación celular mediante el ensayo Alamar Blue® (ver sección 3.7).
 - Morfología celular mediante microscopía estereoscópica, confocal y/o electrónica (ver sección 3.10).
 - Fenotipo osteogénico mediante la cuantificación de la tinción Rojo de Alizarina (ver sección 3.8.2), actividad bioquímica de la enzima fosfatasa alcalina (ver sección 3.11) y expresión de marcadores genéticos mediante PCR en tiempo real (ver sección 3.14).

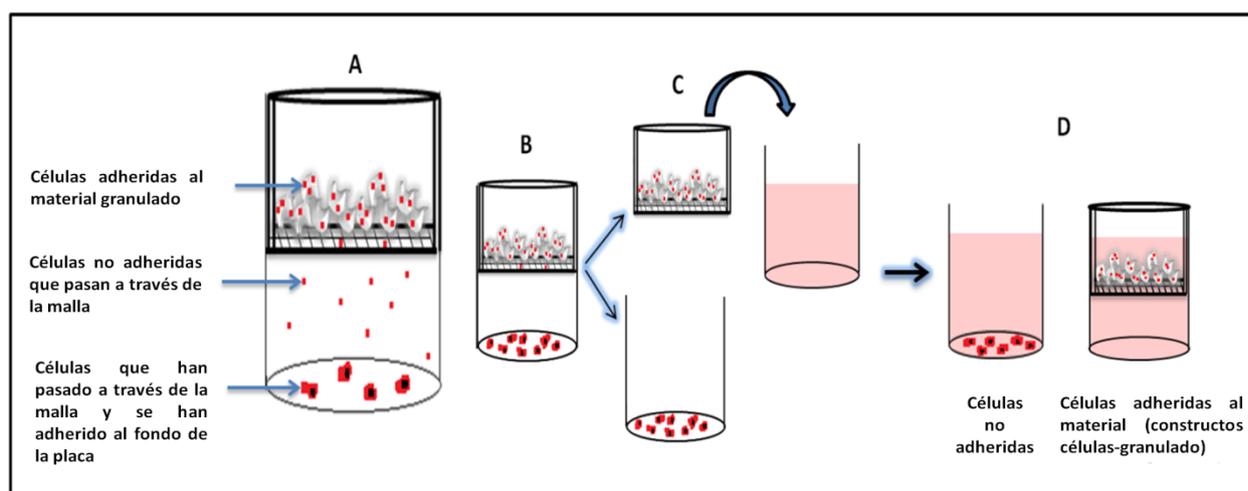


Figura 31. Esquema representativo de la siembra y separación de células adheridas y no adheridas a granulosos. Una porción de las células sembradas (puntos rojos) se adhieren al material localizado en la parte superior del inserto, mientras que las no adheridas pasan a través de la malla y se adhieren al fondo del pocillo (A). Después de 3 horas de incubación (37°C, 5% CO₂) las células están adheridas al material o al fondo del pocillo (B). Los insertos con los constructos células-granulado son transferidos a pocillos de una nueva placa quedando así completamente separadas las células adheridas de las no adheridas al material (C). Finalmente se añaden 2 mL de medio de cultivo a ambos pocillos (D).

Paralelamente a la siembra de granulosos, se siembran células sobre placas de plástico de 12 pocillos (controles) empleando la misma densidad celular (cel/cm²) para cada tipo celular que se indica en la Tabla 21. Por otra parte indicar nuevamente que los fibroblastos HDF se han utilizado para la puesta a punto de la metodología y la comprobación de la biocompatibilidad del material KO, tal como lo establece la norma ISO 10993-5 (Biological evaluación of medical devices).

3.6 Cocultivos de hADSCs y HUVEC

La interacción *in vitro* de células hADSCs y HUVEC se ha evaluado cultivando las células en proporción 6:1 respectivamente, sobre placas de plástico y el biomaterial KeraOs en formato disco (KOD) con y sin recubrimiento de FN en diferentes medios de cultivo celular (EBM-2, EGM-2, OM) durante 7 días. El protocolo que se llevó a cabo se describe a continuación:

- a) Cultivos de hADSCs se tripsinizan y se marcan con el colorante de membrana Vybrant™ (ver Tabla 14) como se indica a continuación:
- Se resuspenden las células hADSCs en DMEM 1 g/L a una densidad de 1×10^6 cel/mL.
 - Por cada mL de suspensión celular se añaden 5 μ L de Vybrant-DIL (marcaje rojo) y se incuban durante 20 min a 37 °C.
 - Se centrifugan durante 5 min a 1.500 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en DMEM 1g/L. Se repite dos veces este paso para eliminar el exceso de colorante.
- b) Una vez marcadas se siembran a una densidad de 60.000 cel/cm² en placas de plástico de 12 pocillos con 2 mL/pocillo de medio PM o 50 μ L/disco sobre el material KOD previamente acondicionado o cubierto con FN (5 μ g/cm²).
- c) Se incuban las placas durante 3 horas a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad para favorecer la adhesión celular.
- d) Tras el tiempo de incubación se verifica en el microscopio de fluorescencia tanto el marcaje como la adhesión de las células hADSCs a las placas de cultivo.
- e) Se tripsinizan cultivos de células HUVEC (sección 3.2.6) y se marcan con el colorante de membrana Vybrant-DIO (marcaje verde). El procedimiento es el mismo que el descrito en “a”.
- f) Se elimina el medio de cultivo de las hADSCs adheridas y sobre éstas se siembran las células HUVEC marcadas a una densidad de 10.000 cel/cm² con 2 mL/pocillo de medio BM en el caso de placas de 12 pocillos, o en 50 μ L/disco de medio BM en el caso del biomaterial KOD.
- g) Se incuban las placas durante 2 horas a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 %. Tras el tiempo de incubación se eliminan los medios de cultivo y se sustituyen por 2mL/pocillo o 2mL/disco de medios OM, EBM-2 o EGM-2 (ver Tabla 11).
- h) Se verifica en el microscopio de fluorescencia la presencia de los dos tipos celulares (hADSCs marcadas en rojo y HUVEC marcadas en verde).

- i) Tras 7 días de cultivo se hace el aislamiento de RNA (ver sección 3.12), para la cuantificación de la expresión de genes involucrados en rutas osteogénicas y angiogénicas mediante PCR en tiempo real (ver Sección 3.14) y detección de CD31 y α -SMA por inmunofluorescencia (sección 3.9).

3.7 Adhesión y proliferación: viabilidad celular con Alamar Blue®

Alamar Blue® (AB) es un indicador REDOX diseñado para cuantificar la viabilidad celular a través de la detección de su actividad metabólica. Al añadir AB al medio de cultivo, éste entra en las células y es reducido por varias moléculas involucradas en la cadena de respiración tales como NADH, NADPH, citocromos, entre otros. En su forma oxidada es de color azul y no emite fluorescencia, mientras que su forma reducida es de color rojo y emite fluorescencia con un rango de excitación de 530 a 560 nm. La cantidad de color y emisión de fluorescencia en estado reducido es proporcional al número de células vivas presentes en el cultivo.

La principal ventaja del AB es que no es tóxico para las células, lo que permite medir la viabilidad celular de una misma muestra a lo largo del tiempo y por ende cuantificar la proliferación celular. La metodología utilizada se describe a continuación:

- a) Se aspira el medio de cultivo de discos, granulados, células no adheridas y/o controles; y se añade medio PM u OM con 10 % de AB. El volumen que se añade es de 1 mL/pocillo en placas de 24 pocillos y 2.5 mL/pocillo en placas de 12 pocillos.
- b) Se incuban las muestras durante 4 horas a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad.
- c) Transcurrido el tiempo se toma una alícuota de 100 μ L del medio de cultivo de cada muestra y se transfiere a un pocillo de placas de 96 pocillos. Se hacen triplicados de cada muestra.
- d) Finalmente se hace la lectura de la placa en fluorímetro utilizando los valores de excitación-emisión 530-590nm.

El **porcentaje de adhesión** de células viables a discos o granulados, se ha calculado aplicando la siguiente fórmula con los datos de viabilidad obtenidos:

$$\% \text{ Adhesión} = \left(\frac{\bar{X} \text{ FI CA}}{\bar{X} \text{ FI CA} + \bar{X} \text{ FI CNA}} \right) \times 100$$

Donde **FI CA** son valores de fluorescencia de células adheridas al biomaterial (disco o granulado) y **FI CNA** son valores de fluorescencia de células no adheridas al biomaterial.

La proliferación se determinó como cambios en los valores de fluorescencia a lo largo del tiempo de estudio (0, 3, 5, 7, 14 y 21 días) en células crecidas sobre los biomateriales y sobre plástico (controles). Es importante destacar que se realizaron curvas estándar y se determinó que dentro del rango de células que se emplea se mantiene una relación lineal entre el número de células y los valores de fluorescencia.

3.8 Histoquímica

Para la identificación de células y determinados compuestos químicos de interés, en el presente trabajo se emplearon las tinciones histoquímicas que se describen a continuación:

3.8.1 Azul de Toluidina

Es un colorante básico con propiedades ortocromáticas (tiñe de color azul) o metacromáticas (tiñe de color violeta-purpura) dependiendo del pH y la naturaleza química de la muestra. En el presente estudio esta tinción se ha utilizado para teñir las células cultivadas sobre los biomateriales y el procedimiento se describe a continuación:

- a) Se aspira el medio de cultivo y se realizan dos lavados con 2 mL/muestra de D-PBS Ca^{+2} Mg^{2+} .
- b) Se fijan las muestras con 2 mL/muestra de paraformaldehído (PF) al 4% durante 10 min a temperatura ambiente.
- c) Se hacen 4 lavados 2 mL/muestra de D-PBS.
- d) Se añaden 4 mL/muestra de Azul de toluidina al 1 % y se incuban las muestras durante 20 min a temperatura ambiente.
- e) Se realizan varios lavados con 2 mL/muestra de D-PBS (por lo menos 5) hasta eliminar todo el exceso de colorante.
- f) Por último se observan las muestras en el microscopio estereoscópico.

3.8.2 Rojo de Alizarina

Es una tinción ampliamente utilizada para la detección de deposiciones de calcio en tejidos o cultivos celulares. La reacción de Alizarina no es específica del calcio, puesto que también reacciona con el manganeso, magnesio y bario, entre otros. Sin embargo, estos elementos no están en una concentración lo suficientemente elevada en los tejidos o cultivos celulares como para ser detectados.

Durante un proceso de quelación, el calcio forma con la Alizarina un complejo cuyo producto final es de color rojo y refringente. En el presente trabajo esta tinción se ha utilizado con la finalidad de revelar fases tempranas de mineralización de la matriz extracelular (ECM) en cultivos de células madre mesenquimales inducidas a diferenciación osteogénica tanto en plástico como en biomateriales. El procedimiento se detalla a continuación:

- a) Se aspira el medio de cultivo y se realizan dos lavados con 2 mL/muestra de D-PBS Ca^{+2} Mg^{2+} .
- b) Se fijan las muestras con 2 mL/muestra de paraformaldehído (PF) al 4% durante 10 min a temperatura ambiente.
- c) Se hacen 4 lavados con 2 mL/muestra de D-PBS
- d) Se añaden 2 mL/muestra de Rojo de Alizarina al 2% y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente.
- e) Se realizan varios lavados con 2 mL/muestra de D-PBS hasta eliminar todo el exceso de colorante.
- f) Finalmente se observan las muestras tridimensionales (cultivos sobre discos o granulados) con microscopio estereoscópico o con microscopio de contraste de fases en el caso de cultivos sobre plástico.

3.8.3 Oil Red

Pertenece al grupo de los lisocromos, sustancias capaces de disolverse en los lípidos (ácidos grasos, colesterol, fosfoglicéridos, esfingolípidos o Glucolípidos) y colorearlos de color rojo. En el sentido estricto los lisocromos no son colorantes, sino sustancias coloreadas solubles en lípidos o en sustancias no liposolubles (como alcoholes de baja concentración) y que no se unen a otras estructuras tisulares. En el presente estudio se ha utilizado esta tinción para detectar la formación de lípidos en el citoplasma de de células madre mesenquimales inducidas a diferenciación adipogénica. El procedimiento se indica a continuación:

- a) Se aspira el medio de cultivo y se realizan dos lavados con 2 mL/muestra de D-PBS Ca^{+2} Mg^{2+} .
- b) Se fijan las muestras con 2 mL/muestra de paraformaldehído (PF) al 4 % durante 10 min a temperatura ambiente.
- c) Se añade 1 mL/muestra de isopropanol al 60 % y se incuban durante 5 min a temperatura ambiente.
- d) Se elimina el isopropanol y se añaden 500 μL /muestra de Oil Red 0.1 %. Se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.
- e) Se hacen varios lavados con agua destilada hasta eliminar por completo el exceso de colorante.
- f) Finalmente se observan las muestras en el microscopio.

3.8.4 Azul Alcian

El Azul Alcian es una sustancia catiónica que se une a grupos ácidos formando compuestos salinos a pH ácido. Su color es azul debido a que posee un átomo de cobre en la molécula. Al ser una sustancia básica muestra afinidad por los grupos carboxilos, sulfatos de proteoglicanos y mucopolisacáridos coloreando el tejido cartilaginoso de color azul-verdoso.

En el presente trabajo esta tinción sirvió como marcador de diferenciación en cultivos de células madre mesenquimales inducidas a diferenciación condrogénica. El procedimiento se describe a continuación:

- a) Se aspira el medio de cultivo y se realizan dos lavados con 2 mL/muestra de D-PBS Ca^{+2} Mg^{2+} .
- b) Se fijan las muestras con 2 mL/muestra de paraformaldehído (PF) al 4 % durante 10 min a temperatura ambiente.
- c) Se añaden 2 mL/muestra de Azul Alcian al 1 % y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente.
- d) Se realizaron varios lavados con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante.
- e) Se observa macroscópicamente la muestra y se hace un registro fotográfico con cámara digital.
- f) Una vez teñidas las muestras se deshidratan en una batería de alcoholes (Etanol 50 %, 70 %, 80 %, 96 % y 100 %), se incluyen en parafina y se realizan cortes histológicos de 7 μm con micrótopo.
- g) Finalmente se realiza la observación de cortes histológicos en el microscopio directo.

3.9 Inmunofluorescencia

Es una técnica que permite la detección y localización de proteínas o moléculas presentes en tejidos y células, empleando anticuerpos de alta especificidad unidos químicamente a una sustancia fluorescente denominada fluorocromo. En el presente estudio se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta que hace uso de un anticuerpo primario que reconoce y se une a la molécula diana; y un anticuerpo secundario que está unido a un fluorocromo y es el que reconoce al primario. La descripción de los anticuerpos utilizados se muestra a continuación en la Tabla 22.

El protocolo utilizado se describe a continuación:

- a) Se elimina el medio de cultivo y se realizan dos lavados de la muestra con 2 mL/muestra de D-PBS Ca^{+2} Mg^{2+} .
- b) Se añaden 2 mL de tampón TF (ver Tabla 7) y se incuban las muestras durante 15 min a temperatura ambiente.
- c) Se retira el tampón TF y se hacen 3 lavados de 5 min con 2 mL/muestra de tampón TL (ver Tabla 7).

- d) Se añaden 2 mL/muestra del tampón TP (ver Tabla 7) y se incuba la muestra durante 7 min a temperatura ambiente.
- e) Se hacen 3 lavados de 5 min con 2 mL/muestra de tampón TL.
- f) Se añaden 2 mL/muestra de tampón TB (ver Tabla 7) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente.
- g) Se elimina el tampón TB y se añaden 100 µL/muestra del anticuerpo primario (1:200) y se mantiene durante toda la noche a 4 °C.
- h) Se hacen 3 lavados de 5 min con 2 mL/ muestra de tampón TL.
- i) Se añaden 100 µL/muestra del anticuerpo secundario (1:2000) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz.
- j) Se hacen 3 lavados de 5 min con 2 mL/muestra de tampón TL.
- k) Con la finalidad de teñir los núcleos, se añaden 100 µL/muestra de bisbenzimidida (5µg/mL) y se incuba durante 7 min a temperatura ambiente.
- l) Se hacen 3 lavados de 5 minutos cada uno con 2 mL/muestra de tampón TL y se observan las muestras por microscopía de fluorescencia.

Antígeno	Especie huésped	Tipo	Casa comercial	Referencia	Aplicación
MyoD Humano	Ratón	Primario	Santa Cruz	Sc-32758	Diferenciación miogénica
Miosin heavy chain (MyHC) humano	Ratón	Primario	Thermo Scientific	MA1-16774	Diferenciación miogénica
Cluster of differentiation 31(CD31) humano	Ratón	Primario	Santa Cruz	SC-81158	Cocultivos: marcaje de células HUVEC
Alfa Smooth muscle actin (α-SMA) humano	Conejo	Primario	Abcam	Ab5694	Cocultivos
Goat anti Rabbit alexa 594 (orange-red)		Secundario	Santa Cruz	sc-362282	Reconocimiento de anticuerpo primario α-SMA
Goat anti Mouse alexa 488 (green)		Secundario	Invitrogen	A21121	Reconocimiento de anticuerpos primarios MyoD, MyHC y CD31

Tabla 22. Anticuerpos empleados para la técnica de inmunofluorescencia.

3.10 Microscopía

3.10.1 Confocal

La microscopía confocal, permite la obtención de imágenes tridimensionales de muestras de cierto grosor que por lo general son marcadas con sondas fluorescentes. Se basa en la realización de secciones ópticas de la muestra al enfocar diferentes planos de la misma mientras se elimina la luz que proviene de los planos fuera de foco, obteniendo así una imagen nítida del plano de foco. La integración de todas las secciones ópticas permite la reconstrucción de una imagen tridimensional con una alta resolución.

La observación por microscopía confocal de células hADSCs y cADSCs cultivadas sobre biomateriales (discos y granulados) después de 21 días de cultivo, se realizó mediante la tinción de los filamentos de actina con Falloidina-TRIC y los núcleos celulares con bisbenzimidida tal como se describe a continuación:

- a) Se aspira el medio de cultivo y se realizan dos lavados de los constructos células-biomaterial con 2 mL/muestra de D-PBS.
- b) Se añaden 2 mL/muestra de PF al 4 % y se incuba durante 10 min a temperatura ambiente.
- c) Se hacen 3 lavados con 2 mL/muestra de D-PBS.
- d) Se añade 1 mL/muestra de Falloidina (0.2 M) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz.
- e) Se hacen 3 lavados de 5 min con 2 mL/muestra de tampón TL.
- f) Se añaden 1 mL/muestra de bisbenzimidida (5 µg/mL) y se incuba durante 7 min a temperatura ambiente protegido de la luz.
- g) Se preparan placas de petri de 33 mm con 50 µL de medio de montaje Fluoromount y se transfieren los constructos células-biomaterial.
- h) Se hace la observación y registro de imágenes con Microscopio Confocal.

3.10.2 Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido se basa en el barrido de una muestra recubierta con una capa fina de metales pesados por un haz focalizado de electrones que son dispersados de manera diferencial en función de la morfología de la muestra y que permiten la generación de una imagen bidimensional de la superficie de la muestra. La preparación de muestras para SEM de células hADSCs y cADSCs cultivadas sobre biomateriales (discos y granulados) luego de 21 días de cultivo se describe a continuación:

- a) Se elimina el medio de cultivo y se lavan las muestras con 2 mL/muestra de Tampón PB 0.1 M.
- b) Se fijan las muestras añadiendo 2 mL/muestra de PF 4 % y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente bajo agitación.
- c) Se elimina la solución de fijación y se hacen 4 lavados con PB 0.1 M durante 10 min a temperatura ambiente bajo agitación.
- d) Se añaden 2 mL/muestra de Osmio al 1% y se incuban durante 1 hora a 4°C en agitación.
- e) Se deshidratan las muestras con una batería de etanoles 50, 70, 90, 95 y 100 %.
- f) Se transfieren las muestras al servicio microscopía de barrido del CCiTUB, para la realización del punto crítico y recubrimiento de la muestra con elementos conductores oro (Au).
- g) Finalmente se realiza la observación y registro de imágenes en microscopio electrónico de barrido.

3.11 Detección bioquímica de fosfatasa alcalina

La cuantificación de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) en cultivos celulares se ha realizado con el kit Sensolyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay (ver Tabla 10). Es un ensayo colorimétrico que utiliza el pNPP (p-Nitrofenil fosfato) como sustrato de la fosfatasa alcalina, generándose un producto de color amarillo que puede ser detectado mediante espectrofotometría. El protocolo utilizado se describe a continuación:

- a) Se aspira el medio de cultivo y se lavan las células dos veces con 1 mL/ muestra buffer de lisis 1X.
- b) Se añaden 250 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de buffer de lisis con 0.2 % de tritón X-100 y se pipetea numerosas veces para lisar todas las células adheridas.
- c) Se transfiere la muestra a un tubo eppendorf y se incuba durante 10 min a 4°C bajo agitación para favorecer la lisis celular.
- d) Se centrifugan las muestras a 2.500 g durante 10 min a 4 °C y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo.
- e) En una placa de 96 pocillos se añaden 50 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ del sobrenadante obtenido (muestra) por triplicado. Seguidamente se añaden 50 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de “PNPP solution substrate”.
- f) Se coloca la placa en agitación durante 30 seg y se incuba durante 20 min a 37 °C.
- g) Transcurrido el tiempo se añaden 50 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de la “stop solution” y se coloca la placa durante 1 min en agitación.
- h) Finalmente se realiza la lectura de absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro.

Para calcular la concentración (ng/mL) de la enzima en las muestras extraídas de los cultivos celulares, se realiza paralelamente una curva patrón empleando las concentraciones 0, 3.1, 6.2, 12.5, 25 y 50 ng/mL de "Alkaline phosphate standard". Adicionalmente se determina la concentración de proteína total de cada muestra a través del ensayo colorimétrico BCA (ver Tabla 10). En este sentido los resultados fueron expresados como (ng/mL ALP)/mg proteínas totales.

3.12 Aislamiento de RNA

La lisis y extracción de RNA de los cultivos celulares se realizó mediante el método fenol-cloroformo. En la fase inicial del proceso de extracción se ha utilizado el reactivo Trizol® (ver Tabla 11) que es una solución monofásica que contiene fenol y isotiocianato de guanidina. El protocolo empleado se describe a continuación:

- a) Se elimina el medio de cultivo y se añade 1 mL/muestra de Trizol® por cada 10 cm² de superficie de placa de plástico. El mismo volumen fue añadido por cada disco de β -TCP o por cada 0.5 g de granulado.
- b) Se homogeniza la solución por pipeteo para favorecer la lisis celular.
- c) Se transfieren los lisados a tubos eppendorf y se incuban durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleo-protéicos.
- d) Se añaden 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol empleado, se agitan vigorosamente las muestras durante 15 seg y se incuban durante 3 min a temperatura ambiente.
- e) Se centrifugan a 12.000 g durante 15 min a 4 °C, obteniéndose las fases que se indican en la Figura 32.
- f) Se transfiere la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo y se añaden 0.5 mL de isopropanol 100 % por cada mL de Trizol utilizado.
- g) Se incuban las muestras durante 10 min. y se centrifugan a 12.000g durante 10 min. a temperatura ambiente.
- h) Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento con 1 mL de etanol 75 % por cada mL de Trizol utilizado. Se mezcla brevemente empleando vortex.
- i) Se centrifugan las muestras a 7.500g durante 5 min, se elimina el sobrenadante y se dejan abiertos los tubos durante 10 min a temperatura ambiente para favorecer la evaporación completa del etanol.
- j) El sedimento obtenido (que corresponde al RNA) se resuspende en 30 μ L de agua libre de RNasas (sin DEPC) y se incuban durante 15 min a 60 °C.

- k) Finalmente se determina su concentración y ratio empleando placa NanoQuant (TECAN) y lector Infinity 200 PRO (TECAN).

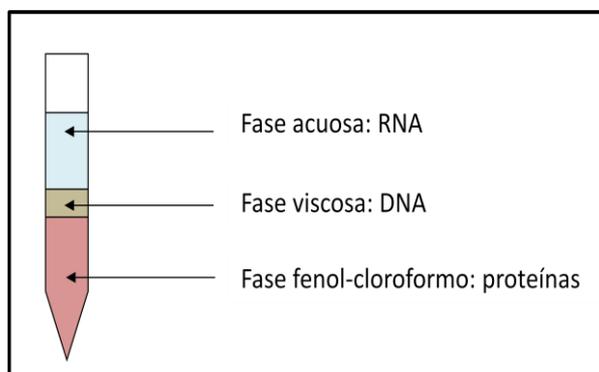


Figura 32. Aislamiento RNA con Trizol

3.13 Retro-transcripción

3.13.1 Retro-transcripción de muestras para PCR en tiempo real

La retro-transcripción se realizó utilizando el KIT SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (ver Tabla 13) únicamente en aquellas muestras que se han utilizado para la detección de marcadores genéticos mediante PCR en tiempo real. El protocolo se describe a continuación:

- a) Para cada muestra 1 μg de RNA se mezcla con 10 μL de “2X RT reacción mix” y 2 μL de “RT Enzyme mix”, en un volumen final de 25 μL .
- b) Se introducen las muestra en el termo-ciclador utilizando el siguiente programa de temperaturas:

25 °C ----- 10 min
50 °C ----- 30 min
37 °C ----- 20 min

- c) La calidad de la muestra se verifica empleando el marcador 18S mediante PCR en tiempo real (ver sección 3.14).

3.13.2 Retro-transcripción de muestras para qPCR-array

La retro-transcripción se realizó utilizando el Kit RT² First Strand cDNA kit (ver Tabla 13) únicamente en aquellas muestras que se han utilizado para la detección de un perfil de marcadores osteogénicos mediante qPCR-array. El protocolo se describe a continuación:

- a) Para cada muestra, entre 10 ng y 1 µg de RNA se mezclan con 2 µL de “buffer GE” en un volumen final de 25 µL. Se agita suavemente la mezcla y se incuba a 42°C durante 5 min para favorecer la eliminación de DNA genómico en la muestra.
- b) Para cada muestra se preparan 10 µL de la *cocktail* de retro-transcripción mezclando los reactivos que se indican a continuación en tubos de PCR:

BC3 (5X buffer 3).....	4 µL
P2 (Primer & external control mix)	1 µL
RE3 (RT enzyme mix 3)	2 µL
Agua	3 µL

- c) Se añaden 10 µL del *cocktail* de retro-transcripción a los 10 µL de la mezcla de cDNA obtenidos en “a” y se agitan suavemente.
- d) Se incuban las muestras durante 15 min a 92 °C, y seguidamente durante 5 min a 95 °C.
- e) Se añaden 91 µL de agua a cada muestra y se guardan a -20°C hasta su posterior uso.

3.14 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Es una variante de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite determinar la cantidad de un gen o secuencia diana que está presente en una muestra, monitoreando el proceso en tiempo real. Se basa en la detección de fluorescencia producida por una molécula reportera (Ej. SybrGreen) que se unen al DNA de doble cadena. Dicha fluorescencia, incrementa a medida que se acumula el producto de la PCR con cada ciclo consecutivo, lo que hace que sea un producto cuantificable en la fase exponencial de la reacción.

En el presente estudio se ha utilizado el Kit SyBRGreenERTM qPCR SuperMix 2X (ver Tabla 13). Los cebadores se muestran en la Tabla 23 y han sido diseñados utilizando el software Primer 3 de la plataforma web Basic Local Alignment Search Tool (BLAST[®])¹⁶⁴. El protocolo utilizado se describe a continuación:

- a) Se preparan diluciones 1:18 (1 μ L de cDNA + 17 μ L de agua) de cada muestra de cDNA.
- b) Para cada muestra se preparan 18 μ L del siguiente *cocktail* experimental:

SyBRGreenER™ qPCR SuperMix (2X)	14.40 μ L
Primer forward (40 pmol/ μ L).....	0.90 μ L
Primer reverse (40 pmol/ μ L)	0.90 μ L
Agua	1.90 μ L

- c) Se prepara una mezcla 1:1 del *cocktail* experimental y el cDNA, y se distribuyen 18 μ L de la muestra en cada tubo de qPCR por duplicado.
- d) Una vez distribuidas las muestras, se introducen en termo-ciclador (StepOne™ Real-time PCR, Applied Biosystems) con el siguiente programa de amplificación:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10 min
40	95 °C	15 seg
	Temperatura de Hibridación de la pareja de cebadores (ver Tabla 23)	30 seg
	72°C	45 seg

- e) Una vez obtenidos las curvas de amplificación, se obtienen los valores de umbral de ciclo o “threshold cycle” (Ct) con el software StepOne™ software V2.1 (Applied Biosystems).
- f) Se calcula la expresión relativa del gen ($\Delta\Delta$ Ct) utilizando como control interno la expresión de β -Actina (β -Act) tanto para las muestras humanas y caninas; y la de Glutaraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH) para muestras de ratón. Las fórmulas utilizadas para cuantificar la expresión de genes diana se muestran a continuación:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{gen diana}) - \text{Ct}(\beta\text{-Act})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{mt}) - \Delta\text{Ct}(\text{c})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Ct es el umbral de ciclo de la secuencia diana

mt es la muestra tratada

c es la muestra sin tratar (control)

Ratio es la expresión relativa de RNAm del gen diana.

Ratio= Índice de Expresión

Tasa de variación= Índice de expresión muestra/ índice de expresión control

Nombre de la pareja de cebadores		Secuencia 5'---3'	Fragmento amplificado (bp)	Temperatura de hibridación	Especie
β-Actina (β-Act)	Fordware	ATCATGTTTGAGACCTCCAA	185	60	Humano
	Reverse	CATCTCTTGCTCGAAGTCCA			
Fosfatasa Alcalina (ALP)	Fordware	AGTGCTCTGCGCAGGATTGGA	220	60	
	Reverse	TGACCGCTCTGGTTGCGGTT			
Osteocalcina (OC)	Fordware	GGCCGAAGCAAGTAGCGCCA	169	60	
	Reverse	CTCTGGTAGCTGCCGCGG			
Osteonectina (ON)	Fordware	GTGCAGAGGAAACCGAAGAG	64	53	
	Reverse	TGTTTGCAGTGGTGGTTCTG			
Osteopontina (OP)	Fordware	TGAGGAAAAGCAGAATGCTGTGTCC	267	59	
	Reverse	GTTGCTGGCAGGTCCGTGGG			
Colágeno tipo XII (COL XII)	Fordware	ACCCACCTTCCGACTTGAATT	123	58	
	Reverse	TAGGCCATCTGTTGTAGGG			
Actina de músculo liso alfa (α-SMA)	Fordware	CGGACCTTTGGCTTGGCTT	122	60	
	Reverse	TGGGGTGCGGACAGGAATT			
Unidad α5 de la integrina (α5)	Fordware	TGCCGAGTTACCAAGACTG	97	60	
	Reverse	TGCAATCTGCTCCTGAGTGG			
VE-Cadherina (VE-Cad)	Fordware	ACCCACAGGAAAAGAATC	331	57	
	Reverse	GACTTGGCATCCCATGTCT			
Angiopoitina 1 (Ang 1)	Fordware	CGGACCTTTGGCTTGGCTT	138	60	
	Reverse	TGGGGTGCGGACAGGAATT			
VEGF	Fordware	CTGAGGAGTCCAACATCACCA	170	60	
	Reverse	TCGTTTTTGCCCTTCCCTT			
18S		Casa comercial Tataabiocenter	120	58	
Glutaraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH)	Fordware	CCATCTTCCAGGAGCGAGAT	97	53	Canino
	Reverse	TTCTCCATGGTGGTGAAGAC			
Fosfatasa Alcalina (ALP)	Fordware	GCCACCGCCTACTTGTGTGGA	148	60	
	Reverse	TGCCACAGATTTCCAGCGTC			
Bone sialo-Protein (BSP)	Fordware	TTGCTCAGCATTTTGGGAATGG	109	53	
	Reverse	AACGTGGCCGATACTTAAAGAC			
Osteocalcina (OC)	Fordware	GAGGGCAGCGAGGTGGTGAG	104	60	
	Reverse	TCAGCCAGCTCGTCACAGTTGG			
β-Actina (β-Act)	Fordware	TGCTCCCCGGGCTGTATT	87	55	Murino
	Reverse	ACATAGGAGTCTTCTGACCCATT			
Fosfatasa Alcalina (ALP)	Fordware	GTTGCCAAGCTGGGAAGAACAC	121	58	
	Reverse	CCCACCCGCTATTCAAAC			
Bone sialo-Protein (BSP)	Fordware	ACGGAGGTGGATGGCGGGAA	633	63	
	Reverse	CTTCGGGCGGTGGGGTTGTC			
Osteocalcina (OC)	Fordware	GAACAGACTCCGGCGCTA	227	51	
	Reverse	AGGGAGGATCAAGTCCCG			

Tabla 23. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real

3.15 qPCR-Array

La tecnología PCR-array (SABioscience/Qiagen) permite la obtención del perfil de expresión de un panel de genes relevantes en una ruta bioquímica particular empleando la técnica de PCR en tiempo real. Cada placa de 96 pocillos contiene 84 genes relevantes en la ruta seleccionada además de 5 genes “housekeeping” y tres controles de calidad RNA y PCR (ver Figura 33).

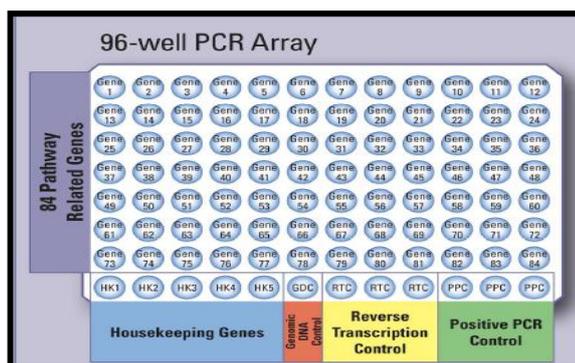


Figura 33. Diseño general de placa de qPCR-array

En el presente estudio se ha utilizado el kit Human Osteogenesis RT² Profiler™ PCR Array (ver Tabla 13) para evaluar la expresión los principales genes involucrados en la ruta de diferenciación osteogénica de células hADSCs cultivadas sobre granulados KO con y sin recubrimiento de FN y FN/COL, tras 21 días de cultivo en los medios PM y OM. En la Figura 34 se recoge la lista de genes constitutivos (housekeeping) y otros controles presentes en la placa de qPCR-array y en la Figura 35 los genes de la ruta osteogénica que se evalúa. El protocolo se describe a continuación:

a) Para cada placa de 96 pocillos de PCR-array se prepara la siguiente mezcla experimental

2X SABioscience RT ² qPCR Master MIX.....	1.350 µL
cDNA.....	102 µL
Agua	1.248 µL

b) Se añaden 25 µL/pocillo de la mezcla experimental en la placa y introducen en termo-ciclador (StepOnePlus™ System) con el siguiente programa de amplificación:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10 min
40	95 °C	15 seg
	60 °C	1 min

- c) Una vez obtenidos los datos se realiza el análisis de expresión utilizando el software “RT² PCR Array Data Analysis v3.5” proporcionado por la casa comercial Qiagen.

Species	Symbol	Description
Human	18SrRNA	Human 18S ribosomal RNA
Human	ACTB	Actin, beta
Human	B2M	Beta-2-microglobulin
Human	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Human	GUSB	Glucuronidase, beta
Human	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
Human	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
Human	RPL13A	Ribosomal protein L13a
Human	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
Human	TFRC	Transferrin receptor (p90, CD71)
Human	UBC	Ubiquitin C

Figura 34. Genes *Housekeeping* y controles evaluados en el qPCR-Array

<p>Skeletal Development: <u>Bone Mineralization:</u> AHSG, AMBN, AMELY, BGLAP, ENAM, MINPP1, STATH, TUFT1. <u>Cartilage Condensation:</u> BMP1, COL11A1, SOX9. <u>Ossification:</u> ALPL, AMBN, AMELY, BGLAP, CALCR, CDH11, DMP1, DSPP, ENAM, MINPP1, PHEX, RUNX2, STATH, TFIP11, TUFT1. <u>Osteoclast Differentiation:</u> BGLAP. <u>Other Genes Involved in Skeletal Development:</u> BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, COL10A1, COL12A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COMP, FGFR1, GDF10, IGF1, IGF2, MSX1, TWIST1.</p> <p>Bone Mineral Metabolism: <u>Calcium Ion Binding and Homeostasis:</u> ANXA5, BGLAP, BMP1, CALCR, CDH11, COMP, DMP1, EGF, MMP2, MMP8, VDR. <u>Phosphate Transport:</u> COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A3, COL5A1.</p> <p>Cell Growth and Differentiation: <u>Regulation of the Cell Cycle:</u> EGFR, FGF1, FGF2, FGF3, IGF1R, IGF2, PDGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGFA, VEGFB. <u>Cell Proliferation:</u> COL4A3, CSF3, EGF, EGFR, FGF1, FGF2, FGF3, FLT1, IGF1, IGF1R, IGF2, PDGFA, SMAD3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFB2, VEGFA, VEGFB. <u>Growth Factors and Receptors:</u> BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, CSF2, CSF3, EGF, EGFR, FGF1, FGF2, FGF3, FGFR1, FGFR2, FLT1, GDF10, IGF1, IGF1R, IGF2, PDGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB2, VEGFA, VEGFB. <u>Cell Differentiation:</u> TFIP11, TWIST1.</p> <p>Extracellular Matrix (ECM) Molecules: <u>Basement Membrane Constituents:</u> COL4A3. <u>Collagens:</u> COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A3, COL5A1. <u>ECM Protease Inhibitors:</u> AHSG, COL4A3, SERPINH1. <u>ECM Proteases:</u> BMP1, CTSK, MMP10, MMP2, MMP8, MMP9, PHEX. <u>Structural Constituents of Bone:</u> BGLAP, COL1A1, COL1A2. <u>Structural Constituents of Tooth Enamel:</u> AMBN, AMELY, ENAM, STATH, TUFT1. <u>Other ECM Molecules:</u> BGN, BMP2, COMP, CSF2, CSF3, DSPP, EGF, FGF1, FGF2, FGF3, FLT1, GDF10, IGF1, IGF2, PDGFA, VEGFA, VEGFB.</p> <p>Cell Adhesion Molecules: <u>Cell-cell Adhesion:</u> CDH11, COL11A1, COL14A1, ICAM1, ITGB1, VCAM1. <u>Cell-matrix Adhesion:</u> ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGAM, ITGB1. <u>Other Cell Adhesion Molecules:</u> BGLAP, CD36, COL12A1, COL15A1, COL4A3, COL5A1, COMP, FN1, SCARB1, TNF.</p> <p>Transcription Factors and Regulators: MSX1, NFKB1, RUNX2, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SOX9, TNF, TWIST1, VDR.</p>
--

Figura 35. Genes de la ruta osteogénica evaluados en el qPCR-Array

3.16 Ensayos de citotoxicidad indirecta con el ensayo WST-1

La citotoxicidad indirecta es la que se produce en las células en ausencia de contacto con el material, es decir aquella toxicidad que puede ser causada por productos de degradación. Siguiendo las indicaciones de la ISO 10993-5 se preparó un extracto severo (disco de 0.4 g con 4.5 mL de agua sometido durante 1 hora a 120 °C) y uno suave (disco de 0.4 g con 4.5 mL de medio de cultivo sometido a 24 horas a 37 °C) y se ensayó sobre células HDF (ver sección 3.2.5). Una vez aplicados los extractos se evaluó la citotoxicidad mediante el ensayo colorimétrico WST-1 (ver Tabla 14). Dicho ensayo se basa en la reducción de una sal de tetrazolio por la acción de reductasas mitocondriales. El producto de la reacción es un compuesto soluble (formazán) de color rojo, cuya concentración se determina mediante absorbancia a 450 nm. Valores elevados de absorbancia son indicativos de una buena actividad mitocondrial y viabilidad celular; mientras que valores bajos son indicativos de daño citotóxico.

EL protocolo que se llevó a cabo se describe a continuación:

- a) Se siembran células HDF en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3.000 cel/pocillo.
- b) Tras 24 horas de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂ y 90 % humedad, se aplican 100 µL/pocillo de diluciones 1/2, 1/10, 1/100 y 1/1000 de los extractos suaves y severos en medio de cultivo con 0.5 % de FBS. Adicionalmente se aplica SDS 0.2 % como control positivo de citotoxicidad, y medio de cultivo con 10 % y 0.5 % de FBS como control negativo de citotoxicidad.
- c) Se incuban las muestras durante 24 y 48 horas a 37 °C, 5 % CO₂ y 90% humedad.
- d) Se aspira el medio de cultivo y se añaden 100 µL/pocillo de medio de cultivo con 10 % de WST-1.
- e) Se incuban las muestras durante 4 horas a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % humedad.
- f) Finalmente se hace la lectura de absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro.

3.17 Regeneración de defectos óseos creados en mandíbula de perros Beagles

Con la finalidad de evaluar el efecto del material KeraOs[®] en formato granulado con y sin recubrimiento de fibronectina (KOFN y KO respectivamente) en conjunto con células madre autólogas de tejido adiposo sobre la regeneración ósea en defectos mandibulares, se desarrollo un experimento *in vivo* empleando perros Beagles como modelo animal. El estudio se realizó en colaboración con la Unidad de Cirugía bucal y maxilofacial de la Universidad de Barcelona y el Grupo de investigación de Patología y Terapéutica Odontológica y Maxilofacial del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL).

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron 18 perros adultos de raza Beagle a los que se le crearon defectos mandibulares estándar. Los animales se repartieron tres grupos denominados A, B y C (6 perros por grupo). El experimento se diseño en cinco fases (ver Figura 36) que se describen a continuación:

- Fase I: se realizó la extracción bilateral de los premolares de las dos mandíbulas inferiores y la extracción de una muestra de panículo adiposo (grasa abdominal) de los 18 perros. Ambos procedimientos se hicieron en el mismo acto quirúrgico siguiendo la normativa vigente y bajo la supervisión de personal cualificado para garantizar la adecuada manipulación de los especímenes. A partir de las muestras de panículo adiposo se realizó el aislamiento y caracterización de las cADSCs en la Laboratorio Celltec-UB tal como se describió en la sección 3.3.2.
- Fase II: se mantuvieron los animales durante 3 meses para favorecer la cicatrización. Se aplicaron analgésicos y antibióticos durante 1 semana post-cirugía y se retiraron los puntos tras 10 días.
- Fase III: se practicaron 4 perforaciones en los espacios creados en ambas mandíbulas durante la fase I (desdentado), empleando el instrumento quirúrgico trefina. El volumen de cada defecto creado fue de 175 mm³ y se aplicaron de manera aleatoria los siguientes tratamientos:
 - a.- Control : no se coloca ningún tipo de implante
 - b.- 1,25 g de granulado KO
 - c.- 1,25 g de granulado recubierto con fibronectina (KO FN)
 - d.- 1,25 g de KO FN + 500.000 células cADSCs (autólogas)

Además de la cirugía se realizó un seguimiento de la proliferación celular pre y post- manipulación con el método Alamar Blue[®] (ver sección 3.7) durante 9 días. El termino pre-manipulación

corresponde a muestras tomadas a partir de los constructos KO FN-cADSCs antes de ser enviadas al estabulario de Bellvitge para ser utilizadas en la cirugía y que se mantienen siempre en las condiciones optimas de cultivo de las células cADSCs (37°C, 5% CO₂ y 90% humedad). El termino post-manipulación corresponde a muestras tomadas a partir de los constructos KO FN-cADSCs al culminar la cirugía. Este procedimiento se realiza con la finalidad de verificar que durante el traslado y el tiempo transcurrido durante la cirugía (entre 4 y 5 horas), las células mantengan su capacidad de adhesión y proliferación intacta.

- Fase IV: tras un mes de la colocación del implante en el grupo A, dos meses en el grupo B y tres meses en el grupo C, se abren las 4 perforaciones en una de las mandíbulas y se extrae una biopsia en forma de muestra cilíndrica del material generado en el alveolo correspondiente. La técnica utilizada es la de odontosección vertical medial, al objeto de evitar fracturas de tablas óseas. En la otra mandíbula, se coloca un implante de titanio en cada una de las 4 localizaciones.
- Fase V: transcurrido los tiempos de adaptación de los implantes en los tres grupos de animales (ver Figura 36), se realizó la eutanasia y se extrajeron las muestras donde se aplicarán técnicas histológicas y radiológicas para la estimación del desarrollo de hueso en la zona.

Finalmente puntualizar que nuestra participación en este experimento fue la siguiente:

- A.** Aislamiento y congelación de las células cADSCs a partir de la panícula adiposa extraída de los 18 perros.
- B.** Caracterización de las células cADSCs a través de citometría de flujo y diferenciación a múltiples linajes. Este procedimiento se realizó con las células madre provenientes de dos perros.
- C.** Preparación de los implantes:
 - C.1** Descongelación y amplificación de las cADSCs.
 - C.2** Recubrimiento con fibronectina de los granulados KO.
 - C.3** Siembra de las células cADSCs de cada perro sobre los granulados KO recubiertos con FN.
- D.** Evaluación de la proliferación celular de las células pre y pos-manipulación durante 9 días.

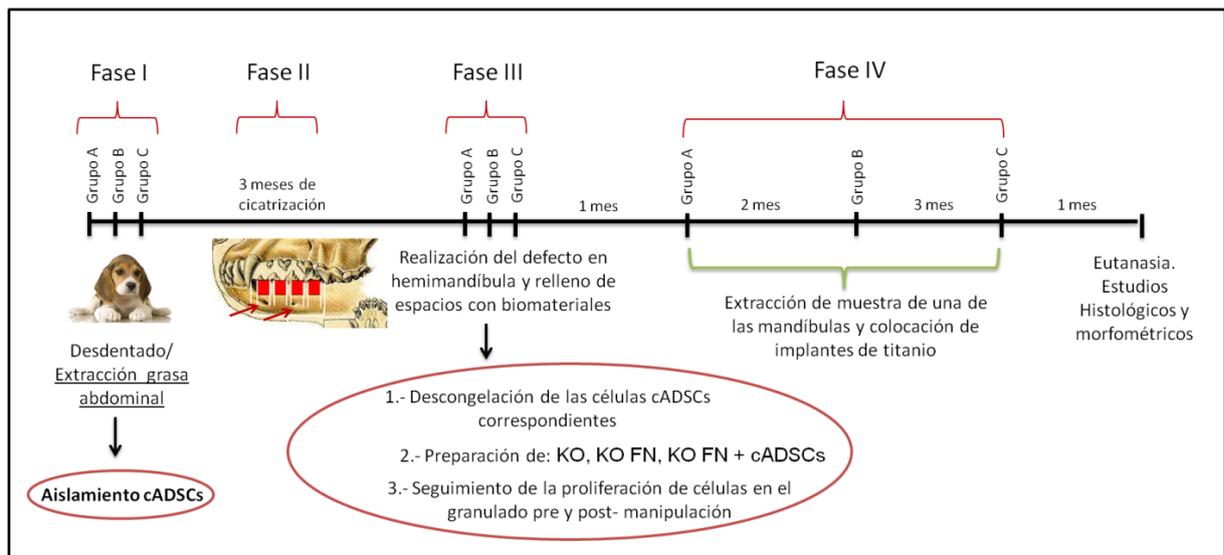


Figura 36. Esquema representativo de los procedimientos realizados en el experimento *in vivo* de la regeneración de defectos óseos mandibulares en perros de raza Beagle. La información ubicada en el interior de los óvalos rojos corresponde a los procedimientos realizados en el laboratorio Celltec-UB.

3.18 Análisis Estadístico

Con la finalidad de aplicar el análisis estadístico correspondiente, todos los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$) salvo que se especifique lo contrario. Los resultados cuantitativos han sido expresados como la media \pm desviación estándar. Las diferencias entre las medias se han testado mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Bonferroni, empleando el programa Graphpad Prism versión 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento y caracterización de células mesenquimales de tejido adiposo humano (hADSCs)

Las células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (hADSCs) se aislaron tal como se describe en la sección 3.2.1. Los cultivos primarios obtenidos son heterogéneos y tras 24 horas de incubación se observan células adheridas y no adheridas al plástico (ver Figura 37 A). Después de un lavado con D-PBS se eliminan gran parte de las células no adheridas (principalmente eritrocitos) y tras 48 horas de cultivo la población de células adheridas han hecho *spreading* presentando una morfología tipo fibroblástica (ver Figura 37 B). Tras 72 horas la apariencia del cultivo es más homogénea lo que indica una selección de la población celular en función de su capacidad de adhesión al plástico (ver Figura 37C).

La viabilidad celular tras realizar un pase y empleando la solución de Azul Tripán es del $97 \% \pm 2 \%$ y no existen diferencias significativas en función del donante. Bajo las condiciones de cultivo indicadas en la sección 3.2.1, los cultivos de pases 1 a 4 alcanzan una confluencia del 70 % tras 5 días de mantenimiento; sin embargo después del pase 5 la velocidad de proliferación disminuye y se observa la aparición de células de gran tamaño.

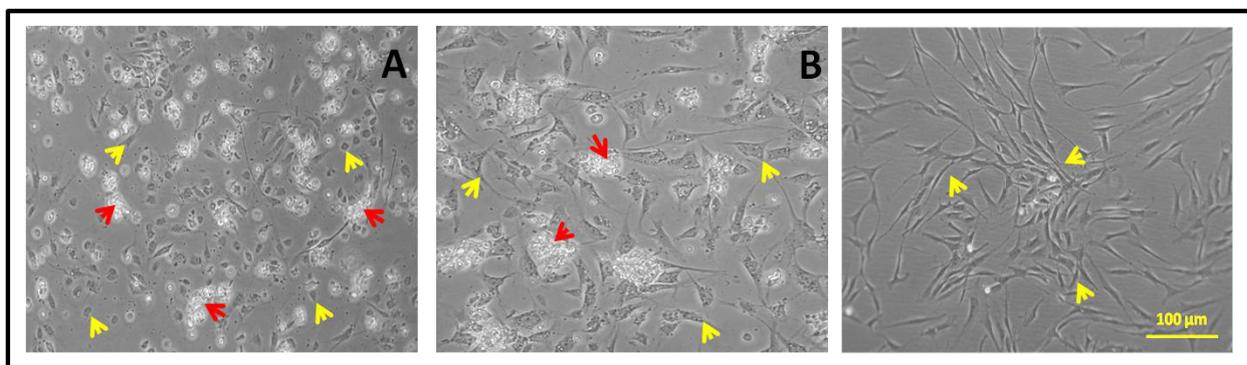


Figura 37. Células madre mesenquimales aisladas a partir de tejido adiposo humano y cultivadas durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C) con medio proliferativo (PM). Las flechas amarillas muestran células con capacidad de adhesión al plástico (hADSCs) mientras que las rojas muestran células que no se han adherido. Barra 100 μm

Con la finalidad de caracterizar el inmunofenotipo de las hADSCs aisladas se evaluó la expresión de un conjunto de marcadores de la superficie celular mediante citometría de flujo (ver sección 3.4.1). En la Figura 38 se muestra un gráfico que representa el porcentaje de expresión promedio de cada marcador en las células hADSCs aisladas a partir de los 4 donantes. Los resultados indican que la expresión es positiva ($\geq 95 \%$) para los antígenos de superficie CD105, CD73, CD90, CD29 y CD44 asociados a células progenitoras; mientras que es negativa ($\leq 2 \%$) para los antígenos CD14, CD34, CD45, CD271 y HLA-DRII

asociados mayoritariamente a células hematopoyéticas, endoteliales o del sistema inmunológico. Es importante destacar que el patrón de marcadores mostrado se mantiene en cultivos celulares entre países 1 y 6. De especial interés es una elevada expresión ($\geq 95\%$) del marcador CD90 el cual ha sido descrito por otros autores como un marcador de células con capacidad osteo-progenitora^{99,165,166}.

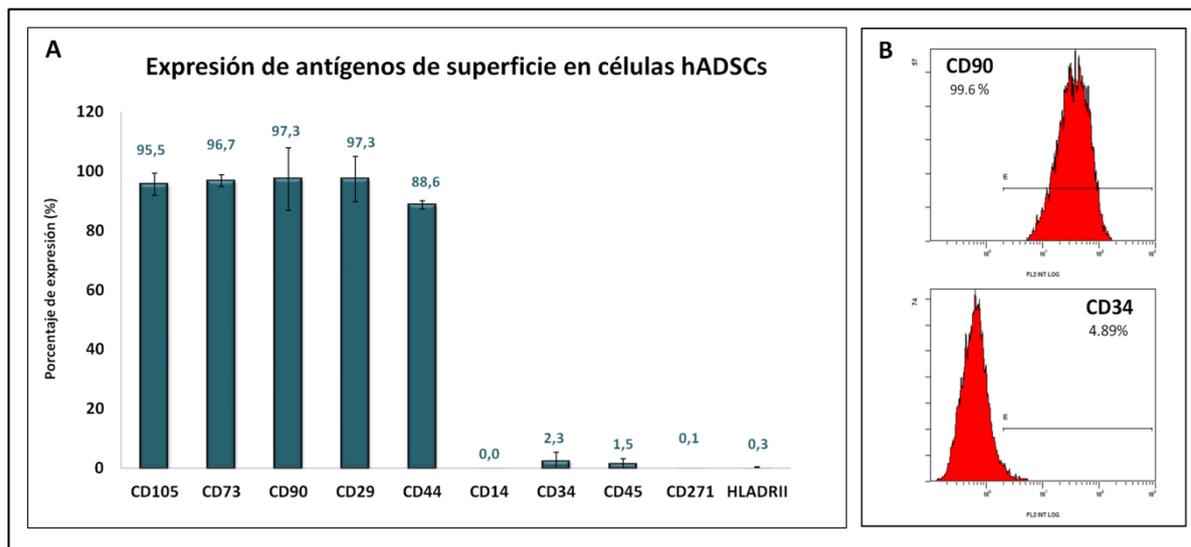


Figura 38. Análisis de expresión de marcadores de superficie en células hADSCs mediante citometría de flujo. A) Las barras del gráfico representan los valores promedios del porcentaje de expresión de cada marcador en células aisladas a partir de 4 donantes. Se puede observar una expresión $\geq 95\%$ de antígenos CD105, CD73, CD90, CD29 y CD44; y una expresión $\leq 2\%$ de CD14, CD34, CD45, CD271 y HLA-DR11. **B)** Gráficos representativos de la expresión de los marcadores CD90 y CD34 correspondiente a un donante. $n=3$ $P \leq 0.05$.

La capacidad progenitora de las células hADSCs se confirmó mediante su diferenciación hacia linaje osteogénico, adipogénico, miogénico y condrogénico empleando los medios inductores descritos en la Tabla 11.

Bajo condiciones de diferenciación osteogénica empleando el medio de cultivo OM (ver sección 3.4.2.1), las células hADSCs exhiben un fenotipo cuboidal y forman una ECM calcificada que ha sido revelada mediante la tinción de Rojo de Alizarina tras 21 días de cultivo (ver Figura 39 B). A diferencia de éstas las células control (mantenidas con medio PM) mantienen un fenotipo alargado tipo fibroblástico y no se detectó mineralización de la matriz con la tinción aplicada (ver Figura 39 A).

Adicionalmente se cuantificó la actividad de la enzima ALP y la expresión de marcadores altamente involucrados en las rutas de diferenciación osteogénica encontrándose diferencias significativas entre las células tratadas con medio OM y las células control. Los resultados se detallan más adelante comparando los resultados obtenidos para éste tipo celular con otras líneas control (ver Figura 49, Figura 50 y Tabla 24).

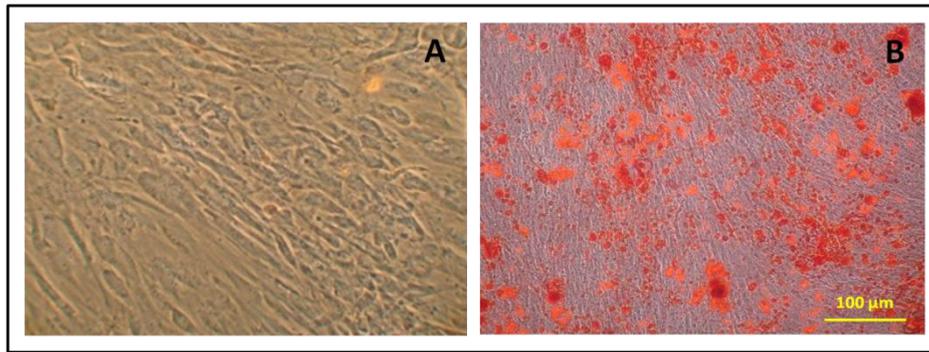


Figura 39. Tinción Rojo de Alizarina de células hADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. (A) Células control mantenidas con medio PM, (B) Células inducidas a diferenciación osteogénica con medio OM. Únicamente las células que han sido inducidas a diferenciación osteogénica son positivas para la tinción de Rojo Alizarina. Barra 100 µm.

Bajo condiciones de diferenciación adipogénica empleando el medio de cultivo AM (ver sección 3.4.2.2), las células hADSCs exhiben una disminución significativa en la tasa de proliferación y un incremento del tamaño celular respecto a las células control (mantenidas con medio PM). A partir de 7 días en cultivo se aprecian vesículas lipídicas en el citoplasma celular que incrementan en número y tamaño a lo largo del tiempo únicamente en las células tratadas con el medio inductor (ver Figura 40 A y B). La tinción de los lípidos intracelulares con Oil Red (ver sección 3.8.3) confirmó el fenotipo adipogénico tras 21 días de cultivo (ver Figura 40 C y D).

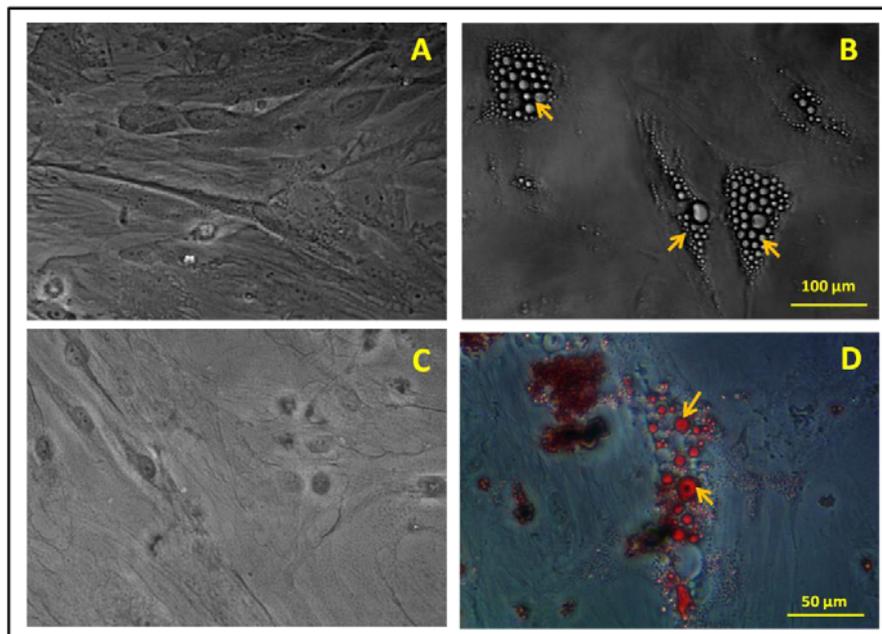


Figura 40. Tinción Oil red de células hADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y adipogénico (AM) tras 21 días de cultivo. (A y C) Células control mantenidas con medio PM. (B y D) Células inducidas a diferenciación adipogénica con medio AM. La presencia de gotas lipídicas intracelulares (flechas) se observa únicamente en las células que han sido inducidas a diferenciación adipogénica donde la tinción Oil Red es positiva. Barras 100 µm (A, B) y 50 µm (C, D).

Bajo condiciones de diferenciación miogénica empleando el medio de cultivo MM (ver sección 3.4.2.3) y tras 28 días de cultivo, se observan células multi-nucleadas tipo miotubos aproximadamente en el 60 % de la placa de cultivo (ver Figura 41). El fenotipo miogénico se confirmó mediante el marcaje fluorescente (ver sección 3.9) de las células cultivadas con el medio inductor empleando los anticuerpos anti MyoD y anti MyHC. Las células control (cultivadas con el medio PM) no sufrieron cambios morfológicos y el marcaje con los anticuerpos fue negativo.

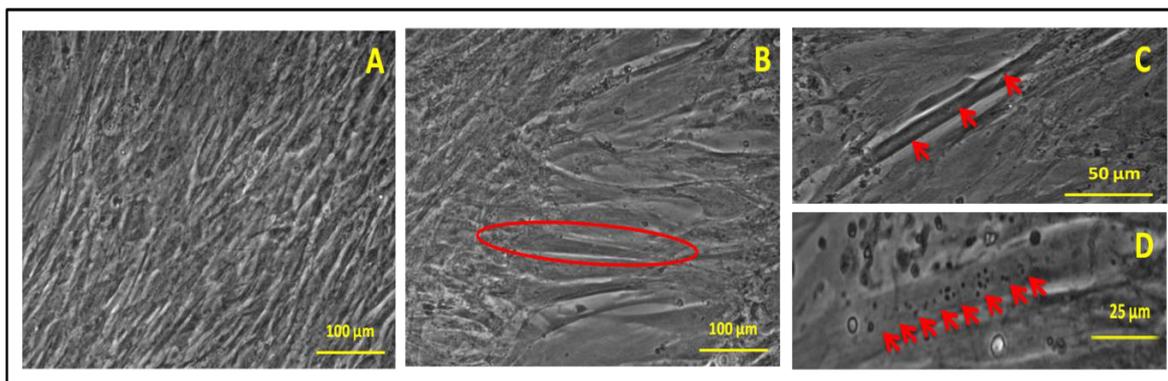


Figura 41. Imágenes de contraste de fases de células hADSCs con medio proliferativo (PM) y miogénico (MM) tras 28 días de cultivo. (A) Células control mantenidas con medio PM. **(B)** Células inducidas a diferenciación miogénica con medio MM. Se resalta una morfología celular tipo miotubos (óvalo). **(C y D)** Detalle de las células inducidas a diferenciación miogénica resaltando la presencia múltiples núcleos (flechas). Barras 100 μm (A y B), 50 μm y 25 μm (C y D respectivamente).

Bajo condiciones de diferenciación condrogénica empleando el medio de cultivo CM (ver sección 3.4.2.4), el sedimento celular adquiere la forma de una esfera compacta (micromasa) tras 24 horas de cultivo. La tinción positiva de la micromasa con azul Alcian revela la presencia de proteoglicanos sulfatados (sustancias características de tejidos cartilaginosos) en la ECM tras 28 días de cultivo (ver Figura 42)

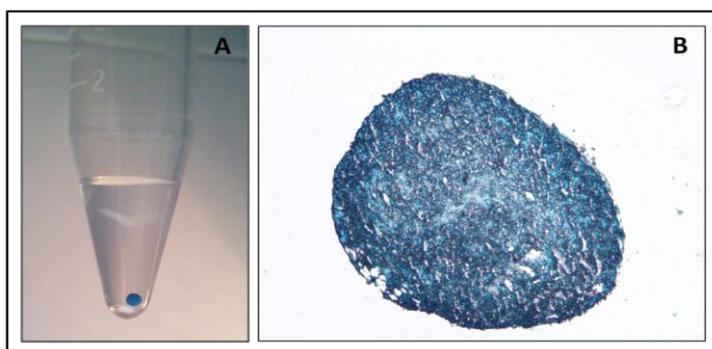


Figura 42. Tinción Azul Alcian de células hADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y condrogénico (CM) tras 21 días de cultivo. (A) Sedimento celular con forma de esfera compacta obtenido tras cultivar las células hADSCs con medio CM. **(B)** Corte histológico del sedimento celular donde se aprecia una tinción positiva la matriz extracelular (ECM) con Azul Alcian.

Los resultados obtenidos indican que las células madre de tejido adiposo humano aisladas, cumplen con todos los criterios establecidos por la International Society for Cellular Therapy para la identificación de células mesenquimales. Dichos criterios se resumen en la Tabla 6.

4.1. Aislamiento y caracterización de células mesenquimales de tejido adiposo canino (cADSCs)

Las células madre mesenquimales de tejido adiposo canino se aislaron tal como se describe en la sección 3.3.2. Los cultivos primarios obtenidos son heterogéneos y tras 24 horas de incubación se observan células adheridas y no adheridas al plástico (ver Figura 43 A). Después de un lavado con D-PBS desaparecen gran parte de las células no adheridas y tras 48 horas se observa la formación de numerosos clones en toda la placa de cultivo formados a partir de las células adheridas (ver Figura 43 B). Tras 72 horas la población de células adheridas hace *spreading* y presenta una morfología tipo fibroblástica. La apariencia del cultivo es más homogénea lo cual indica una selección de la población celular en función de su capacidad de adhesión al plástico (ver Figura 43 C).

La viabilidad celular tras realizar un pase y empleando la solución de azul Tripán es de $98 \% \pm 2 \%$ para las células provenientes de los 18 perros. Bajo las condiciones indicadas en la sección 3.3.2 los cultivos de pases 1 a 6 alcanzan el 70 % de confluencia tras 3 días de mantenimiento y no se observan células senescentes.

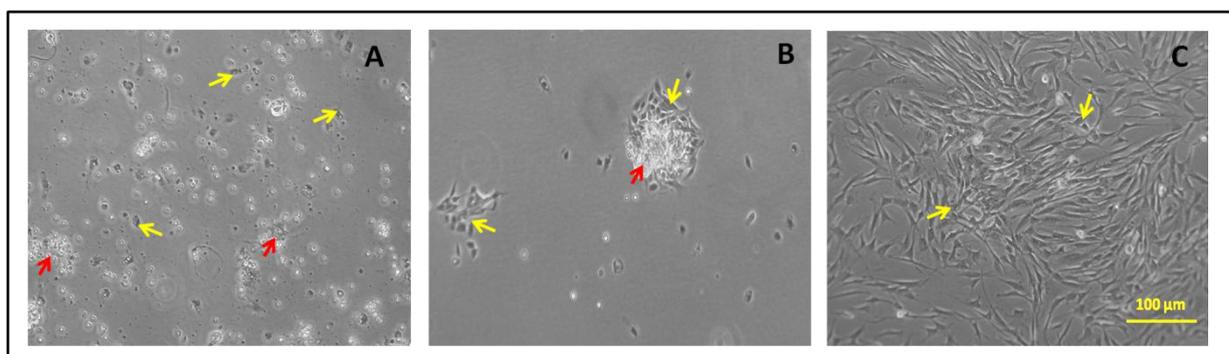


Figura 43. Células madre mesenquimales aisladas a partir de panícula adiposo canino y cultivadas durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C) con medio proliferativo (PM). Las flechas amarillas muestran células con capacidad de adhesión al plástico (cADSCs) mientras que las rojas muestran células que no se han adherido. Barra 100 µm

Con la finalidad de caracterizar el inmunofenotipo de las cADSCs aisladas se evaluó la expresión de un conjunto de marcadores de la superficie celular mediante citometría de flujo (ver sección 3.4.1). En la Figura 38 se muestra un gráfico que representa el porcentaje de expresión promedio de cada marcador en las células cADSCs aisladas a partir de 2 perros. Los resultados indican que la expresión es negativa ($\leq 2\%$) para todos los antígenos ensayados con excepción del CD44 donde la expresión es del 73,3%. Es importante destacar que no existen en el mercado anticuerpos específicos para la detección de los mencionados antígenos específicos para perro, por lo que se utilizaron los anticuerpos mencionados en la Tabla 16 que según las especificaciones de las casas comerciales solo han sido probados en humanos. Por lo tanto es probable que los resultados negativos obtenidos sean debido a los anticuerpos utilizados.

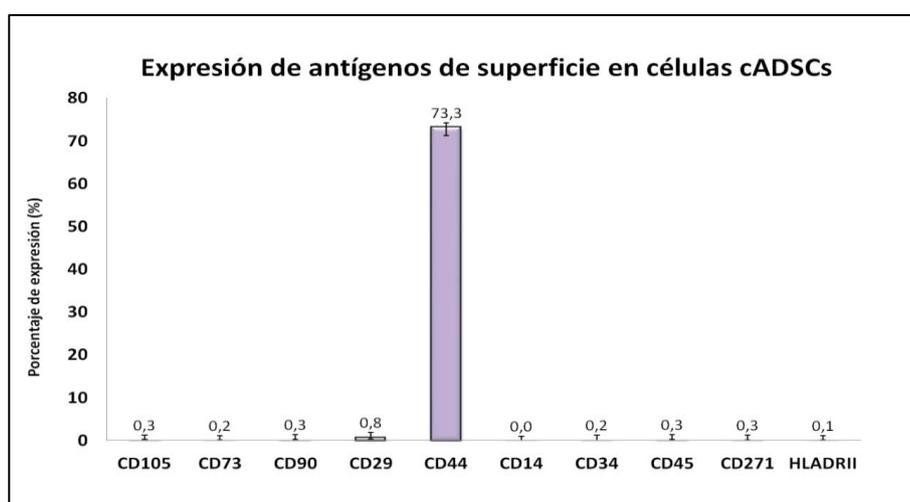


Figura 44. Análisis de expresión de marcadores de superficie en células cADSCs mediante citometría de flujo. Las barras del gráfico representan los valores promedio del porcentaje de expresión de cada marcador en las cADSCs aisladas a partir de 2 perros. Se observa una expresión $\leq 2\%$ de todos los antígenos con excepción del CD44 que muestra una expresión del 73,3%. n=3

A pesar del resultado obtenido en la expresión de marcadores de la superficie celular, la capacidad progenitora de las células cADSCs se confirmó mediante su diferenciación a linajes específicos empleando los medios inductores descritos en la Tabla 11. Los resultados obtenidos son similares a los descritos para las células hADSCs y se describen brevemente a continuación:

a.- Linaje Osteogénico (ver Figura 45): las células cADSCs cultivadas con medio OM forman una ECM calcificada que es revelada mediante la tinción de Rojo de Alizarina tras 21 días de cultivo.

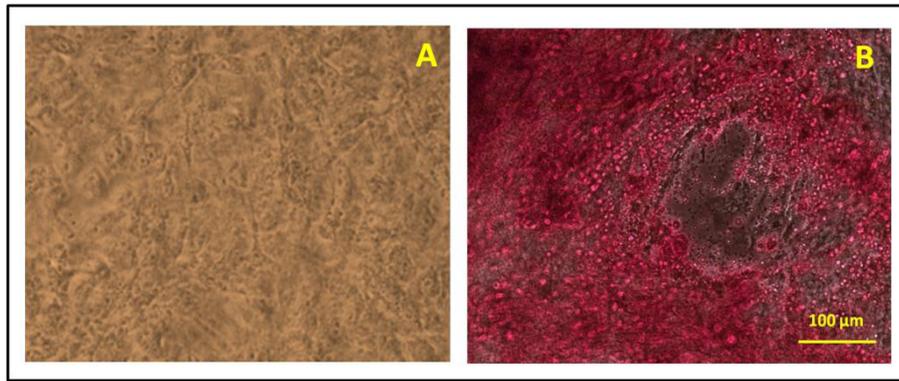


Figura 45. Tinción Rojo de Alizarina de células cADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. (A) Células control mantenidas con medio PM, (B) Células inducidas a diferenciación osteogénica con medio OM. Únicamente las células que han sido inducidas a diferenciación osteogénica son positivas para la tinción de Rojo Alizarina. Barra 100 µm.

b.- Linaje Adipogénico (ver Figura 46): las células cADSCs cultivadas con medio AM presentan lípidos intracitoplasmáticos que se tiñen con el colorante Oil red tras 21 días de cultivo.

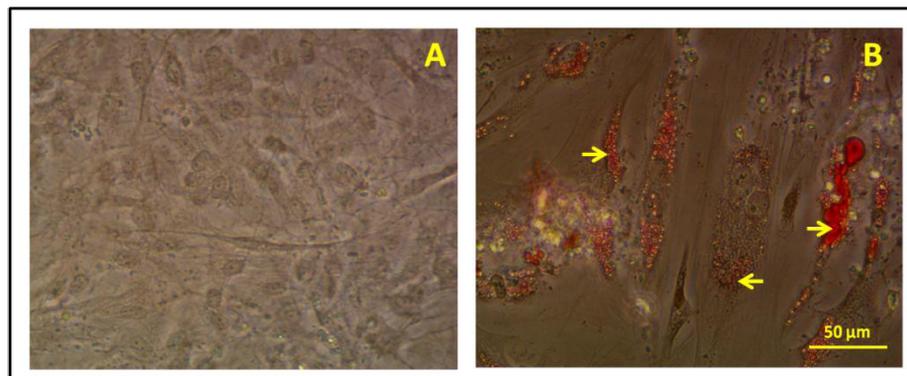


Figura 46. Tinción Oil Red de células cADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y adipogénico (AM) tras 21 días de cultivo. (A y C) Células control mantenidas con medio PM. (B y D) Células inducidas a diferenciación adipogénica con medio AM. La presencia de gotas lipídicas intracelulares (flechas) se observa únicamente en las células que han sido inducidas a diferenciación adipogénica donde la tinción Oil Red es positiva. Barras 100 µm (A, B) y 50 µm (C, D).

c.- Linaje Miogénico (ver Figura 47): las células cADSCs cultivadas con medio MM cambian de morfología observándose células multinucleadas tipo miotubos tras 28 días de cultivo. A diferencia de las hADSCs no se observó marcaje fluorescente con los anticuerpos anti MyoD y anti MyHC (antígenos humanos).

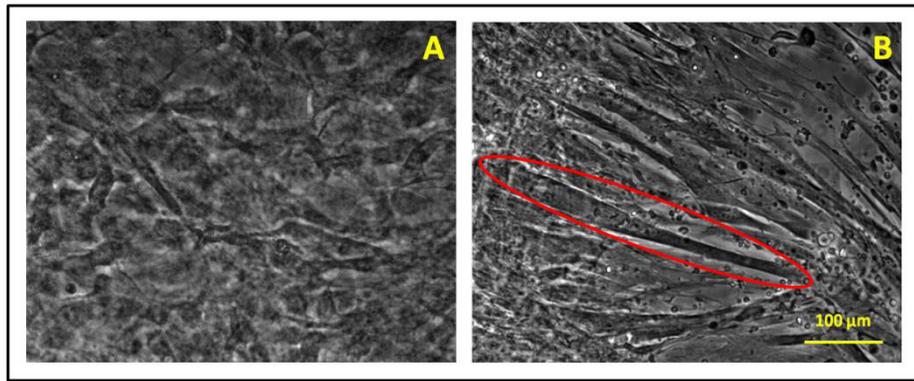


Figura 47. Imágenes de contraste de fases de células cADSCs con medio proliferativo (PM) y miogénico (MM) tras 28 días de cultivo. (A) Células control mantenidas con medio PM. (B) Células inducidas a diferenciación miogénica con medio MM. Se resalta una morfología celular tipo miotubos (óvalo). Barra 100 μm

d.- Linaje Condrogénico (ver Figura 48): el sedimento celular toma la forma de micromasa tras 24 horas de cultivo. La tinción positiva de la micromasa con Azul Alcian revela la presencia de proteoglicanos sulfatados (sustancias características de tejidos cartilagosos) en la ECM tras 28 días de cultivo.

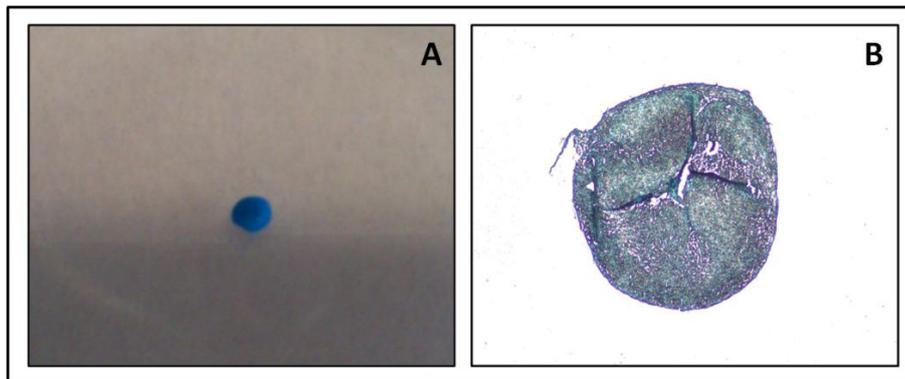


Figura 48. Tinción Azul Alcian de células cADSCs mantenidas con medio proliferativo (PM) y condrogénico (CM) tras 21 días de cultivo. (A) Sedimento celular con forma de esfera compacta obtenido tras cultivar las células hADSCs con medio CM. (B) Corte histológico del sedimento celular donde se aprecia una tinción positiva de la matriz extracelular (ECM) con Azul Alcian.

4.2. Comparación de la capacidad de diferenciación osteogénica de células hADSCs y cADSCs con las líneas MC3T3 y hFOB 1.19.

La capacidad de diferenciación osteogénica de células hADSCs y cADSCs se comparó con una línea celular de osteoblastos murinos (MC3T3) y otra línea inmortalizada de osteoblastos embrionarios humanos (hFOB 1.19). Ambas líneas han sido ampliamente utilizadas como modelo de células osteoprogenitoras en el estudio de mecanismos moleculares involucrados en los procesos de diferenciación osteogénica y en la evaluación de la respuesta celular frente a biomateriales creados con la finalidad de facilitar la regeneración de tejido óseo¹⁶⁷⁻¹⁷¹.

Las condiciones de diferenciación de las células MC3T3 y hFOB 1.19 se indican en las secciones 3.2.3 y 3.2.4 respectivamente; mientras que las de las células hADSCs y cADSCs se detallan en la sección 3.4.2.1. La respuesta celular a la inducción hacia linaje osteogénico se evaluó en términos de mineralización de la ECM, actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) y expresión de genes involucrados en rutas de diferenciación osteogénica tras 14 y 21 días de cultivo.

Bajo condiciones de inducción hacia linaje osteogénico, los cultivos celulares de hFOB 1.19, hADSCs y cADSCs forman una ECM calcificada revelada mediante la tinción de Rojo de Alizarina tras 14 días de cultivo (ver Figura 49 A). La mayor área de mineralización se detectó en los cultivos de células cADSCs. Los cultivos mantenidos bajo condiciones de proliferación de los cuatro tipos celulares y las MC3T3 bajo condiciones de diferenciación no mostraron indicios de mineralización de la matriz en el período indicado. Tras 21 días de cultivo (ver Figura 49 B) los 4 tipos celulares mantenidos bajo condiciones de diferenciación forman una matriz mineralizada, siendo el marcaje con rojo de Alizarina más intenso en las células hADSCs y cADSCs respecto a las MC3T3 y hFOB 1.19. Sin embargo, es importante destacar que en éstas últimas también se detecta una leve mineralización de la matriz en los cultivos mantenidos bajo condiciones de proliferación.

Por otra parte se cuantificó la actividad de la enzima ALP (ver Figura 50), la cual está implicada en el proceso de mineralización de la ECM. Los resultados indican que en los cuatro tipos celulares las condiciones de diferenciación inducen un incremento significativo de la actividad ALP respecto a las células cultivadas bajo condiciones proliferativas tras 14 y 21 días de cultivo. Las células MC3T3 y hFOB 1.19 presentan una actividad superior respecto a las células hADSCs y cADSCs a día 14. Sin embargo en las células MC3T3 los valores disminuyen drásticamente a día 21, mientras que en los otros tipos celulares aumentan. Asimismo es importante destacar que los máximos valores de actividad ALP son alcanzados por las células hFOB 1.19 y hADSCs cultivadas con medio OM a día 21.

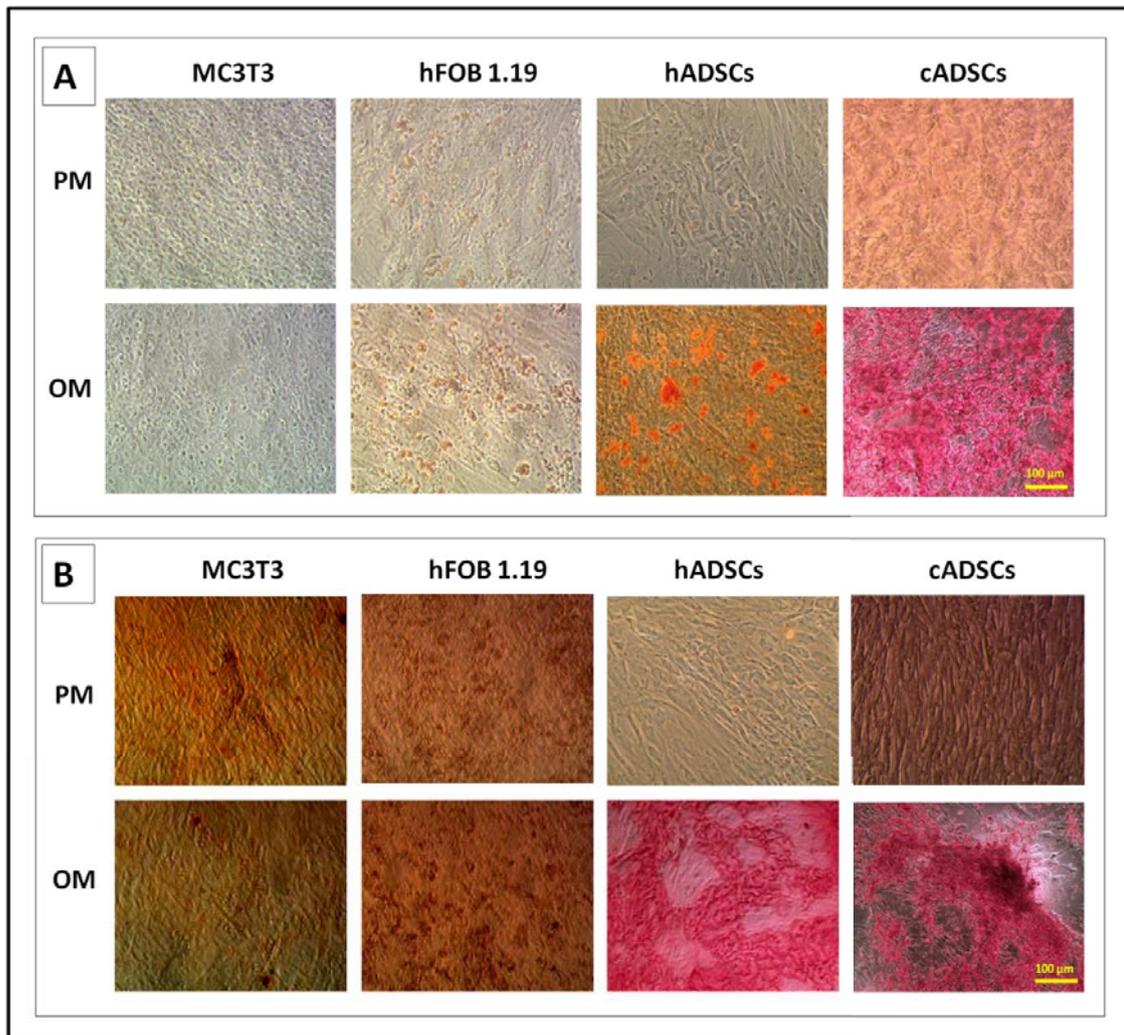


Figura 49. Tinción de Rojo Alizarina sobre células MC3T3, hFOB. 1.19, hADSCs y cADSCs mantenidas bajo condiciones de proliferación (PM) o inducción a linaje osteogénico (OM). Tras 14 días de cultivo (A) las células hFOB 1.19, hADSCs y cADSCs mantenidas con medio PM forman una matriz calcificada, encontrándose la máxima intensidad de tinción en las cADSCs. Tras 21 días (B) todas las líneas mantenidas con medio OM, forman matriz mineralizada, aunque la máxima intensidad de coloración se aprecia en las células hADSCs y cADSCs.

Por último se cuantificó mediante PCR en tiempo real (ver sección 3.14) la expresión de mRNA de fosfatasa alcalina (ALP), osteonectina (ON) y osteocalcina (OC) que son tres genes involucrados en el proceso de osteogénesis. En todos los casos la expresión fue significativamente superior en las células cultivadas bajo condiciones de diferenciación tanto a día 14 como a día 21.

Los valores del índice de expresión relativo de las células tras 14 y 21 días varían significativamente en función del tipo celular. Por ejemplo las células MC3T3 tras 14 días de cultivo con medio OM tienen un índice de expresión del gen ALP de $239,38 \pm 45,2$ mientras que las células hADSCs con el mismo medio de cultivo tienen un índice de expresión de $9,32 \pm 1,2$. Tomando en cuenta esta variabilidad en la Tabla 24 se muestran los valores expresados como la tasa de variación de la expresión de cada línea celular cultivada bajo condiciones osteogénicas respecto a la expresión de las células cultivadas bajo condiciones de proliferación. A día 21 los valores indican un incremento significativo de la expresión

respecto a día 14 para las células hFOB 1.19, hADSCs y cADSCs; mientras que hay una disminución en la expresión de las MC3T3. Las máximas tasas de incremento en la expresión para los tres marcadores son alcanzados por las células hFOB 1.19 y hADSCs.

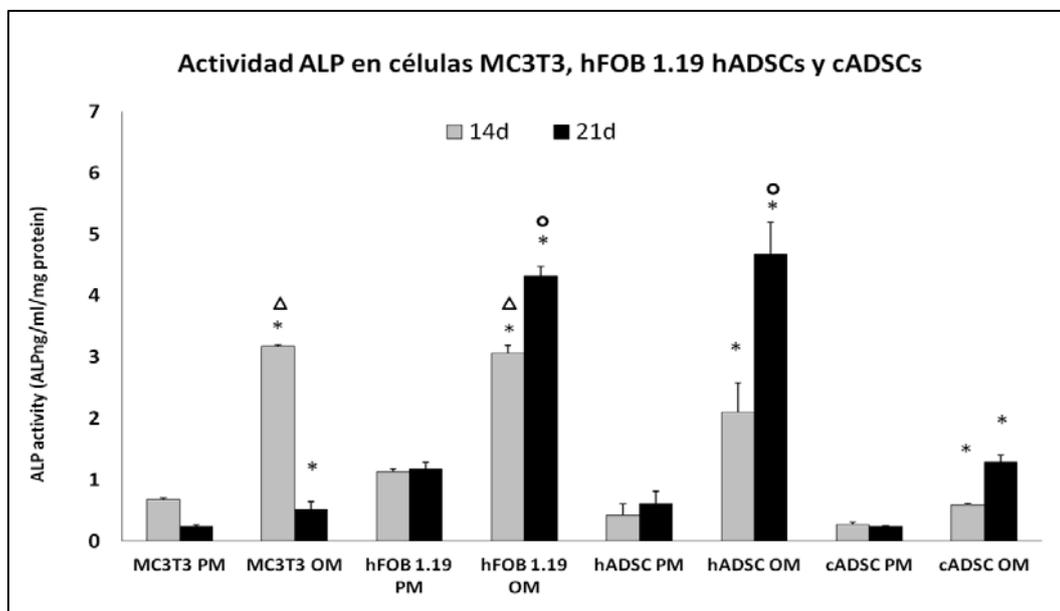


Figura 50. Representación gráfica de la actividad de la enzima ALP en células MC3T3, hFOB. 1.19, hADSCs y cADSCs mantenidas bajo condiciones de proliferación (PM) o inducción a linaje osteogénico (OM). En los cuatro tipos celulares las condiciones de inducción osteogénica producen un incremento significativo de la actividad ALP respecto a las células cultivadas bajo condiciones proliferativas tras 14 y 21 días de cultivo (* P ≤ 0.05). Comparando todas las condiciones a día 14, los máximos valores de actividad se registran en las células MC3T3 y hFOB 1.19 (Δ P ≤ 0.05). Comparando todas las condiciones a día 21, los máximos valores se registran en las células hFOB 1.19 y hADSCs (○ P ≤ 0.05) cultivadas en condiciones osteogénicas.

Tiempo (días)	Tipo celular	Expresión de marcadores (tasa de variación)		
		ALP	ON	OC
14	MC3T3	2,3 ± 0,3	0,8 ± 0,0	1,9 ± 0,5
	hFOB 1.19	4,0 ± 0,8	1,3 ± 0,2	3,2 ± 0,7
	hADSCs	3,9 ± 0,7	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,2
	cADSCs	1,5 ± 0,1	4,8 ± 1,4	2,5 ± 0,6
21	MC3T3	4,4 ± 0,2	2,4 ± 0,8	1,5 ± 0,8
	hFOB 1.19	7,4 ± 0,8	10,1 ± 1,9	4,3 ± 1,0
	hADSCs	8,2 ± 0,3	16,2 ± 3,7	4,9 ± 0,4
	cADSCs	6,5 ± 0,6	7,5 ± 1,6	3,6 ± 0,3

Tabla 24. Tasa de variación de la expresión de células MC3T3, hFOB 1.19, hADSCs y cADSCs cultivadas bajo condiciones de diferenciación osteogénica (OM) respecto a las cultivadas bajo condiciones de proliferación (PM). En las células A hFOB 1.19, hADSCs y cADSCs hay un incremento significativo de la expresión a día 21 respecto a día 14. Las máximas tasas de incremento en la expresión para los tres marcadores son alcanzados por las células hFOB 1.19 y hADSCs.

4.3. Estandarización y Biocompatibilidad del biomaterial KeraOs®

Tal como se mencionó en la sección 3.5.1, el material KeraOs® de la empresa Keramat estaba en desarrollo cuando el trabajo experimental de esta tesis se inició. De manera que era necesario realizar todas las pruebas de biocompatibilidad establecidas por la norma ISO 10993-5. En este sentido, la empresa Keramat proporcionó inicialmente el material en formato de disco para facilitar todos los estudios de estandarización de la metodología y la biocompatibilidad *in vitro*. Posteriormente facilitaron el material en formato granulado, con lo cual se adaptó la metodología de trabajo y se realizaron los estudios de biocompatibilidad de forma comparativa con otros materiales comerciales disponibles en el mercado.

La estandarización de la metodología para la evaluación de la respuesta de células cultivadas sobre biomateriales y el estudio de biocompatibilidad, se ha realizado empleando la línea primaria de fibroblastos humanos HDF (ver sección 3.2.5). La respuesta celular se evaluó en términos de adhesión, proliferación y morfología de las células cultivadas sobre discos KeraOs® (KOd). Posteriormente de forma comparativa se evaluó la respuesta celular (empleando los mismos parámetros) sobre granulados KeraOs® (KO), Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC) y Cerasorb®. La siembra y cultivo celular sobre los biomateriales se realizó tal como se describe en las secciones 3.5.2.1 y 3.5.2.2 para discos y granulados respectivamente con las variaciones indicadas al final de cada sección durante el proceso de estandarización.

4.4.1 Discos KeraOs®

A. Densidad inicial de siembra (Nº cel/disco) y determinación del porcentaje de adhesión de células al disco.

Empleando un volumen de acondicionamiento de los discos KOd fijo (50 µL/disco), se realizó la siembra de células HDF con dos densidades iniciales diferentes: 12.000 y 20.000 cel/disco ambas en un volumen final de siembra de 50 µL. Tras 3 horas de adhesión se separan las células adheridas de las no adheridas al disco tal como se describió en materiales y métodos (ver Figura 28) y se cuantificó la viabilidad celular mediante el método AB (ver sección 3.7). Los datos obtenidos (ver Figura 51) muestran que con la siembra de 12.000 cel/disco no existen diferencias significativas entre los valores de fluorescencia de células adheridas al disco, no adheridas y el blanco. Por el contrario al realizar la siembra de 20.000 cel/disco la variación en los valores de fluorescencia es significativa, lo que permite calcular el

porcentaje de células adheridas al disco mediante la fórmula descrita en la sección 3.7. Bajo estas condiciones el porcentaje de adhesión fue del $63 \% \pm 2,3$.

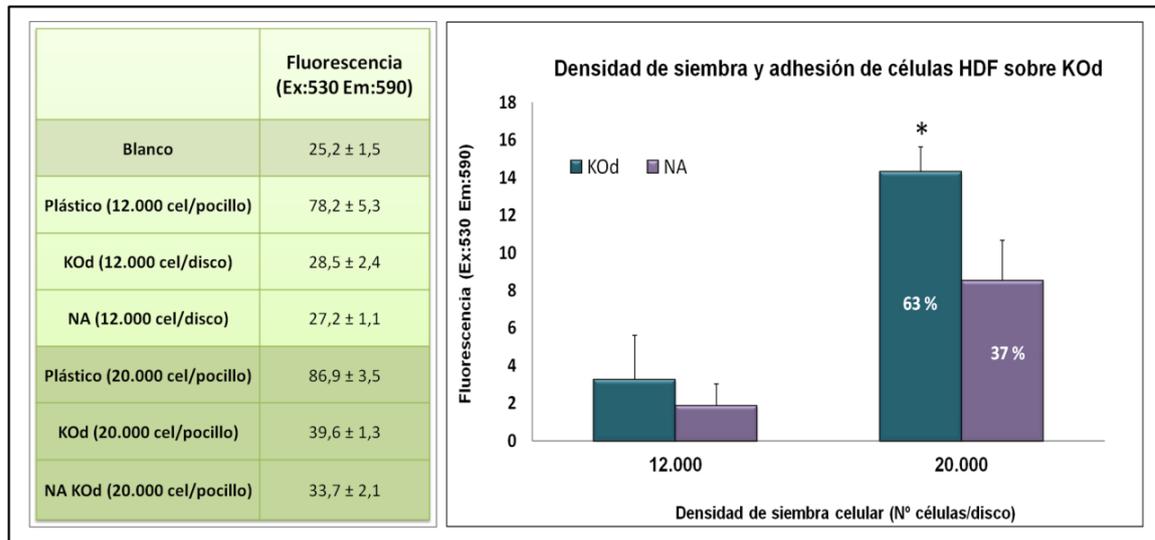


Figura 51. Efecto de la densidad de siembra en la cuantificación del porcentaje de adhesión de células HDF sobre discos KeraOs (KOd). Cuantificación de células adheridas y no adheridas a discos KOd empleando las densidades de siembra de 12.000 y 20.000 cel/disco. En la tabla se indican los valores netos de fluorescencia obtenidos mediante el método AB. El gráfico muestra los valores de fluorescencia (restando el blanco) de las células adheridas y no adheridas a discos KOd. Solo se observan diferencias significativas entre las células adheridas y no adheridas al disco, cuando la densidad inicial de siembra es de 20.000 cel/disco (* $P \leq 0,05$).

B. Relación del volumen de acondicionamiento y siembra de discos ($\mu\text{L}/\mu\text{L}$): 100/50; 75/50 y 75/25

Empleando una densidad fija de células (20.000 cel/disco) se evaluó el efecto de la variación de la relación de los volúmenes de acondicionamiento y siembra celular sobre el porcentaje de adhesión de las células al disco (ver Figura 52). Los resultados indican que el mayor porcentaje de adhesión ($85 \% \pm 5$) se encuentra al aplicar la relación 75/25, mientras que el menor se encuentra al utilizar la relación 100/50. La razón principal es que al aplicar volúmenes más grandes el disco se satura y al sembrar las células parte de la suspensión celular no queda retenida en el disco.

A pesar de que el mayor porcentaje de adhesión se encontró empleando los volúmenes de acondicionamiento y siembra de 75/25 respectivamente; para los siguientes estudios se decidió utilizar la relación 75/50 ya que permite una mejor distribución de las células en disco y el cultivo podía ser mantenido al menos por una semana sin mostrar señales de muerte o de disminución del número de células.

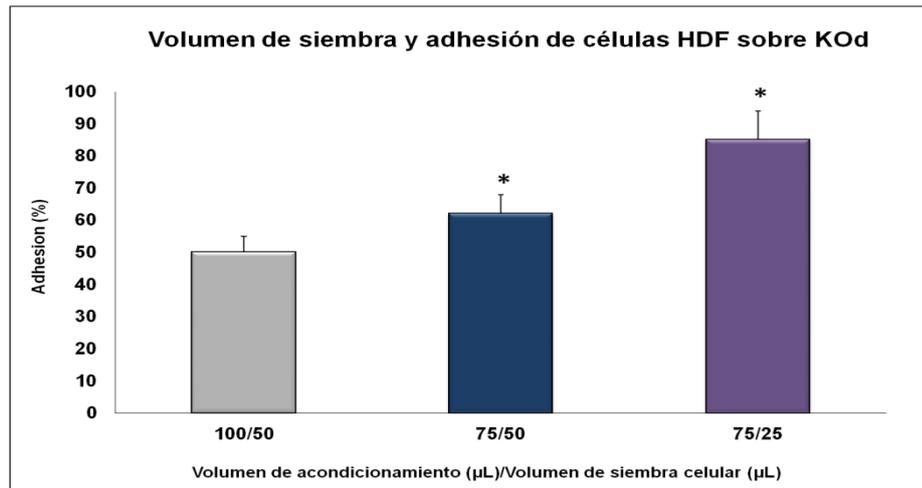


Figura 52. Efecto del volumen de acondicionamiento y siembra en el porcentaje de adhesión de células HDF sobre discos KeraOs (KOD). Se calculó el porcentaje de células adheridas y no adheridas a discos KOd empleando una densidad fija de células (20.000 cel/disco). Las relaciones volumen de acondicionamiento y siembra celular ensayadas han sido 100/50, 75/50 y 75/25 respectivamente. Mientras más pequeño es el volumen de acondicionamiento y siembra, mayor es el porcentaje de células que se adhieren al disco. Las relaciones 75/50 y 75/25 incrementan significativamente el porcentaje de adhesión respecto a la relación 100/50 (* $P \leq 0.05$).

C. Proliferación de células HDF sobre discos KOd

Una vez seleccionados los parámetros óptimos de volumen de acondicionamiento (75 µL), densidad celular (20.000cel/disco) y volumen de siembra (50 µL), se evaluó la proliferación de células HDFN sobre KOd mediante el método AB (ver sección 3.7) durante 7 días. Como control se sembraron células HDFN sobre plástico (placas de 24 pocillos) a la misma densidad. Los resultados indican que en ambas superficies el número de células incrementa en el tiempo, es decir proliferan. Sin embargo sobre KOd el crecimiento es más lento mostrando una tasa de proliferación relativa del 56 %. Esto indica que la tasa de proliferación celular se reduce un 44 % respecto al control (ver Figura 53).

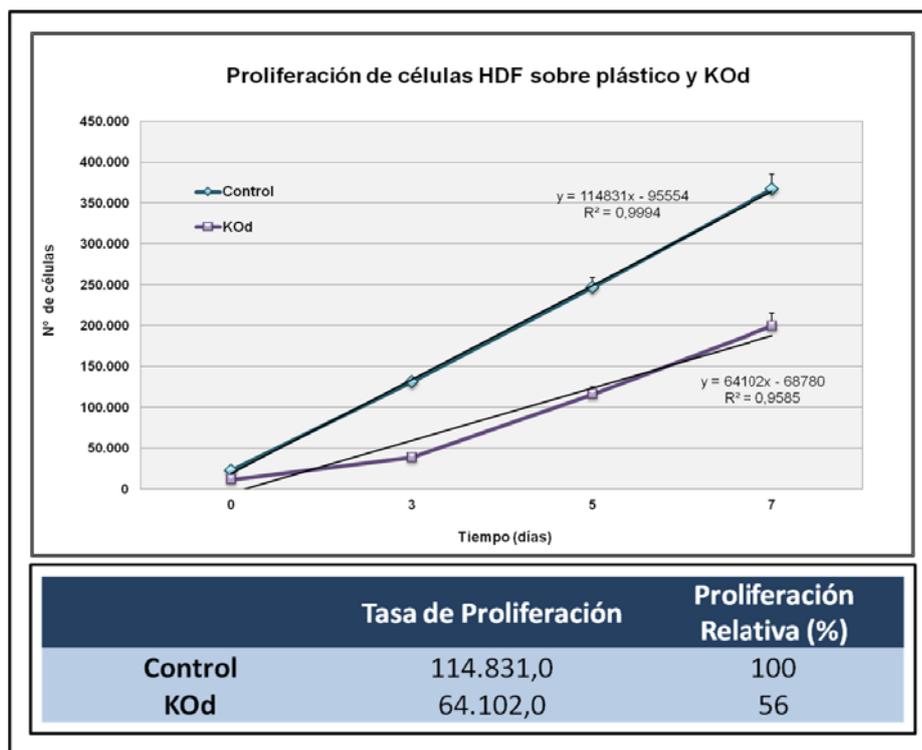


Figura 53. Proliferación de células HDF sobre discos KeraOs (KOD) y plástico. Con el método Alamar Blue® (AB), se cuantificó la viabilidad celular midiendo la fluorescencia a los días 0, 3, 5 y 7 de cultivo. Empleando una curva estándar (datos no mostrados) se transformaron los datos de fluorescencia en Nº de células. La tasa de proliferación de las células crecidas sobre KOD es un 44% inferior respecto a las células crecidas en plástico.

D. Citotoxicidad indirecta

Los ensayos de citotoxicidad indirecta con extractos suaves y severos de discos KOD se realizaron tal como se describe en la sección 3.16. Los resultados obtenidos (ver Figura 54) indican que ambos extractos (suave y severo) a diluciones 1/2, 1/10, 1/100 y 1/1000 no inducen toxicidad sobre las células. Los valores de absorbancia obtenidos mediante el método WST-1 de todos los tratamientos no muestran diferencias significativas respecto al control (células HDF mantenidas con medio de cultivo) tras 24 y 72 horas de cultivo.

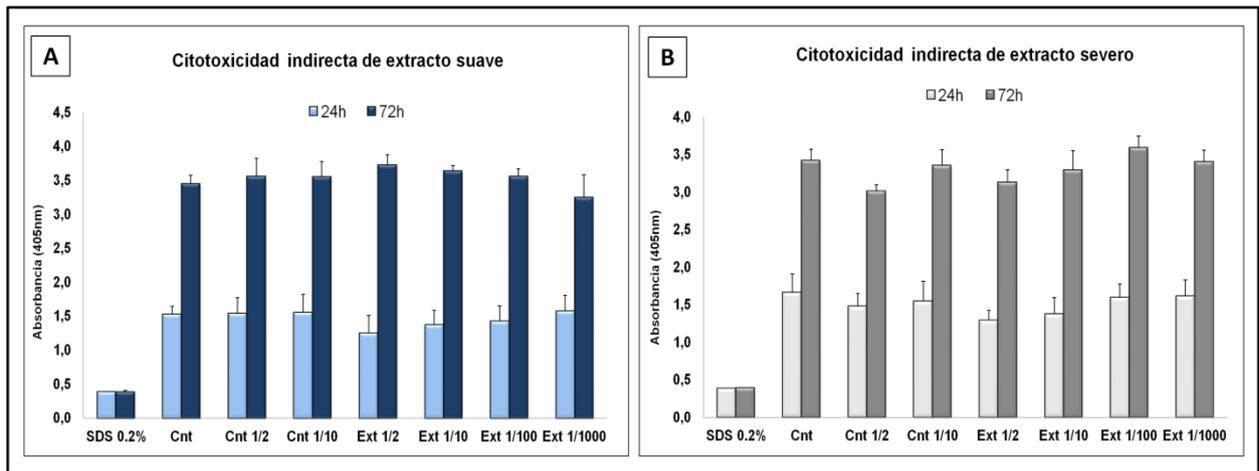


Figura 54. Citotoxicidad indirecta de extractos de discos KeraOs (KOD) sobre células HDF. (A) Extractos suaves, (B) extractos severos. Los datos fueron obtenidos mediante el método WST-1. Cnt= control negativo de toxicidad Ext= extracto SDS= dodecilsulfato sódico (control positivo de citotoxicidad). No existen diferencias significativas entre el control y la aplicación de extractos en las diferentes concentraciones ($P \geq 0.05$).

E. Recubrimientos con proteínas de matriz extracelular: adhesión, proliferación y morfología celular.

Para culminar el estudio de estandarización y evaluación de la biocompatibilidad de los discos KOD, se realizó el recubrimiento de la superficie de los discos con colágeno, fibronectina, albúmina y plasma (ver Tabla 19) tal como se describe en la sección 3.5.2.1. La idea fundamental del recubrimiento es la de mejorar la adhesión de las células al biomaterial. Se evaluó la adhesión, proliferación y morfología celular empleando como control las células crecidas sobre discos KOD sin recubrimiento.

El porcentaje de adhesión de células HDF (ver Figura 55) incrementó un $10 \% \pm 2.5 \%$ sobre discos KOD recubiertos con fibronectina (KOD FN), mientras que el resto de recubrimientos no indujeron cambios significativos respecto al control. La evaluación de la proliferación celular con AB a días 3, 5 y 7 (ver Figura 56) muestra un incremento del número de células a lo largo del tiempo de estudio. Particularmente a día 7 el número de células es superior en los discos recubiertos con FN, P50% y P100%; mientras que los recubiertos con COL y HSA no muestran diferencias significativas respecto al control. Adicionalmente es importante destacar que únicamente la FN produce un incremento de la proliferación respecto al control en todas las fases temporales del estudio. Las imágenes obtenidas mediante microscopía estereoscópica (ver Figura 57) y electrónica de barrido (ver Figura 58) tras 7 días de cultivo confirman los datos de proliferación. El mayor número de células es visualizado en los discos recubiertos con FN donde una gran red de células y ECM cubren casi por completo la superficie del disco. Adicionalmente es importante destacar que en todas las muestras (KOD con y sin recubrimientos) las células están completamente adheridas y extendidas sobre material tanto en la zona de poros como en las crestas. En imágenes a altos aumentos por microscopía electrónica (ver Figura 58 columna C) se

aprecia en detalle las células adheridas al material con largas extensiones citoplasmáticas tipo filopodios.

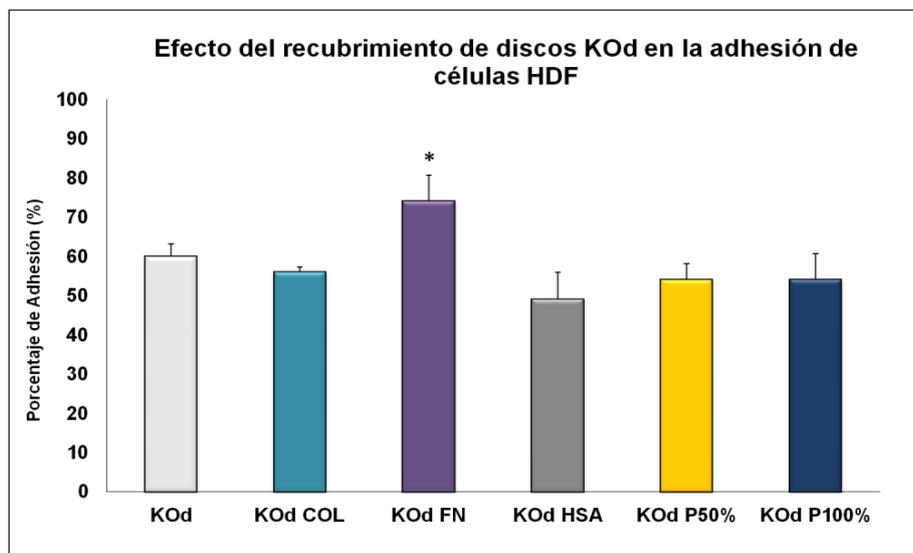


Figura 55. Efecto del recubrimiento de discos KeraOs (KOD) con colágeno (KOD COL), fibronectina (KOD FN), albúmina (KOD HSA) y plasma (KOD P50 % y KOD 100 %) sobre el porcentaje de adhesión de células HDF. La FN induce un incremento significativo del porcentaje de células que se adhieren al disco (* $P \leq 0.05$). Por el contrario los otros recubrimientos no muestran diferencias significativas respecto al disco sin recubrimiento (KOD). Los datos se obtuvieron mediante la técnica AB.

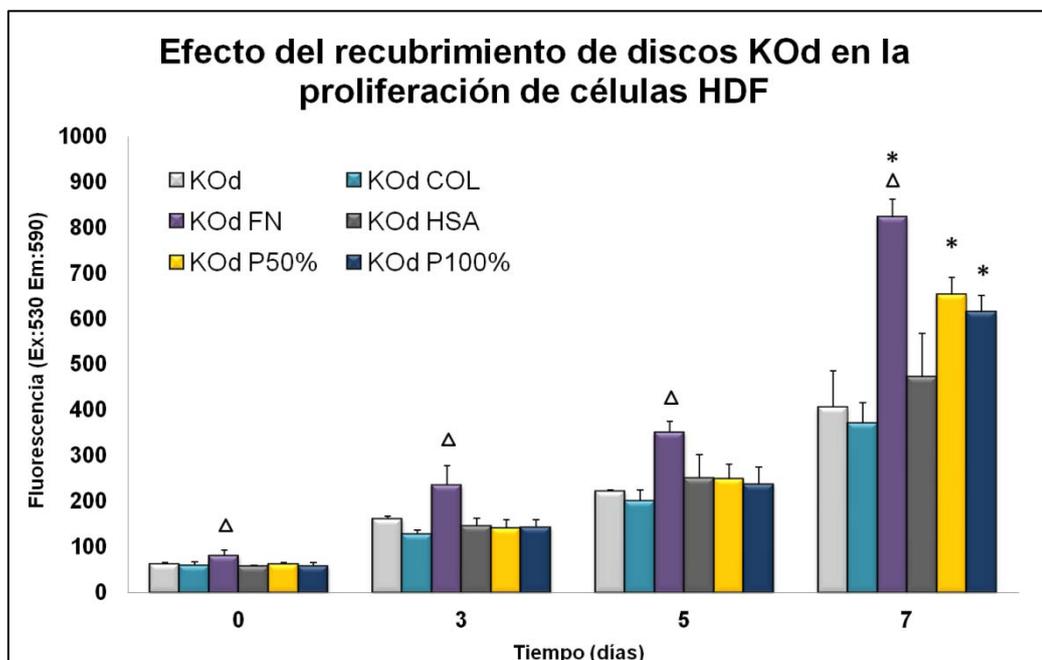


Figura 56. Efecto del recubrimiento de discos KeraOs (KOD) con colágeno (KOD COL), fibronectina (KOD FN), albúmina (KOD HSA) y plasma (KOD P50% y KOD 100%) sobre la proliferación células HDF. Todos los recubrimientos con excepción del COL y el HSA inducen un incremento significativo del número de células tras 7 días respecto a los discos sin recubrimiento (* $P \leq 0.05$). La FN es el único recubrimiento que induce un incremento significativo de la proliferación en todas las fases del estudio respecto disco sin recubrimiento ($\Delta P \leq 0.05$).

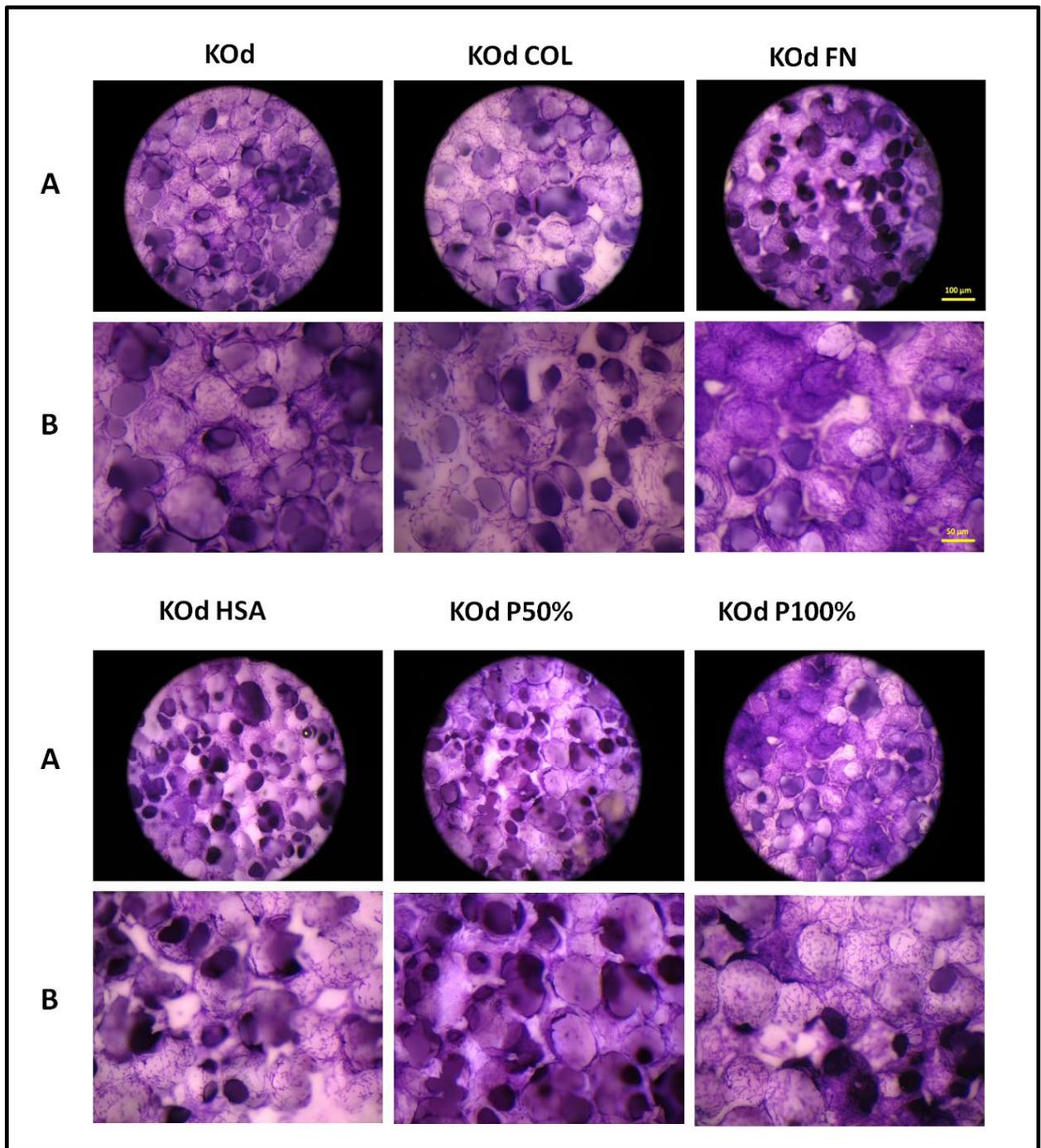


Figura 57. Imágenes de microscopía estereoscópica de células HDF sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y recubiertos con colágeno (KOd COL), fibronectina (KOd FN), albúmina (KOd HSA) y plasma (KOd P50% y KOd 100%) tras 7 días de cultivo. Tinción Azul de toluidina. Panel A: Barra 100µm Panel B: Barra 50µm

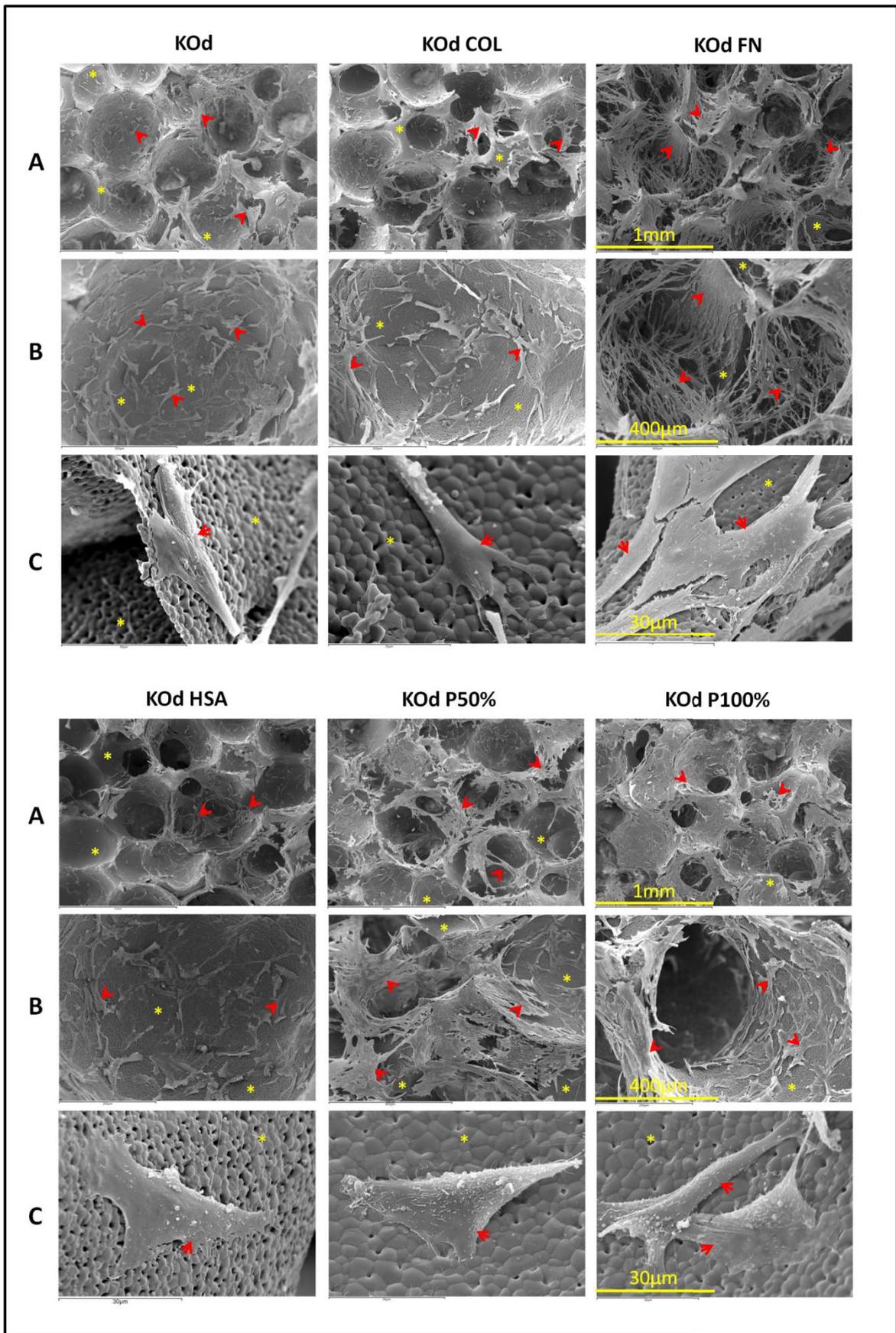


Figura 58. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células HDF sobre discos KeraOs sin recubrimiento (Kod) y recubiertos con colágeno (Kod COL), fibronectina (Kod FN), albúmina (Kod HSA) y plasma (Kod P50% y Kod 100%) tras 7 días de cultivo. Células (flechas), biomaterial KOD (asteriscos). Barras: A) 1mm B) 400 µm c) 30µm

Los resultados obtenidos indican que la estandarización de parámetros metodológicos tales como volumen de acondicionamiento, densidad celular y volumen de siembra han sido claves para: a) cuantificar y diferenciar entre el número de células adheridas y no adheridas al disco b) favorecer una distribución homogénea de las células durante el proceso de siembra c) suprimir el fenómeno de muerte celular en el cultivo a tiempos finales, debido a un exceso en el número de células adheridas inicialmente al disco.

Por otra parte los datos evidencian que los discos KOd son biocompatibles según la norma ISO 10993-5. Las células HDF son capaces de adherirse y proliferar sobre el material. Además los extractos suaves y severos no inducen citotoxicidad. El recubrimiento de la superficie del disco con FN induce un incremento significativo del porcentaje de adhesión y la proliferación celular. Su efecto es superior que el del resto de los recubrimientos probados, por lo que fue seleccionado para la realización de posteriores estudios.

4.4.2 Estudio comparativo de la biocompatibilidad de los biomateriales granulados KeraOs® (KO), Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC) y Cerasorb® (CS).

Para realizar el estudio comparativo de la biocompatibilidad de los materiales en formato de granulado (BO, BC, CS y KO), se extrapolaron los datos estandarizados en discos KOd. No fue necesario realizar ajustes adicionales en la densidad celular y proporción de volúmenes de acondicionamiento y siembra. En este sentido la siembra de granulados se llevó a cabo tal como se describe en la sección 3.5.2.2.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 59. Tras 3 horas de adhesión se separaban las células adheridas de las no adheridas a los granulados (ver Figura 31) y se cuantificaba la viabilidad celular mediante el método AB (ver sección 3.7). Los porcentajes de adhesión calculados indican que no existen diferencias significativas entre los granulados BC, CS y KO (ver Figura 59 cuadro) en los cuales alrededor de un 56 % de las células se adhieren al material. Por el contrario la adhesión celular es significativamente inferior sobre el granulado BO (41 % \pm 1,6 %). Las células adheridas proliferan sobre los cuatro tipos de granulado durante el tiempo de estudio. Sin embargo, sobre BO el crecimiento es significativamente más lento. A tiempo final el número de células sobre BC, CS y KO duplica al número de células cuantificadas sobre BO. Estos datos fueron ratificados mediante microscopía electrónica de barrido donde se apreció una cantidad importante de células adheridas a la superficie de los granulados BC, CS y KO con morfología tipo fibroblástica similar a lo observado en los discos KOd. Por el contrario sobre BO se apreciaron pocas células y su morfología era más redondeada (ver Figura 60).

Los datos obtenidos evidencian que las células HDF con capaces de adherirse y proliferar sobre los granulados BO, BC, CS y KO, por lo tanto son biocompatibles.

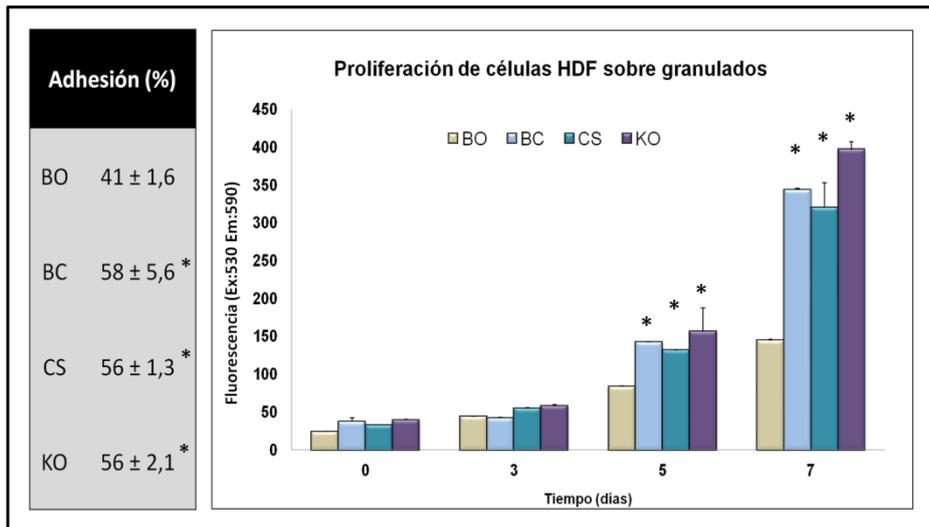


Figura 59. Porcentaje de adhesión y proliferación de células HDF sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO). En la tabla se indican los porcentajes de adhesión celular. El gráfico representa la proliferación de las células tras 0, 3, 5 y 7 días. Tanto la adhesión como la proliferación son similares para los granulados BC, CS y KO no encontrándose diferencias significativas entre sí ($P \geq 0.05$). La adhesión y proliferación tras 5 y 7 días de cultivo, son significativamente superiores sobre estos tres materiales respecto a BO ($* P \leq 0.05$).

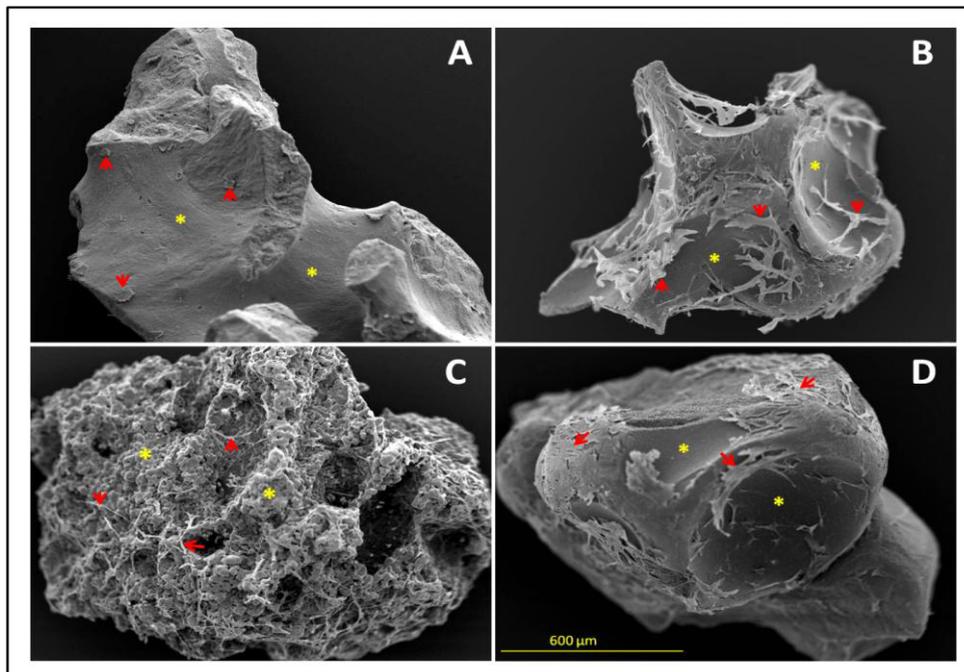


Figura 60. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células HDF sobre granulados tras 21 días de cultivo. (A) Bio-Oss® (BO), (B) Bone Ceramic® (BC), (C) Cerasorb® (CS), (D) KeraOs® (KO). Un número importante de células (flecha) con morfología tipo fibroblasto se aprecia en los materiales (asterisco) CS, BC y KO. Por el contrario sobre BO se aprecian pocas células y su morfología es redondeada. Barra 600 µm.

4.5 Respuesta de células hADSCs frente a biomateriales

Con la finalidad de estudiar la respuesta de células madre de origen mesenquimal adulto frente a biomateriales de fosfatos de calcio diseñados para mejorar la regeneración ósea, se evaluó la respuesta celular en términos de adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica en las células hADSCs cultivadas sobre discos KeraOs® sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN). Posteriormente se estudió comparativamente la respuesta celular sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO). Finalmente se realizó el recubrimiento del material KO con las proteínas fibronectina (FN), colágeno (COL) y la combinación (FN/COL) (ver Tabla 20) y se evaluó su efecto en la respuesta celular. Los resultados obtenidos se describen a continuación:

4.5.1 Discos KeraOs con y sin recubrimiento de Fibronectina

La siembra y cultivo celular de las células hADSCs sobre discos KOD se realizó tal como se describe en la sección 3.5.2.1 empleando los medios de cultivo PM y OM. Tomando en cuenta que el recubrimiento con FN incrementó significativamente la biocompatibilidad de los discos empleando la línea celular HDF (ver sección 4.4.1 E) y la importancia que tiene esta proteína de ECM en la adhesión celular, en este apartado se ha evaluado su efecto en la respuesta de células ADSCs cultivados sobre el mencionado material.

La adhesión y proliferación celular se han evaluado mediante el método AB (ver sección 3.7). Los resultados indican que un 58 % de las células hADSCs se adhieren a los discos KOD (ver Tabla 25). Este porcentaje aumenta al 63 % cuando los discos están recubiertos con fibronectina (KOD FN), es decir el recubrimiento induce un incremento significativo de $7\% \pm 2\%$ en la adhesión de las células al material.

Adhesión (%)	
KOd	$56 \pm 1,5$
KOd FN	$63 \pm 2,4$ *

Tabla 25. Porcentaje de adhesión de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOD) y con recubrimiento de fibronectina (KOD FN). El recubrimiento con FN incrementa significativamente el porcentaje de adhesión celular (* $P \leq 0.05$).

El número de células adheridas a los discos KOd y KOd FN incrementó significativamente durante el tiempo de estudio con ambos medios de cultivo (PM y OM), sin embargo la proliferación es menor con el medio de cultivo OM a días 14 y 21 (ver Figura 61). El recubrimiento con FN no indujo cambios significativos en la proliferación de las células hADSCs, mientras que en los fibroblastos si aumento este parámetro tras 7 días de cultivo (ver Figura 53). Éste comportamiento también fue encontrado en las células crecidas sobre plástico. Los resultados obtenidos mediante el método AB han sido confirmados por microscopía electrónica de barrido (Figura 62) donde se aprecia claramente un incremento de la población de células en la superficie de los discos KOd y KOd FN con medios PM y OM a los días 7, 14 y 21. La morfología de las células es tipo fibroblástica independientemente de los medios utilizados y a tiempo final forman una gran red que cubre por completo la superficie de los materiales. Dicha red celular es más homogénea en los discos recubiertos con FN.

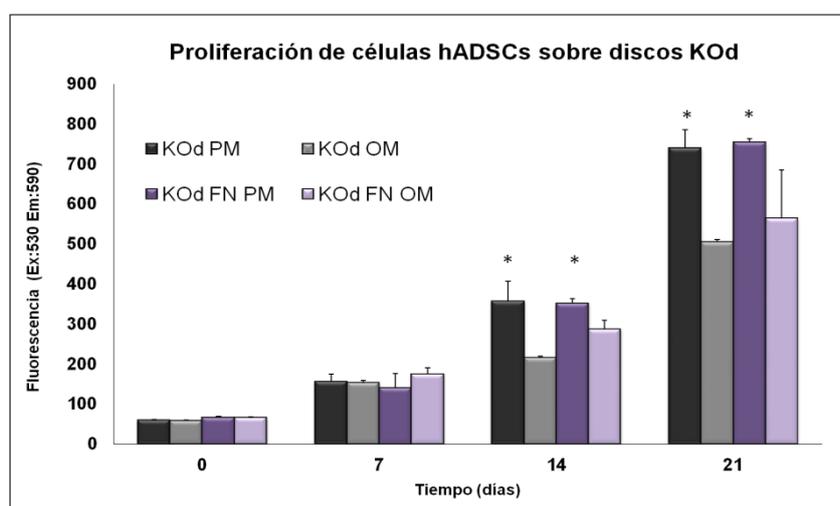


Figura 61. Proliferación de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN) con medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 0, 7, 14 y 21 días. La proliferación celular sobre discos KO y KOd FN a días 14 y 21 es significativamente superior con el medio PM respecto al medio OM (* $P \leq 0.05$). El recubrimiento con FN no induce cambios significativos en la proliferación ($P \geq 0.05$).

Adicionalmente los cultivos se observaron por microscopía confocal con la finalidad de verificar la distribución de las células en la superficie del material y obtener imágenes tridimensionales de calidad. Los filamentos de actina de las células se tiñeron con Falloidina-TRIC y los núcleos con bisbenzimidá tal como se indicó en la sección 3.10.1. La Figura 63 muestra tres imágenes representativas obtenidas a partir de la muestra hADSCs-KOd PM tras 21 días de cultivo. Las células se distribuyen homogéneamente en la superficie del disco (Figura 63 A), ocupando tanto las crestas como zonas porosas. El grosor del biomaterial impide obtener la topografía completa del mismo empleando objetivos de bajo aumento, este hecho se observa claramente en la Figura 63 B donde la topografía del material es obtenida por reflexión. Las zonas negras corresponden a los poros de mayor profundidad y en algunos casos se

observan las células formando estructuras similares a puentes que atraviesan de un extremo al otro. Una imagen a mayor aumento de un macroporo (ver Figura 63 C) evidencia que en estas zonas del material también hay células adheridas.

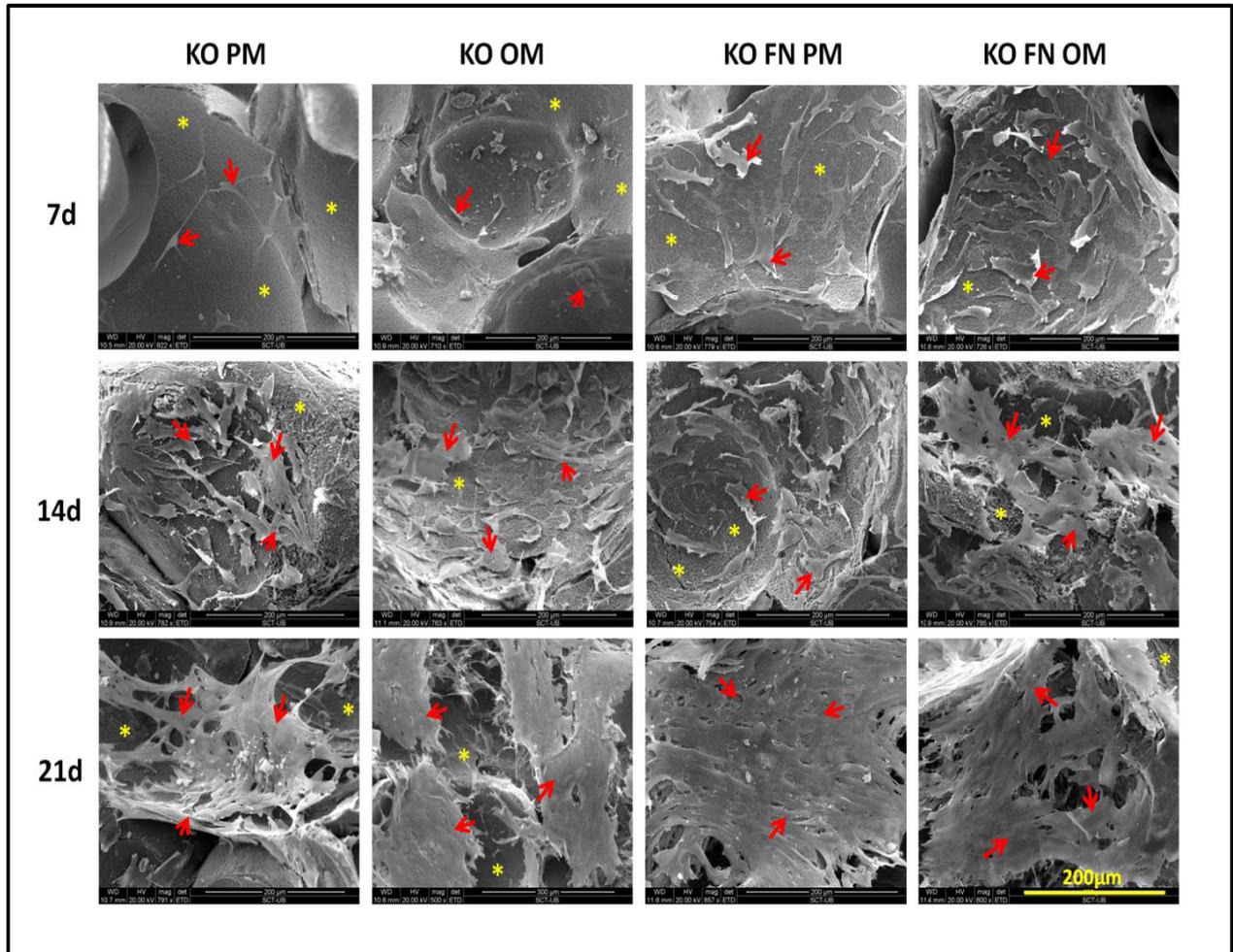


Figura 62. Imágenes de microscopía electrónica de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOD) y con recubrimiento de fibronectina (KOD FN) en medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 7, 14 y 21 días. En todos los casos se aprecia un incremento significativo del número de células en el tiempo. La morfología de las células es alargada (tipo fibroblástica) y a tiempo final se aprecia una gran red celular que cubre la superficie del material. En el material recubierto con FN la red celular es más homogénea respecto a la encontrada en los discos sin recubrimiento. Células (flechas), material (asterisco). Barra= 200µm

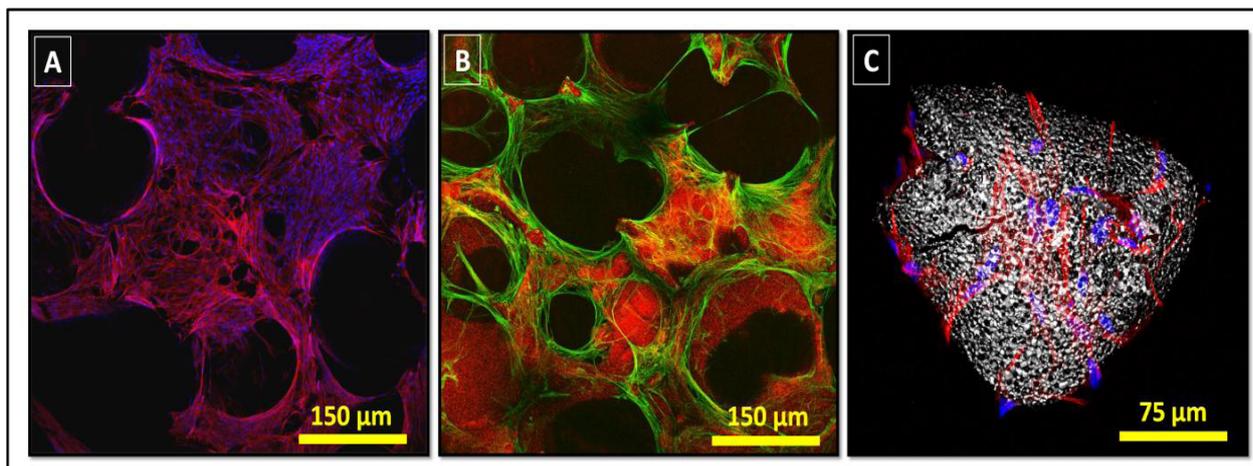


Figura 63. Imágenes de microscopía confocal de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) tras 21 días de cultivo. (A) tinción de los filamentos de actina con Falloidina-TRIC (rojo) y los núcleos celulares con bisbenzimidida (azul). Las zonas oscuras corresponden a los macroporos del disco. **(B)** Células marcadas con Falloidina-TRITC (verde) y topografía de la superficie del biomaterial (rojo). **(C)** Detalle de células marcadas con Falloidina-TRIC (rojo) y bisbenzimidida (azul) adheridas a un macroporo del disco (gris). Barras 150 µm (A y B) y 25 µm (C).

Con el fin de elucidar la capacidad del disco KOd de inducir la diferenciación osteogénica de las células hADSCs, se cuantificó la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) y la expresión de los genes fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OC) y osteonectina (ON) mediante PCR en tiempo real tal como se describe en las secciones 3.11 y 3.14 respectivamente.

Los datos obtenidos tras la cuantificación de la actividad de la enzima ALP (ver Figura 64) indican que los valores incrementan en función del tiempo estudio. Tanto el medio OM como el recubrimiento de discos FN inducen un incremento significativo de los valores de actividad. Además en células hADSCs cultivadas sobre los discos KOd y KOd FN con el medio de cultivo PM se registran valores elevados de ALP, es decir que el biomaterial induce un incremento en la actividad de la enzima en ausencia de factores inductores en el medio de cultivo. En este sentido, se calculó la tasa de variación de los valores de actividad en células crecidas sobre discos KOd y KOd FM con ambos medios de cultivo respecto los valores en células crecidas en plástico empleando las mismas condiciones de medios de cultivo y recubrimiento (ver Figura 65). En todos los casos existe un incremento de la actividad de las células crecidas sobre los biomateriales respecto a las crecidas sobre plástico. Sin embargo dicho aumento es mayor en las células crecidas sobre KO y KOd FN con el medio PM (12 y 9 veces más respectivamente). Este hecho se debe a que las células crecidas sobre plástico en ausencia de los factores inductores del medio de cultivo no se diferencian, tal como se demostró en resultados previos obtenidos en el presente estudio (ver Figura 50 y Tabla 24).

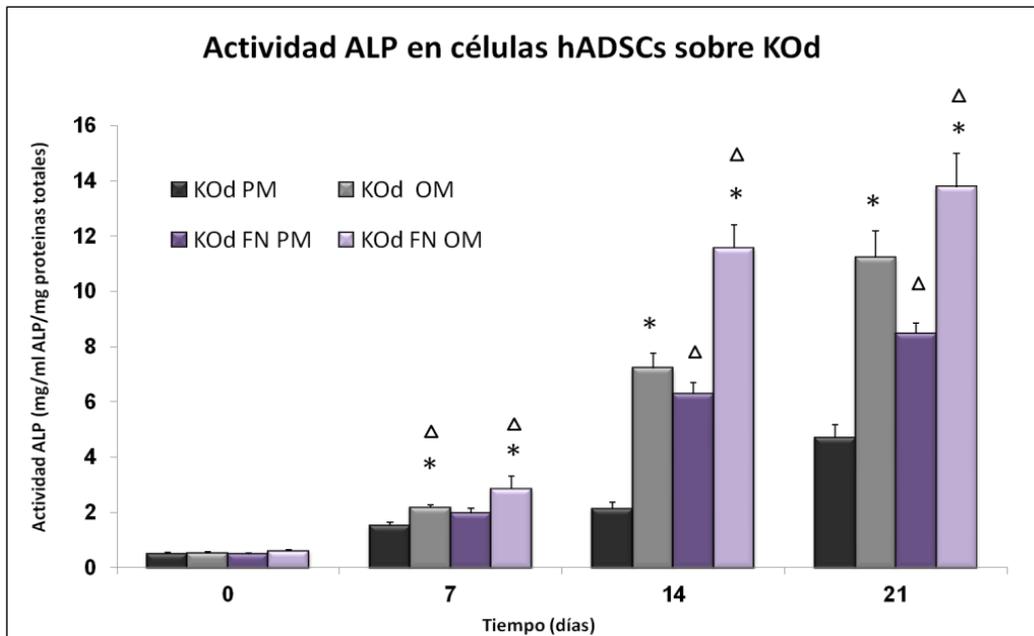


Figura 64. Actividad fosfatasa Alcalina (ALP) de células hADSCs sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN) con medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 0, 7, 14 y 21 días. Los valores de actividad incrementan en función del tiempo y son significativamente superiores cuando se utiliza el medio OM respecto al medio PM (* $P \leq 0.05$). Sin embargo, con medio PM también se registran valores de actividad. El recubrimiento de los discos con FN incrementa significativamente los valores de actividad de la enzima ALP en ambos medios de cultivo respecto al disco sin recubrir ($\Delta p \leq 0.05$)

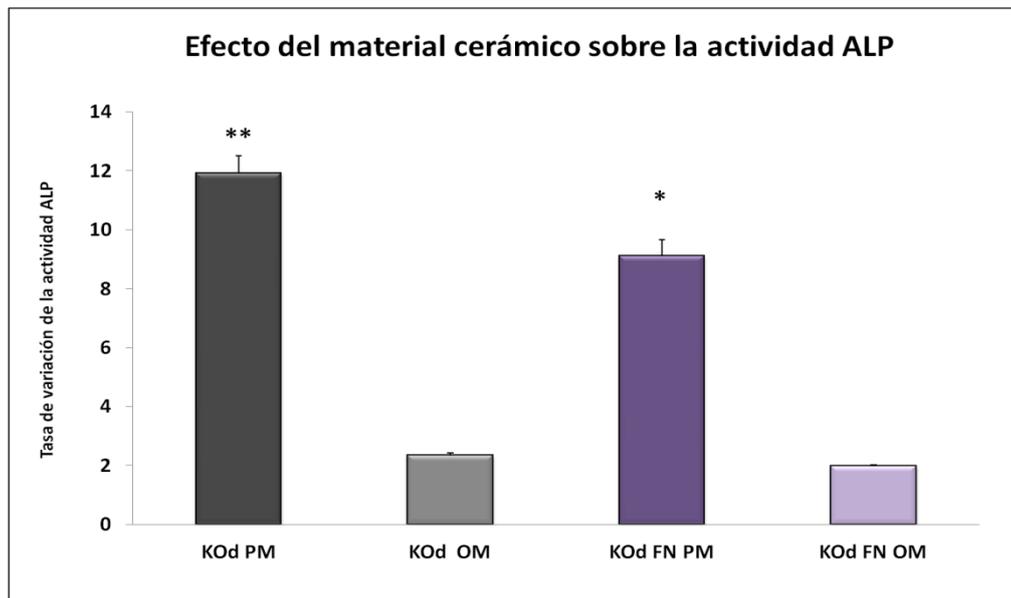


Figura 65. Tasa de variación de la actividad ALP en células hADSCs cultivadas sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOd FN) en medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM), respecto a células cultivadas en plástico con y sin recubrimiento de FN (controles). El biomaterial induce un incremento significativo ($P \leq 0.05$) de la actividad ALP independientemente de la presencia o ausencia de factores inductores en el medio de cultivo (medios OM y PM respectivamente). Un análisis comparativo de todos los tratamientos muestra que la máxima tasa de incremento de la actividad se encuentra en la muestra KOd PM (* $P \leq 0.05$), seguido por KOd FN PM (* $P \leq 0.05$).

Finalmente la evaluación de la expresión de genes involucrados en el proceso de diferenciación osteogénica indicó que los discos KOd y KOd FN inducen un incremento significativo en la expresión de los genes ALP, ON y OC respecto a células hADSCs cultivadas en plástico tras 7, 14 y 21 días (ver Figura 66). Los máximos valores de expresión para los tres genes ALP y OC se cuantificaron en las células crecidas sobre KOd FN en medio OM a día 21, mientras que la máxima expresión de ON se encontró bajo la misma condición pero a día 14. Es importante destacar que el recubrimiento con FN potencia la respuesta llegando inclusive a inducir valores de expresión similares (o inclusive mayores) entre las células cultivadas en discos KOd OM y KOd FN PM.

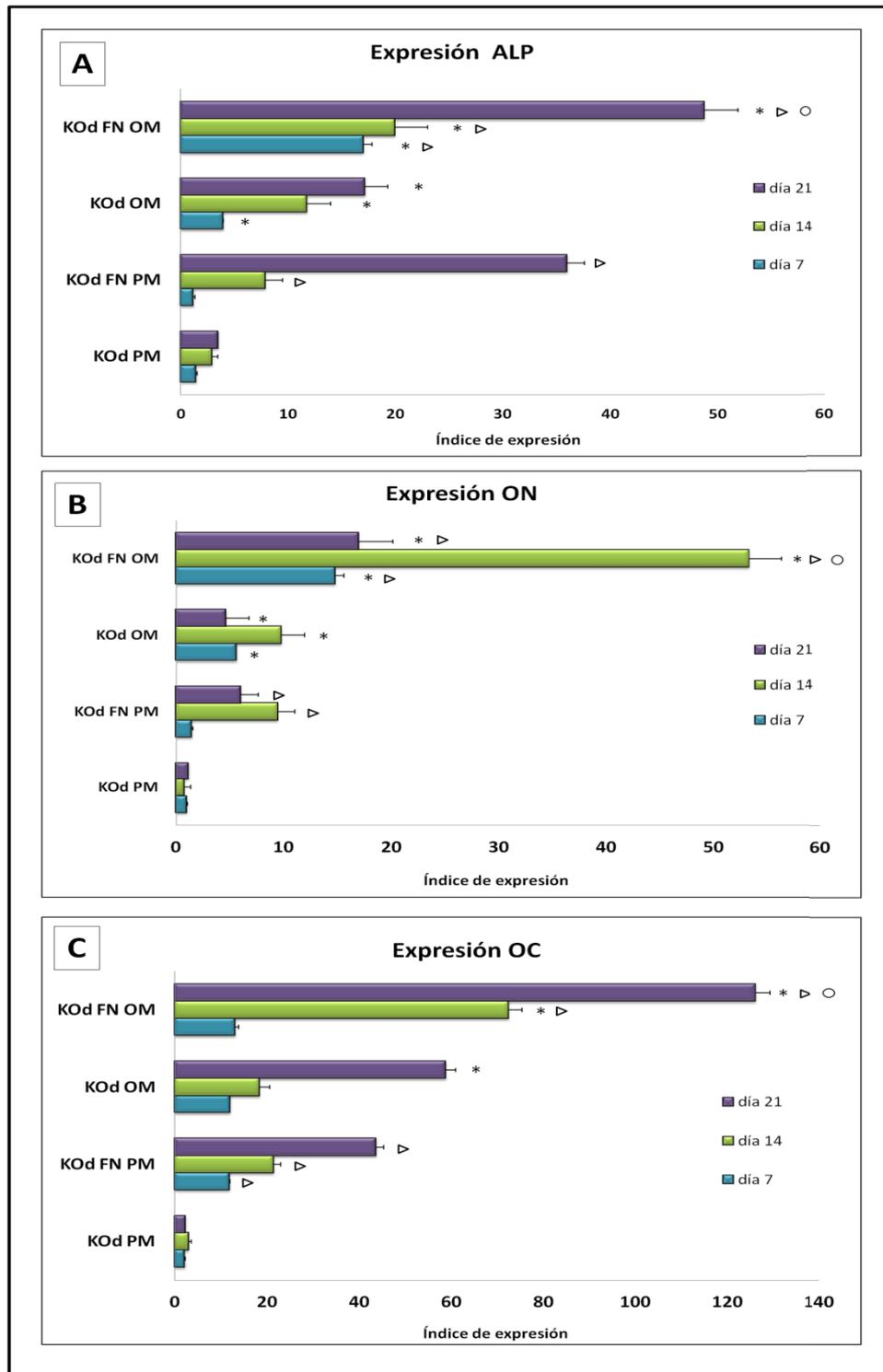


Figura 66. Expresión relativa de los genes fosfatasa alcalina (A), osteonectina (B) y osteocalcina (C) en células hADSCs cultivadas con medios proliferativo (PM) y osteogénico (OM) sobre discos KeraOs sin recubrimiento (KOd) y con recubrimiento de fibronectina (KOD FN). Los datos se obtuvieron mediante PCR en tiempo real y como control se utilizaron las células cultivadas en plástico. Los genes ALP, ON y OC se sobreexpresan en las células hADSCs cultivadas sobre los discos KO respecto a las células cultivadas sobre plástico incluso en ausencia de factores inductores en el medio de cultivo (medio PM). Sin embargo, cuando los factores están presentes, es decir cuando se cultivan las células con el medio OM, la expresión es significativamente superior (* $P \leq 0.05$). El recubrimiento con FN potencia las expresión de los tres genes independientemente del medio de cultivo utilizado respecto al disco sin recubrimiento ($\blacktriangleright P \leq 0.05$). Un análisis comparativo de todos los tratamiento indica que los máximos valores de expresión para los genes ALP y OC se encuentran en las células cultivadas sobre discos KO con recubrimiento de FN y medio OM (KOD FN OM) tras 21 días. El máximo valor del gen ON se encuentra en el mismo tratamiento (Kod FN OM) pero a día 14 ($\circ P \leq 0.05$).

4.5.2 Granulados

Para evaluar y comparar la respuesta de las células hADSCs cultivadas sobre granulados BO, BC, CS y KO (ver Tabla 17), se realizó la siembra y cultivo celular tal como se describe en la sección 3.5.2.2 empleando los medios de cultivo PM y OM.

La adhesión y proliferación de las células hADSCs sobre los cuatro tipos de granulado se han evaluado mediante el método AB (ver sección 3.7) a días 0, 7, 14 y 21. Los resultados indican (ver Tabla 26) que los mayores porcentajes de adhesión celular se cuantifican sobre los granulados BC y KO (67% y 66% respectivamente) pero no existen diferencias significativas entre sí. Además sobre el granulado CS la adhesión es un 8% inferior respecto a BC y KO ($P \leq 0.05$), mientras que sobre BO la adhesión es menor que en los otros materiales. La población de células adheridas aumenta significativamente en el tiempo sobre los granulados BC, CS y KO con ambos medios de cultivo (ver Figura 67). Sin embargo la proliferación es superior con el medio PM a días 14 y 21 respecto al medio OM. En contraste sobre el material BO proliferan pocas células durante el tiempo de estudio en comparación con BC, CS y KO.

El estudio morfológico de las células hADSCs cultivadas sobre los granulados mediante microscopía electrónica de barrido (ver Figura 68) muestra una gran red de células formando una capa en la superficie de los granulados BC y KO. Particularmente las células crecidas sobre KO con medio de cultivo OM presentan una morfología similar a la de osteoblastos; mientras que sobre KO con medio PM y en los granulados CS y BC la morfología se mantiene alargada o tipo fibroblástica. Por el contrario sobre BO se apreciaron pocas células y su morfología era más redondeada. Acorde con los datos de proliferación obtenidos, se observa un menor número de células sobre el granulado CS respecto a BC y KO.

Adhesión (%)	
BO	45 ± 1,35
BC	67 ± 2,68 * Δ
CS	62 ± 1,26 *
KO	66 ± 2,07 * Δ

Tabla 26. Porcentaje de adhesión de células hADSCs sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO). Los porcentajes de adhesión son significativamente superiores en los granulados BC, CS y KO, respecto a BO (* $P \leq 0.05$). Comparando todos los tratamientos entre sí, los máximos porcentajes de adhesión se encontraron sobre BC y KO (Δ $P \leq 0.05$), aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambos.

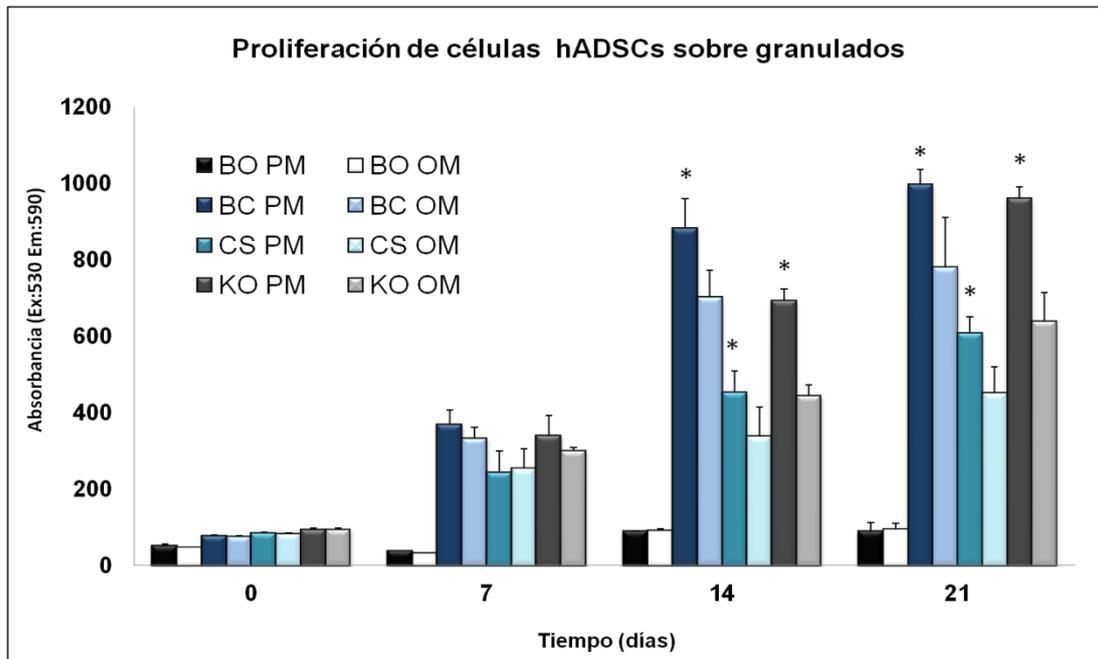


Figura 67. Proliferación de células hADSCs sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) con medio de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM). El número de células se incrementa durante el tiempo de estudio sobre los granulados BC, CS y KO, aunque es inferior sobre CS independientemente del medio de cultivo utilizado. Tras 14 y 21 el número de células es superior con el medio PM respecto al medio OM (* P ≤ 0.05). En comparación con el resto de los materiales sobre BO las células proliferan poco.

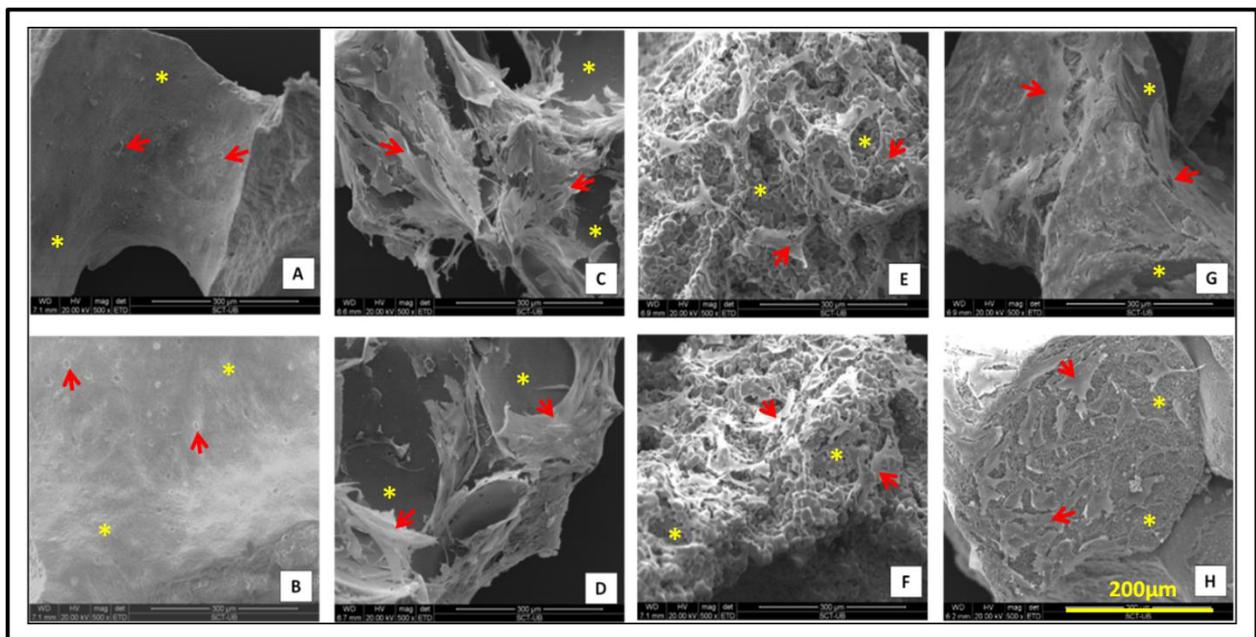


Figura 68. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células hADSCs sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) con medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días. (A) BO PM (B) BO OM (C) BC PM (D) BC OM (E) CS PM (F) CS OM (G) KO PM (H) KO OM. Una gran cantidad de células con una morfología tipo fibroblástica están adheridas a los granulados BC, CS y KO; sin embargo sobre KO con medio OM la morfología de las células es similar a la de los osteoblastos. Por el contrario sobre BO hay pocas células y presentan una forma redondeada. Células (flecha), Material (asterisco). Barra 200 μm.

Con el fin de elucidar la capacidad de los granulados de inducir la diferenciación osteogénica de las células hADSCs, se cuantificó la actividad de la enzima ALP y la expresión de los genes fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OC) y osteonectina (ON) mediante PCR en tiempo real tal como se describe en las secciones 3.11 y 3.14 respectivamente. Es importante destacar que las cantidades de proteína y RNA obtenidas a partir de las células cultivadas sobre BO no han sido suficientes para realizar los mencionados ensayos, por lo que se muestran únicamente los resultados sobre los granulados BC, CS y KO.

Los datos obtenidos indican que se detecta actividad de la enzima ALP en las células hADSCs crecidas sobre los granulados BC, CS y BO con medio PM y OM (ver Figura 69). A día 21 el medio OM induce un incremento en la actividad respecto al medio PM, sin embargo en general los valores son más bajos o no presentan diferencias significativas respecto a día 14. Asimismo es importante destacar que los valores máximos de actividad son alcanzados en las células crecidas sobre el granulado KO con medio OM.

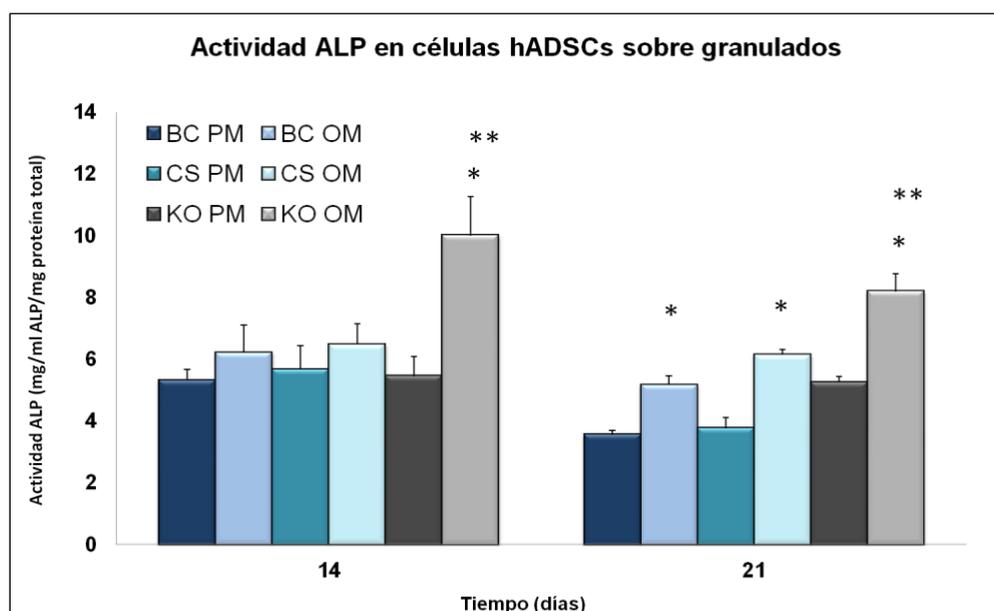


Figura 69. Actividad fosfatasa Alcalina (ALP) en células hADSCs cultivadas sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) tras 14 y 21 días con medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM). Los máximos valores de actividad ALP se registran sobre el granulado KO con medio OM (KO OM) tanto a día 14 como a día 21 (** $P \leq 0.05$). A día 21 la actividad ALP de las hADSCs crecidas sobre los tres tipos de granulados con medio OM es superior respecto a las cultivadas con medio PM (* $P \leq 0.05$).

El análisis de expresión de los genes ALP, ON y OC muestra que cada tipo de granulado induce un patrón de expresión genético particular en las células hADSCs (ver Figura 70). Los genes ALP y OC se sobreexpresan en las células crecidas sobre los tres tipos de materiales con medio PM y OM teniendo

los picos máximos de expresión a día 14. En contraste sobre CS la expresión de ALP es menor respecto a BC y KO, aunque incrementa significativamente a día 21. Asimismo este material induce una expresión muy baja de OC respecto a los otros dos materiales.

Por otra parte los tres tipos de granulados inducen la sobreexpresión de ON cuantificándose un incremento significativo de la expresión a día 21 respecto a día 14. Los máximos valores de expresión de éste gen son inducidos por el granulado KO con ambos medios de cultivo. Otro dato importante a destacar, es que el material KO induce una sobreexpresión de los genes ALP, OC y ON que siempre es igual o superior a la de los materiales CS y BC en ausencia de factores inductores en el medio de cultivo, es decir con el medio PM.

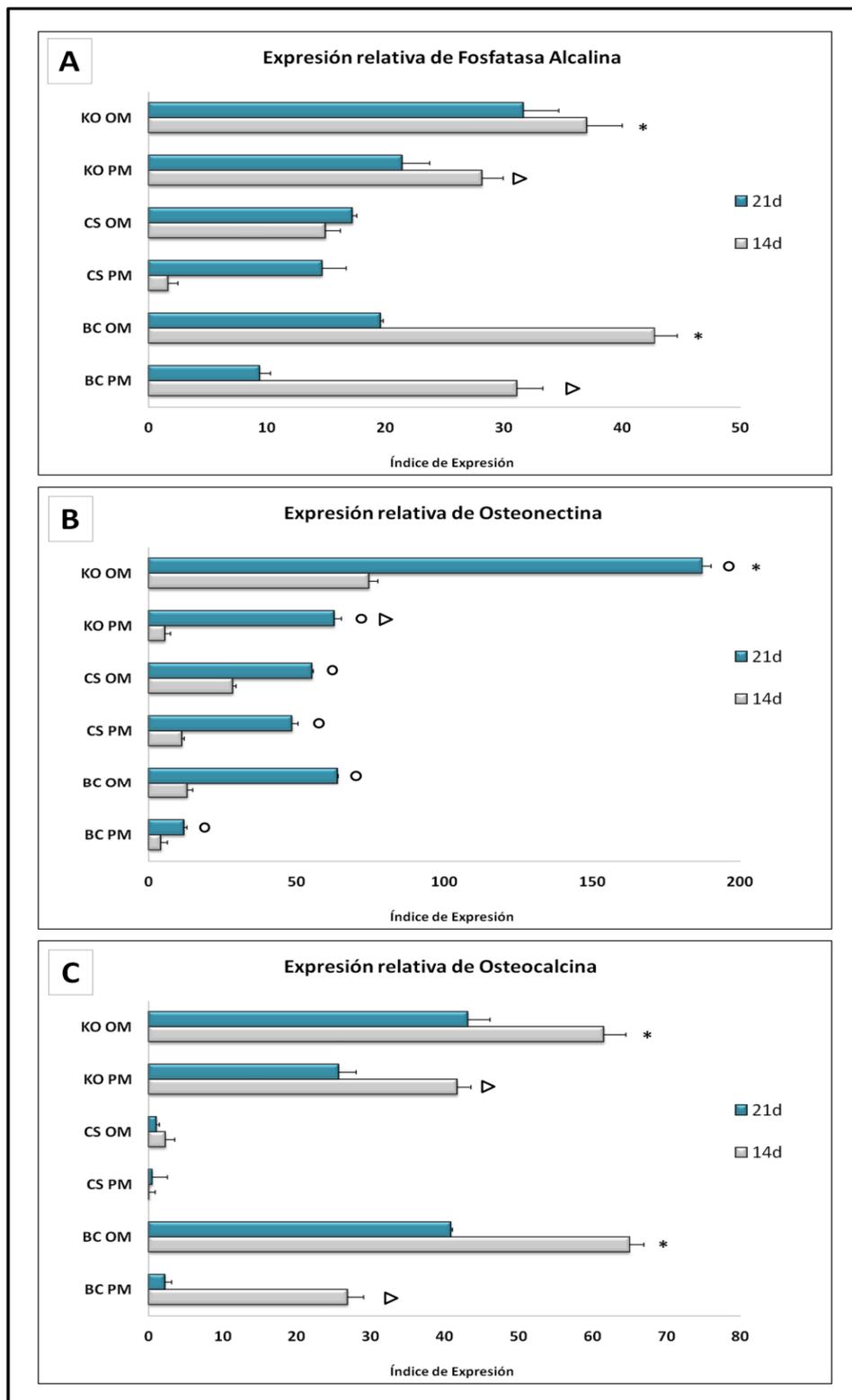


Figura 70. Expresión relativa de los genes fosfatasa alcalina (A), osteonectina (B) y osteocalcina (C) en células hADSCs cultivadas durante 21 días sobre granulados Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KO) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM). Los datos se obtuvieron mediante PCR en tiempo real. El patrón de expresión varía en función del material y medio de cultivo utilizado. Comparando todos los tratamientos entre sí, los máximos valores de expresión de los genes fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC), se encuentran en los granulados KO y BC con medio OM (KO OM y BC OM respectivamente) (* $P \leq 0.05$). Sin embargo, una expresión significativa (◻ $P \leq 0.05$) también se encuentra en ambos granulados con medio PM (KO PM y BC PM). Por otra parte, los tres tipos de material inducen la sobreexpresión del gen osteonectina (ON) siendo siempre mayor a día 21 respecto a día 14 (◯ $P \leq 0.05$). Comparando todos los tratamientos, el máximo valor de expresión de este marcador se encuentra en KO OM; aunque una expresión significativa también se encuentra en KO PM (◻ $P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos muestran que las células hADSCs son capaces de adherirse, proliferar y diferenciarse hacia linaje osteogénico sobre granulados BC, CS y KO. Por el contrario sobre BO tanto la adhesión como la proliferación celular es baja. Los datos de actividad de la enzima ALP y de expresión indican que los granulados BC, CS y KO inducen en mayor o menor grado la diferenciación de las hADSCs hacia linaje osteogénico incluso en ausencia de factores inductores en el medio de cultivo. Sin embargo la presencia de dichos factores en el medio potencia la respuesta.

Recubrimiento de Granulados KeraOs® con Fibronectina, colágeno y la mezcla Fibronectina/colágeno.

Por otra parte, se evaluó el efecto del recubrimiento con FN, COL y FN/COL sobre la adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica de las hADSCs sobre el granulado KO.

La adhesión y proliferación celular se ha evaluado mediante el método AB (ver sección 3.7). Los resultados indican que el recubrimiento de los granulados KO con FN y FN/COL incrementan la adhesión en un $7\% \pm 2\%$, mientras que el recubrimiento con COL no induce cambios significativos en este parámetro (ver Tabla 27). El número de células adheridas sobre los granulados recubiertos con FN, COL y FN/COL incrementó significativamente durante el tiempo de estudio con ambos medios de cultivo (PM y OM), sin presentar diferencias significativas respecto a los granulados sin recubrimiento.

Adhesión (%)	
KO	$66 \pm 2,1$
KO COL	$60 \pm 2,0$
KO FN	$73 \pm 2,3$ *
KO FN/COL	$72 \pm 2,5$ *

Tabla 27. Porcentaje de adhesión de células hADSCs sobre granulados KeraOs® sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL). El recubrimiento con FN y la combinación FN/COL incrementa significativamente el porcentaje de adhesión celular respecto a KO (* $P \leq 0.05$).

Las imágenes de microscopía estereoscópica de las células teñidas con azul de Toluidina y las imágenes microscopía electrónica de barrido tras 21 días de cultivo ratifican estos resultados de proliferación obtenidos mediante AB (ver Figura 71 y Figura 72). La aplicación de la tinción Rojo de Alizarina sobre las células cultivadas sobre los granulados con medios PM y OM presentan extensas zonas de

mineralización de la ECM. La máxima intensidad en la coloración se encuentra en los granulados recubiertos con FN y FN/COL con ambos medios de cultivo (KO FN PM, KO FN OM, KO FN/COL PM, KO FN/COL), mientras que la menos intensa de muestra en el granulado sin recubrimiento y con medio PM (KO PM).

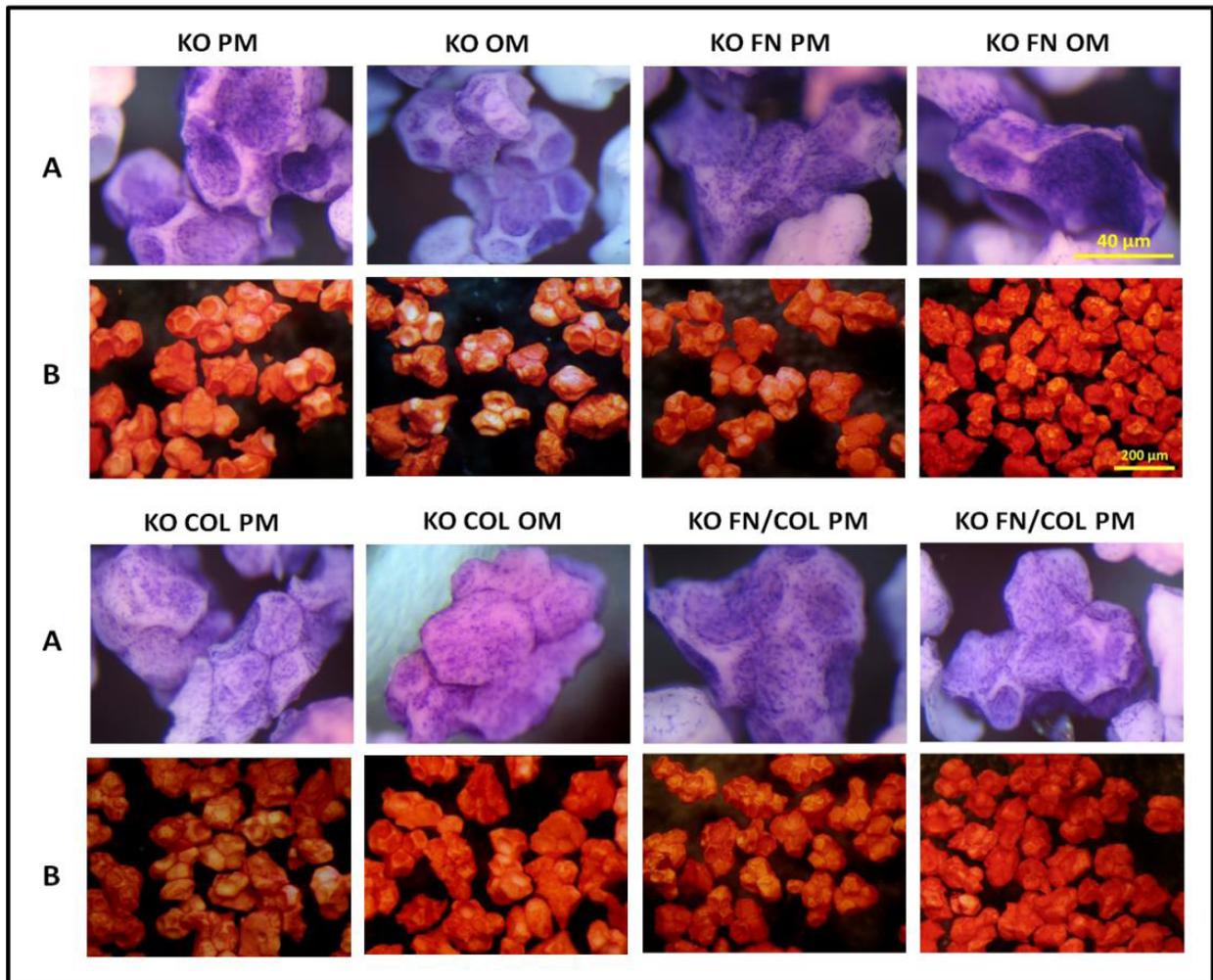


Figura 71. Imágenes de microscopía estereoscópica de células hADSCs sobre granulados KeraOs[®] sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. **(A) Tinción Azul de toluidina.** Se observan células adheridas a los granulados con o sin recubrimientos. Barra: 40μm. **(B) Tinción Rojo de Alizarina.** Las zonas de mineralización de la matriz (color rojo) son claramente detectables apreciándose la menor intensidad de coloración sobre KO PM y la mayor intensidad sobre KO FN y KO FN/COL con ambos medios de cultivo. Barra: 200μm.

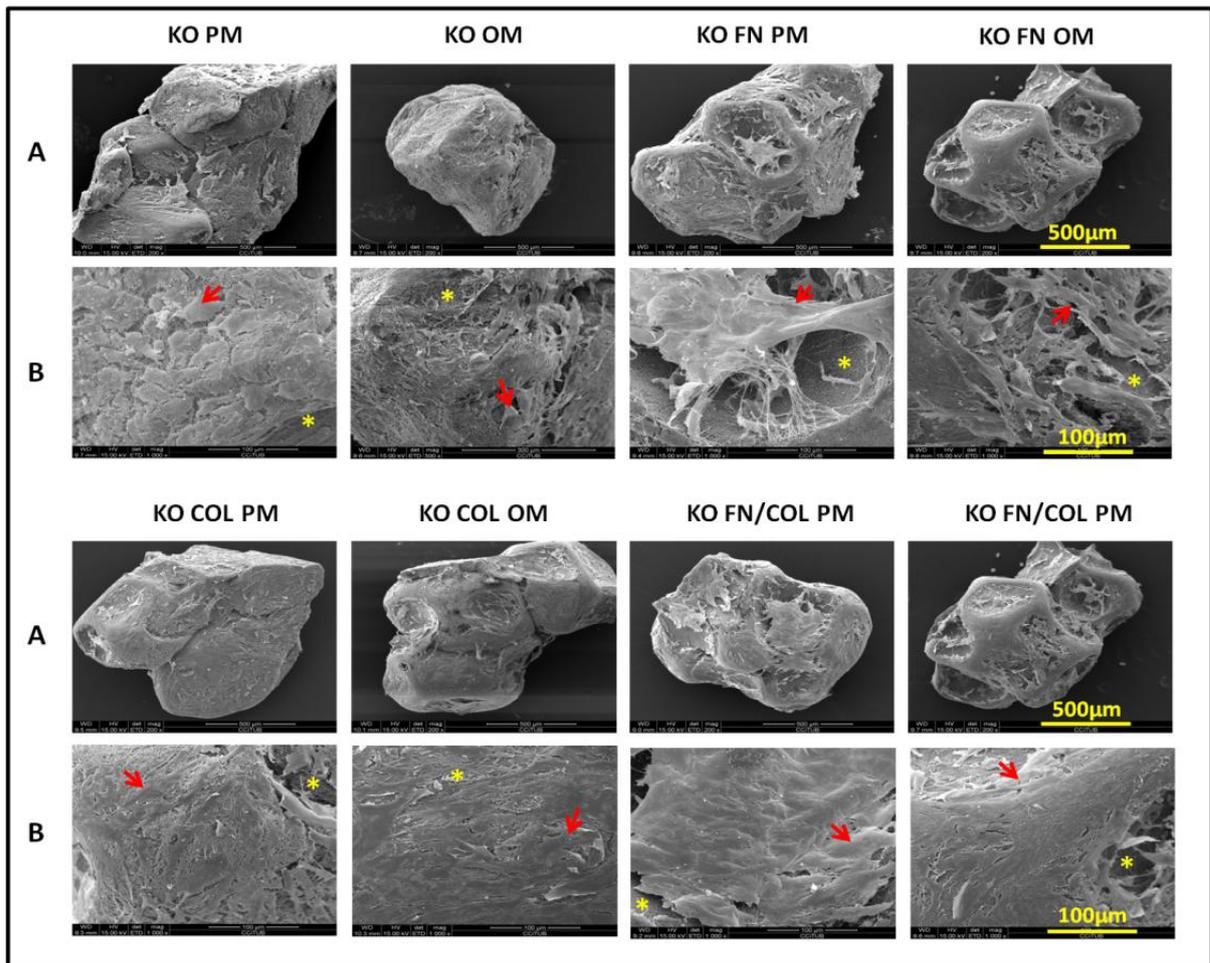


Figura 72. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células hADSCs sobre granulados KeraOs[®] sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. Células (flecha); Material (asterisco). A) Barra 300 µm A) Barra 100 µm.

Con el fin de elucidar la capacidad de los recubrimientos de inducir la diferenciación osteogénica de las células hADSCs, además de la tinción con rojo de Alizarina se cuantificó la actividad de la enzima ALP (ver sección 3.11) y se evaluó un perfil genético de expresión mediante qPCR-array (ver sección 3.15). Como control se utilizaron las células hADSCs cultivadas sobre el granulado KO con medio PM, de manera que todos los resultados obtenidos han sido expresados de forma relativa a este control.

Los datos obtenidos tras la cuantificación de la actividad de la enzima ALP (ver

Figura 73) indican que el recubrimiento de granulados KO con las proteínas FN, COL y FN/COL inducen un incremento en la actividad, aunque es superior sobre FN y FN/COL sin mostrar diferencias significativas entre sí. Las tasas de incremento son similares empleando ambos medios de cultivo en todos los recubrimientos.

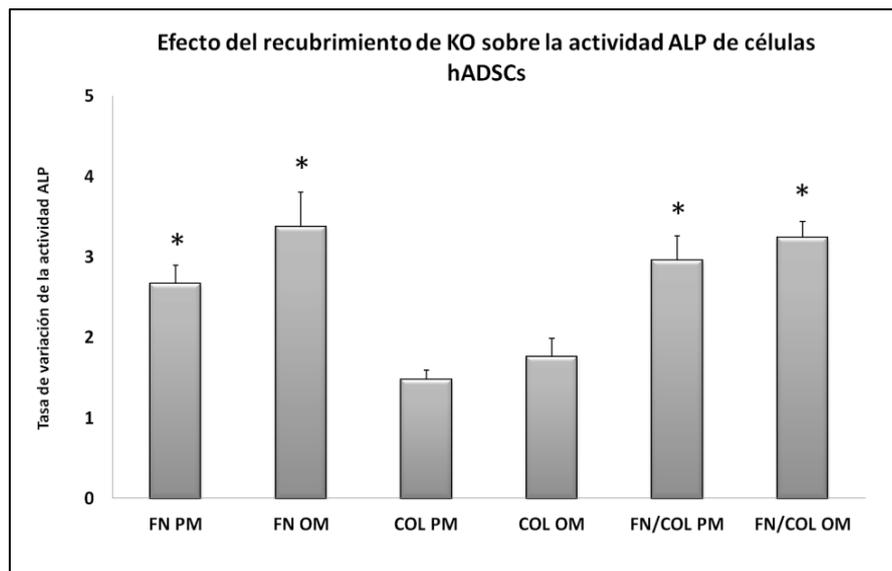


Figura 73. Tasa de variación de la actividad ALP en células hADSCs sobre granulados KeraOs[®] sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. Todos los recubrimientos inducen un incremento significativo de la actividad ALP respecto al disco sin recubrir ($P \leq 0.05$). Sin embargo, el efecto es mayor con FN y FN/COL independientemente del medio utilizado (* $P \leq 0.05$).

En la Figura 74 se muestra un gráfico que representa la magnitud de expresión de los 84 genes evaluados mediante qPCR-array tras 21 días de cultivo de las células hADSCs sobre granulados KO con y sin recubrimientos de FN, COL y FN/COL con medios de cultivo PM y OM. El color rojo representa sobreexpresión, el verde subexpresión y la intensidad indica la magnitud del valor. En general el medio OM induce la expresión de un mayor número de genes y con mayor intensidad que el medio PM independientemente del tipo de recubrimiento. El patrón de expresión genético de las células que han sido cultivadas sobre KO con recubrimientos de FN y FN/COL en medio PM es muy similar al patrón de expresión del material sin recubrimiento en medio OM. Por el contrario, en el patrón de expresión de las células que han sido cultivadas sobre KO con recubrimiento de COL en medio PM, se observa un número importante de genes sub-expresados o no presentan cambios significativos respecto al control. Además es destacable que tanto el número de genes sobre-expresados como la magnitud de expresión son superiores en las células cultivadas sobre KO recubierto con FN y en medio OM (54/84 genes sobre-expresados). En la Tabla 28 se muestran los valores numéricos correspondientes al índice de expresión. Las letras rojas indican sobre-expresión, las azules sub-expresión y las negras que no existen cambios significativos respecto al control. Un análisis general nos indica que tanto el número de genes sobre-expresados como la intensidad de la expresión son superiores cuando se utiliza el recubrimiento con FN. Existen casos relevantes en los que el gen se sobre-expresa o se reprime más con los otros

recubrimientos. Por ejemplo la expresión de fosfatasa alcalina (ALPL) es mayor en las células cultivadas sobre granulados KO recubiertos con COL y la del COL12A1 es superior tanto en los granulados recubiertos con COL como con la combinación FN/COL.

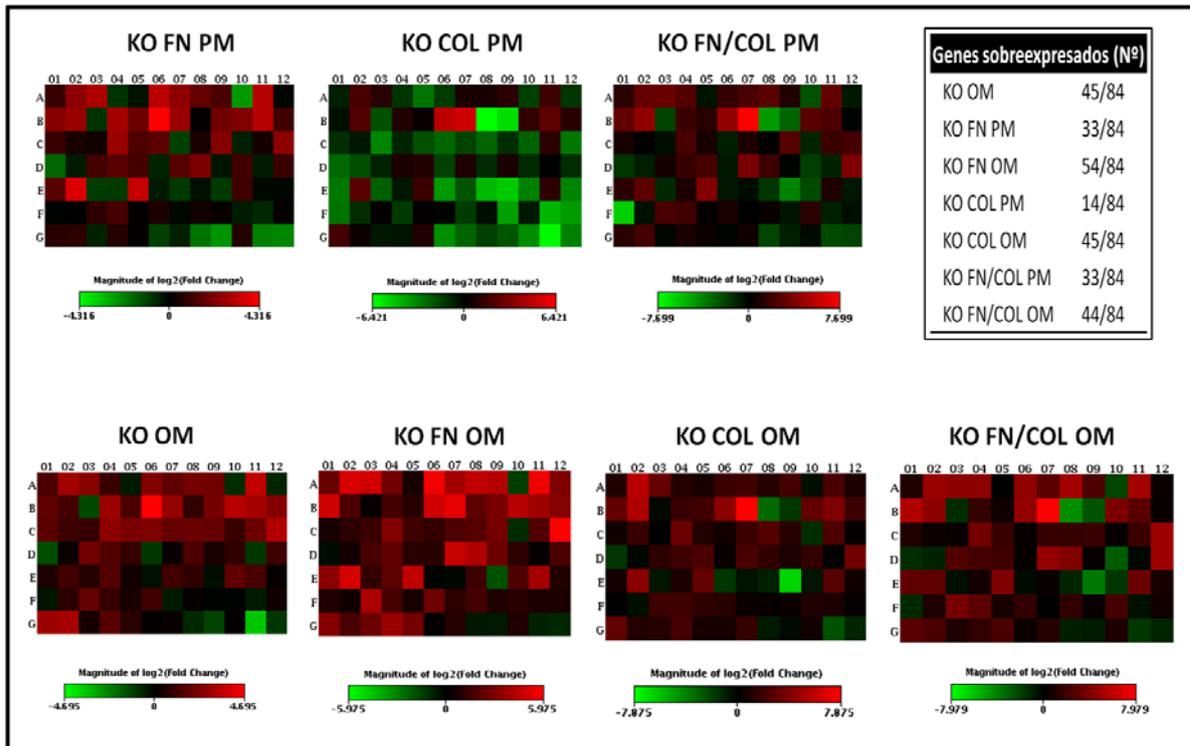


Figura 74. Representación gráfica de la magnitud de la expresión de los genes evaluados en el qPCR- Array de las células hADSCs sobre granulados KeraOs[®] sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. El análisis de la expresión se realizó respecto al material sin recubrimiento en medio PM (KO PM). Rojo: sobreexpresión Verde: sub-expresión.

Gen	KO OM	KO FN PM	KO FN OM	KO COL PM	KO COL OM	KO FN/COL PM	KO FN/COL OM
AHSG	2.59	1.92	5.35	-1.68	2.02	2.36	2.10
ALPL	8.10	5.15	34.49	3.46	54.28	8.01	29.18
AMBN	5.87	7.70	30.60	1.98	8.61	8.76	21.73
AMELY	2.07	-1.80	6.27	-2.50	2.13	5.46	20.62
ANXA5	-1.40	-1.23	1.42	-7.63	1.68	-1.47	1.01
BGLAP	5.31	9.16	53.36	-2.81	3.42	3.12	23.58
BGN	3.29	5.36	14.34	1.59	3.75	4.56	6.98
BMP1	4.56	3.13	23.01	1.52	2.26	6.48	35.39
BMP2	4.20	2.37	19.00	2.10	4.29	1.94	5.35
BMP3	-1.77	-6.05	-2.75	-3.03	-1.35	-5.50	-4.31
BMP4	11.74	8.46	50.99	2.94	4.80	7.70	35.14
BMP5	-1.57	-1.06	7.81	-2.58	1.83	-1.65	1.26
BMP6	3.38	4.87	29.71	-1.26	8.13	7.80	47.13
CALCR	2.37	6.04	3.34	4.13	43.16	20.89	21.30
CD36	-2.53	-1.78	1.13	-4.09	-1.19	-4.22	-2.59
CDH11	7.48	7.00	2.98	1.74	3.29	3.36	3.09
COL10A1	2.60	3.55	1.94	1.17	3.90	2.31	1.42
COL11A1	25.91	19.92	29.42	26.37	20.04	21.50	24.95
COL12A1	6.84	6.25	42.86	38.11	234.71	207.84	252.26
COL14A1	1.88	1.03	4.51	-85.66	-9.75	-25.63	-21.55
COL15A1	4.39	3.72	7.28	-47.99	-3.21	-8.09	-6.15
COL1A1	10.52	4.54	19.70	2.40	8.16	6.43	14.74
COL1A2	8.39	8.50	13.37	5.15	14.58	4.84	6.76
COL2A1	5.56	2.07	8.78	2.03	3.67	-1.08	1.19
COL3A1	3.19	1.93	1.44	-2.24	1.44	1.68	2.00
COL4A3	2.14	1.33	2.05	-1.47	3.33	1.02	1.28
COL5A1	1.96	1.22	2.57	-10.34	1.02	-1.37	1.16
COMP	6.19	6.08	7.89	-1.84	9.92	4.43	11.64
CSF2	4.74	2.51	2.09	-4.10	2.09	1.58	3.38
CSF3	5.00	2.95	2.29	-6.03	1.48	-1.91	1.15
CTSK	3.58	-2.12	3.52	-3.25	3.45	1.79	3.24
DMP1	3.83	1.35	4.03	-5.72	6.14	1.06	3.27
DSPP	3.59	4.78	6.85	-2.26	2.33	6.07	3.32
EGF	2.04	-1.41	-1.99	-5.51	-2.55	-2.10	1.21
EGFR	3.93	1.28	3.72	2.07	5.03	3.39	3.48
ENAM	9.76	5.31	62.92	-8.24	1.07	4.10	30.38
FGF1	-2.64	-3.34	-1.21	-6.15	-3.05	-3.14	-2.59
FGF2	1.14	-1.37	1.37	-3.85	-1.12	-1.84	-2.05
FGF3	4.19	2.17	3.10	-1.79	2.53	1.54	5.77
FGFR1	2.80	2.80	4.72	1.59	3.59	3.05	4.30
FGFR2	1.97	2.21	1.91	1.78	4.87	4.25	3.76
FLT1	-2.04	-1.54	1.89	-3.07	1.15	-1.61	1.12
FN1	1.13	2.72	25.60	1.70	4.88	12.58	24.67
GDF10	2.64	4.27	18.13	-2.05	2.74	3.49	16.07
ICAM1	1.39	-1.28	5.79	1.55	1.79	-1.08	1.19
IGF1	1.80	2.14	2.02	-2.06	2.92	-3.72	-7.31
IGF1R	-2.01	-1.35	1.09	-1.03	1.05	-2.05	-1.14
IGF2	2.19	1.96	3.36	-2.17	11.44	14.02	30.67
ITGA1	1.48	2.81	10.07	-8.16	1.55	2.51	8.08
ITGA2	2.26	13.30	32.35	4.58	20.33	6.99	7.63
ITGA3	1.58	-2.03	2.25	-5.26	-1.61	-2.31	-1.34
ITGAM	2.92	-1.99	4.49	-1.49	1.77	1.83	1.52
ITGB1	1.25	10.19	23.61	2.76	8.52	16.09	15.64
MINPP1	-1.21	-1.35	-1.05	-14.78	-3.11	-1.58	-1.26
MMP10	2.29	-1.97	-1.10	-4.31	-1.47	-1.29	1.24
MMP2	1.82	-1.20	2.66	-25.50	-1.95	-3.05	-2.21
MMP8	-1.18	-1.96	-3.74	-34.81	-95.32	-15.55	-13.26
MMP9	3.43	2.09	3.52	-9.39	-1.56	-4.62	-3.18
MSX1	2.54	-1.09	14.88	2.13	6.30	1.91	9.95
NFKB1	1.08	-1.07	1.75	-10.18	1.45	-1.56	1.67
PDGFA	-1.28	-1.05	1.71	-7.69	1.05	-76.87	-2.41
PHEX	1.75	-1.01	1.30	-2.14	-1.37	-1.39	1.90
RUNX2	3.46	1.69	16.30	1.07	3.68	4.51	12.88
SCARB1	2.00	2.27	3.15	-2.79	3.82	3.74	7.20
SERPINH1	1.37	1.04	1.48	1.04	2.70	1.07	1.70
SMAD1	2.23	1.40	5.95	-1.09	2.35	1.73	2.92
SMAD2	-1.39	-1.08	1.95	-2.84	1.21	-1.01	-1.01
SMAD3	1.07	1.23	2.92	-1.29	1.18	1.23	2.80
SMAD4	-1.04	1.09	1.68	-16.90	1.24	-1.43	1.22
SOX9	-1.05	-1.40	1.92	-1.51	1.95	2.41	4.35
STATH	-1.38	-1.62	1.53	-23.75	1.74	-1.95	-1.44
TFIP11	1.23	1.07	1.59	-15.04	1.15	-1.33	1.46
TGFB1	7.39	1.56	9.25	3.14	8.11	2.33	7.04
TGFB2	8.40	1.68	3.31	1.23	2.05	4.04	5.00
TGFB3	1.36	-1.48	5.56	-1.50	2.25	-1.15	1.89
TGFBR1	2.98	1.53	12.44	-1.40	4.31	1.67	2.90
TGFBR2	1.65	1.04	6.62	1.73	1.61	1.30	4.93
TNF	1.07	-2.11	1.07	-12.55	1.61	1.30	1.25
TUFT1	1.12	-1.45	1.81	-5.66	3.07	1.39	2.21
TWIST1	-1.67	-3.91	-1.47	-3.09	-1.77	-4.32	-1.93
VCAM1	-2.33	-5.76	-1.54	-4.49	-1.23	-1.98	-1.85
VDR	1.05	1.54	1.70	-12.06	1.47	-1.23	1.87
VEGFA	-12.40	-4.58	-1.74	-78.56	-5.84	-4.67	-3.26
VEGFB	-1.97	-4.79	-1.94	-9.19	-2.28	-4.11	-2.19

Tabla 28. Índice de expresión de los genes evaluados en el qPCR- Array de las células hADSCs sobre granulos KeraOs[®] sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. El análisis de la expresión se realizó respecto al material sin recubrimiento en medio PM (KO PM). Rojo: sobre-expresión; Azul: sub-expresión; Negro: no hay cambios significativos.

A pesar de estas variaciones, considerando que la FN es el inductor más potente cuando se utilizan ambos medios de cultivo, se han seleccionado algunos genes altamente involucrados en el proceso de diferenciación osteogénico y se representaron gráficamente (ver Figura 75). Se pone en evidencia como moléculas de señalización y proteínas tales como BMP1, BMP2, BMP4, Runx2, SMAD1, ALPL, BGLAB y COL12A1 están sobre-expresadas de manera significativa respecto al control, mientras que otras como BMP3 and TWIST descritas como inhibidores del proceso de diferenciación se encuentran sub-expresadas. Además se evidencia una vez más que la FN en ausencia de factores inductores en el medio de cultivo (KO FN PM) no solo incrementa el efecto de inducción que ya tiene el granulado KO sobre las hADSCs, sino que los valores de expresión alcanzados en gran parte de los genes evaluados son similares a los encontrados sobre el granulado KO con medio OM.

Finalmente se cuantificó la expresión de los ALPL, BGLAB (OC) y COL12A1 mediante PCR en tiempo real para comprobar los datos provenientes de array (ver Figura 76). Las tendencias obtenidas son iguales y las magnitudes de expresión similares para todos los casos. Además se cuantificó la expresión de otros tres marcadores de diferenciación osteogénica como son la ostectina (ON), la osteopontina (OP) y la subunidad $\alpha 5$ de la integrina, los cuales alcanzaron valores máximos de expresión sobre los granulados KO recubiertos con FN y FN/COL con ambos medios de cultivo.

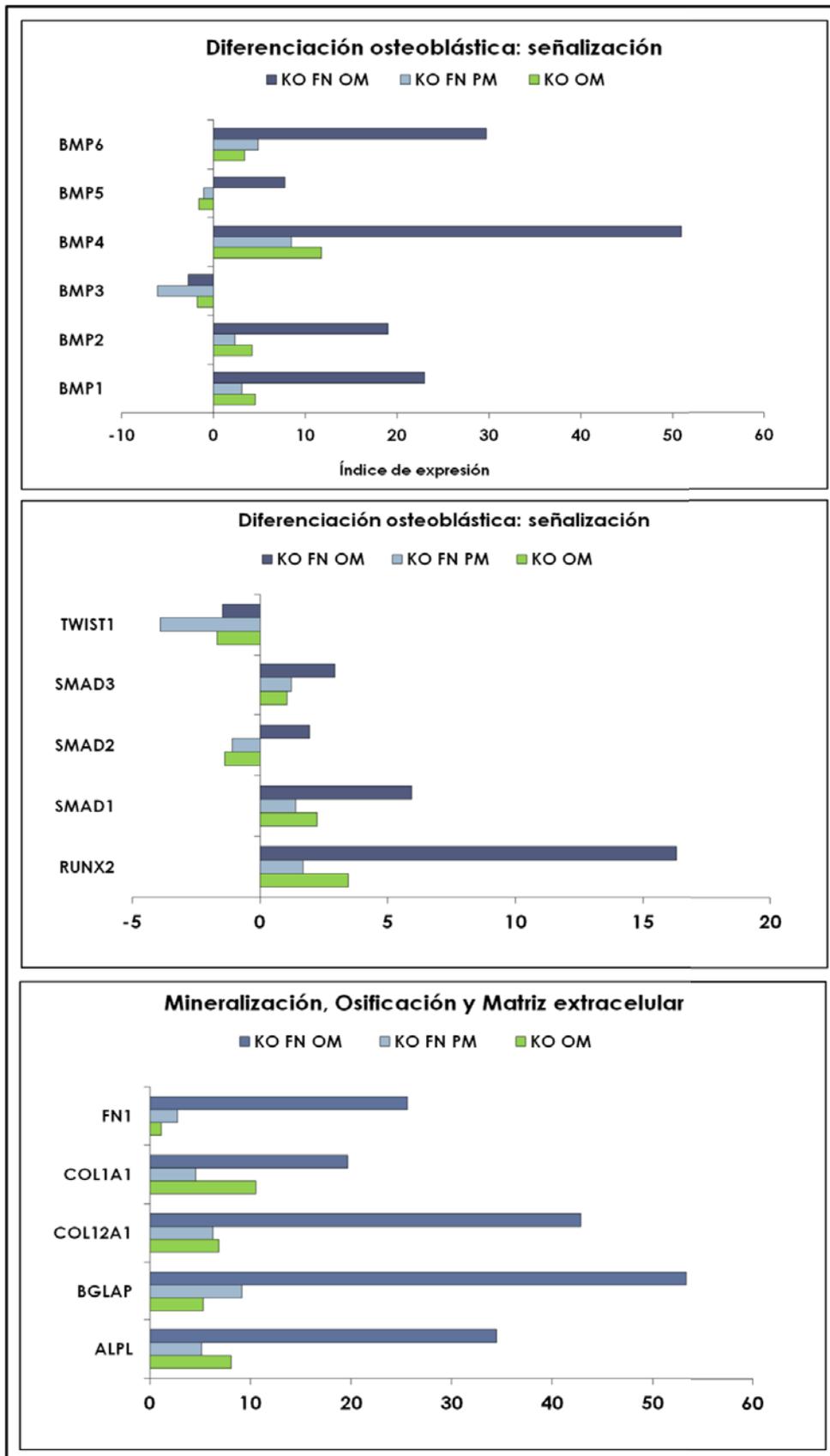
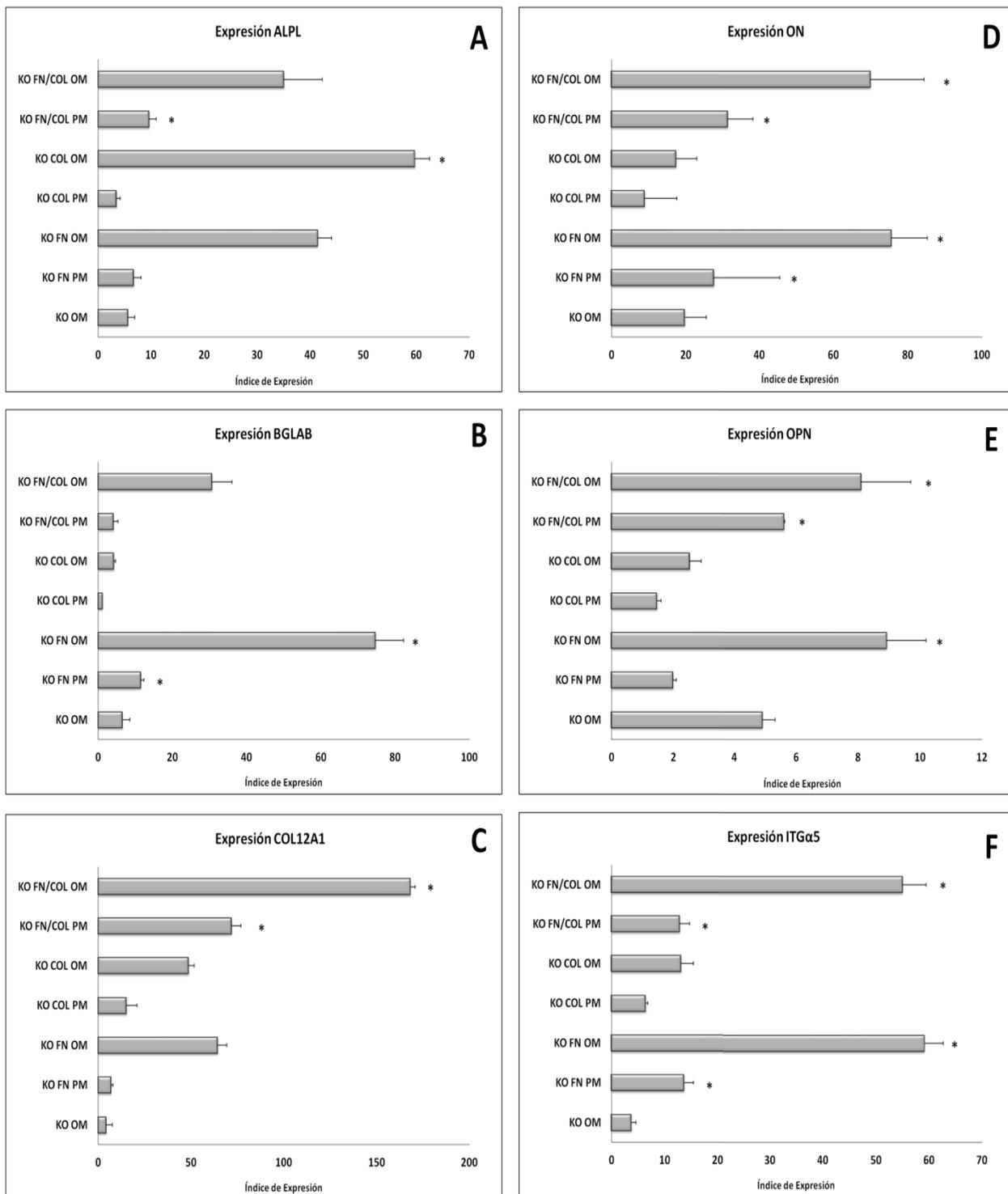


Figura 75. Índice de expresión de una selección de genes evaluados mediante qPCR- Array de células hADSCs sobre granulos KeraOs[®] sin recubrimiento (KO) y recubiertos con fibronectina (KO FN), colágeno (KO COL) y combinación de fibronectina y colágeno (KO FN/COL) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. El análisis de la expresión se realizó respecto al material sin recubrimiento en medio PM (KO PM). El recubrimiento con FN potencia la expresión de todos los genes.



4.6 Cocultivo de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano y células endoteliales de cordón umbilical humano

Los resultados obtenidos hasta el momento sobre KO indican que es un material en el cual las células hADSCs se adquieren, proliferan y muestran características de diferenciación hacia linaje osteogénico inclusive en medios de cultivo que no tienen factores inductores. Estas características sugieren que es un material apropiado para su utilización en la reparación de defectos óseos y que en combinación con el recubrimiento de FN y las células hADSCs pueden ser una estrategia interesante para su utilización en la ingeniería de tejidos del hueso. Sin embargo, los órganos y tejidos se componen de más de un tipo de células y la interacción entre ellas es un factor crucial en la función biológica. Particularmente en la reparación del tejido óseo, donde la angiogénesis tiene un papel fundamental, se ha descrito que existe una fuerte interacción entre las células madre mesenquimales de la médula ósea, las células osteoprogenitoras y las células endoteliales^{148,172}. Además, tal como se comentó en la sección 1.6, numerosos trabajos sugieren que las células endoteliales pueden considerarse como un factor osteoinductor. En este sentido, se han realizado cocultivos de células hADSCs y células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) como modelo experimental *in vitro* para evaluar la respuesta angiogénica y osteogénica sobre los discos de KOd.

El establecimiento de los cocultivos se realizó tal como se indica en la sección 3.6. Ambos tipos celulares se marcaron con los colorantes lipofílicos Vybrant™ DIL y DIO, ya que permiten hacer el seguimiento del comportamiento del cocultivo durante 7 días de cultivo. En la Figura 77 se muestran imágenes representativas de las células hADSCs y HUVEC creciendo en cocultivo con medio de cultivo de células endotelial basal 2 (EBM-2) y endotelial de crecimiento 2 (EGM-2) durante 7 días sobre plástico. En ambos medios tras 1 y 3 días de cultivo, se observa una reorganización de las células HUVEC (marcadas en rojo) formando estructuras similares a capilares, sugiriendo la formación de uniones especializadas. El número de estructuras tipo capilares incrementa con el tiempo pasando de estar concentradas en la zona central de la placa de cultivo a distribuirse aproximadamente en el 60 % de la placa. A día 7, el inmunomarcaje del antígeno CD31 revela la formación de una gran red que recuerdan a redes vasculares (ver Figura 78). La formación de las redes vasculares generadas por las células HUVEC está acompañada de una migración de las células hADSCs en proximidad directa a las estructuras tipo capilares, observándose una elevada densidad celular alrededor de los capilares y una reducción de la densidad celular en el espacio existente entre los capilares.

Adicionalmente se evaluó mediante fluorescencia, la expresión de actina alfa de músculo liso (α -SMA), ya que se considera un marcador de células musculares lisos o pericitos involucrado en los procesos de

estabilización y maduración de capilares (ver sección 1.6). Una imagen representativa de las células cultivadas con medio EGM-2 muestra la detección de la α -SMA en las células hADSCs ubicadas en las zonas cercanas a las estructuras capilares formadas por las células HUVEC (ver Figura 79). Asimismo es importante destacar que el mencionado marcador no se detecta en cuando se cultivan únicamente las células hADSCs con los medios PM y EBM-2.

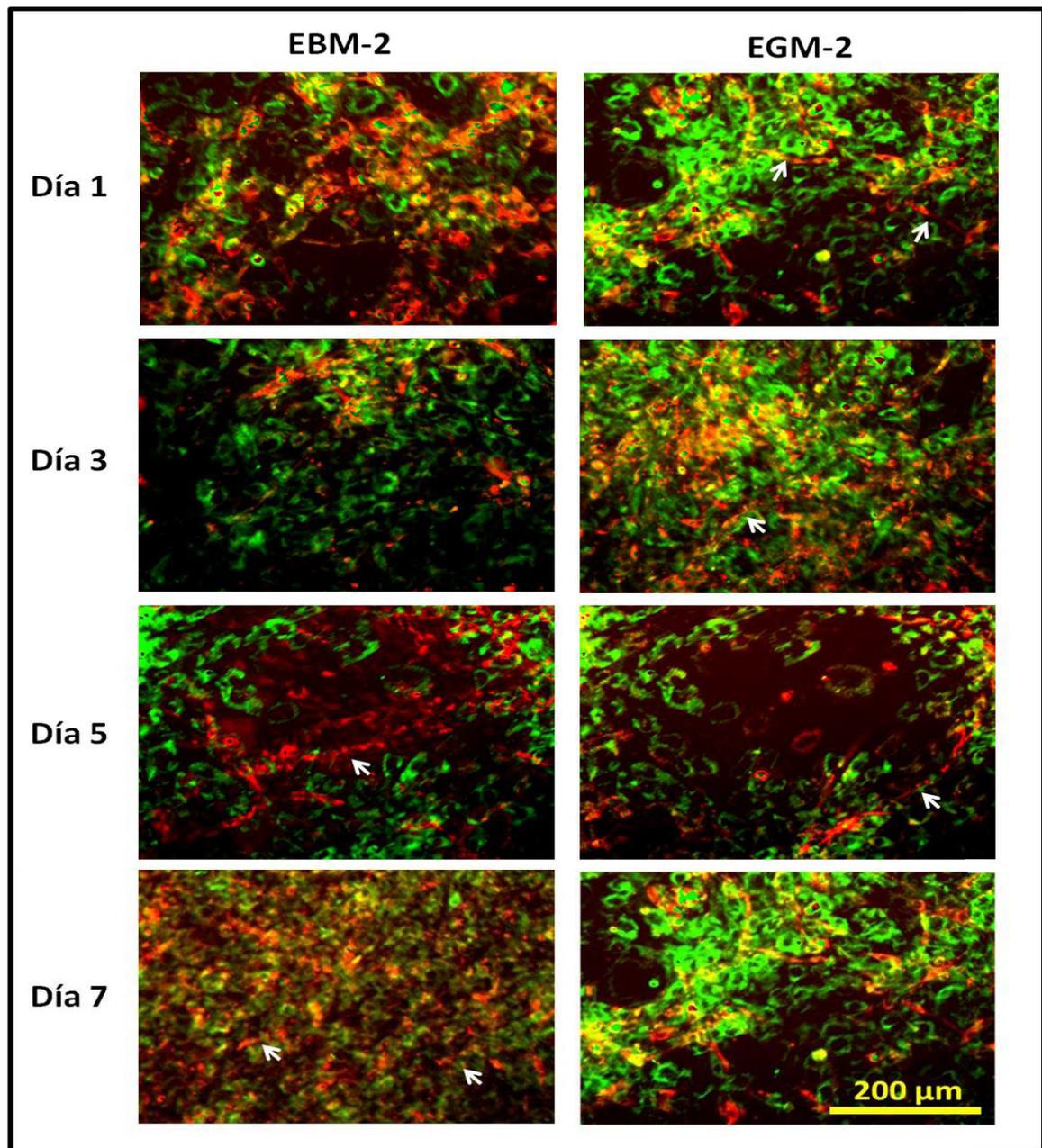


Figura 77. Imágenes de microscopía de fluorescencia de cocultivos de células hADSCs-HUVEC con medios de cultivo endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) durante 7 días. El marcaje de las células se realizó con los colorantes Vybrant. Rojo: células HUVEC Verde: células hADSCs. Se observa la formación de estructuras tipo capilares (flechas) en ambos medios de cultivo. Es importante resaltar que el medio EBM-2 contiene únicamente los factores aportados por el suero fetal bovino (FBS); mientras que el medio EGM-2 contiene además del FBS, otros factores tales como hFGF-2, VEGF, R3-IGF-1, hEGF, hidrocortisona, ácido ascórbico y heparina (ver Tabla 11). Barra 200 μ m

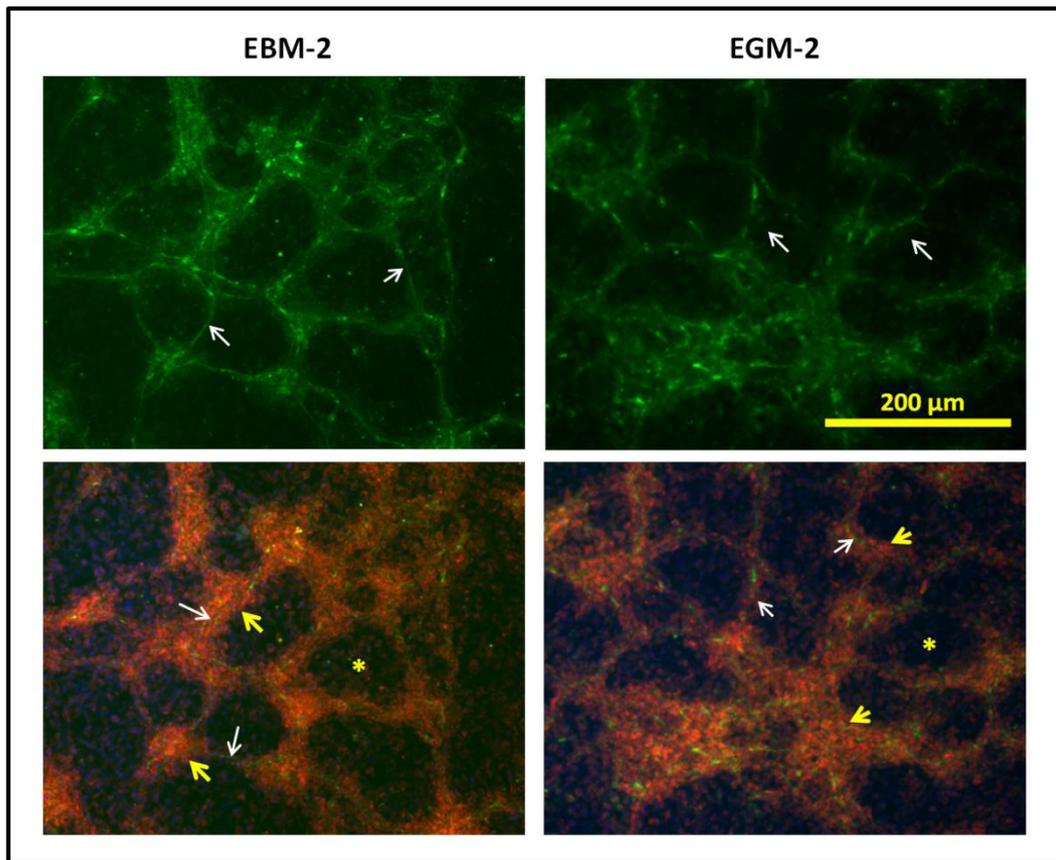


Figura 78. Imágenes de inmunofluorescencia de cocultivos de células hADSCs-HUVEC con medio endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) tras 7 días de cultivo. Inmunomarcaje con anti CD31 (verde), células hADSCs marcadas con Vybrant (rojo), núcleos teñidos con bisbenzimidida (azul). Las células HUVEC forman estructuras tipo redes vasculares (reveladas con el marcaje del antígeno CD31; flecha blanca) y las células hADSCs migran y se acumulan alrededor de dichas estructuras (flecha amarilla). Además se observa una reducción de la densidad celular en el espacio existente entre los túbulos (asterisco). Barra 200 µm

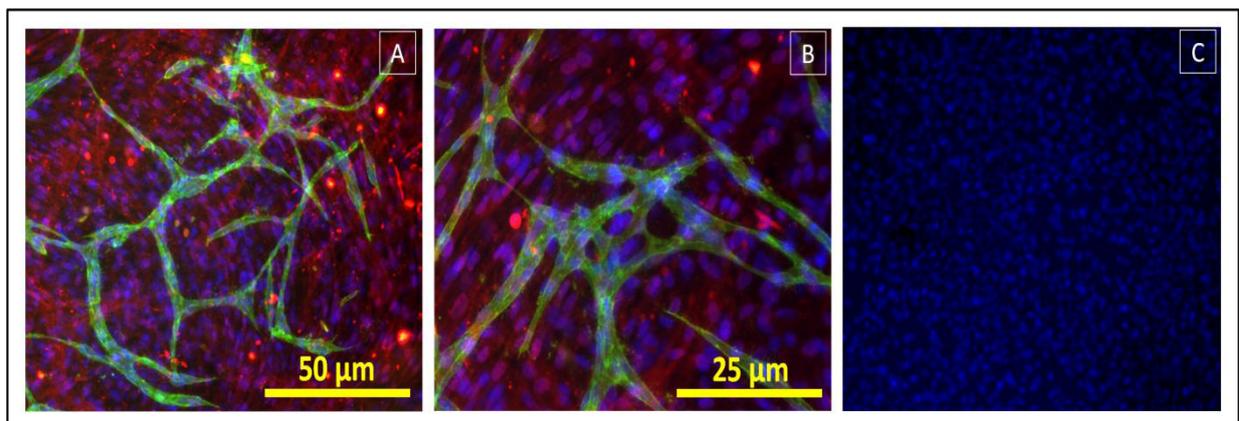


Figura 79. Imágenes de inmunofluorescencia de cocultivos de células hADSCs-HUVEC con medio endotelial de crecimiento (EGM-2) tras 7 días de cultivo. Inmunomarcaje con anti CD31 (verde) y anti α -SMA (rojo). Tinción de núcleos con bisbenzimidida (azul). (A) barra 50 µm (B) barra 25 µm. Se observa un detalle de las estructuras tipo capilares formadas por las células HUVEC.

Las células hADSCs y HUVEC creciendo en condiciones de monocultivo con los medios EGM-2, EBM-2 y PM se utilizaron como controles (ver Figura 80). Las células hADSCs crecen en los tres medios de cultivo y no presentan cambios morfológicos importantes en ningún caso. Las células HUVEC únicamente sobreviven en el medio EGM-2. Además se sometieron las células individuales al ensayo de tubulogénesis en matrigel. Únicamente las células HUVEC con los medios de cultivo EBM-2 forman estructuras tipo capilares tras 24 horas de cultivo (ver Figura 81).

Finalmente, para evaluar la especificidad del proceso observado, se cocultivaron las células HUVEC con fibroblastos humanos HDF. Tal como muestra la Figura 82 pocas células HUVEC sobreviven tras 7 días de cultivo. Esto indica que el fenómeno de la formación de estructuras tipo capilares observados en cultivo, depende de la presencia de las células hADSCs.

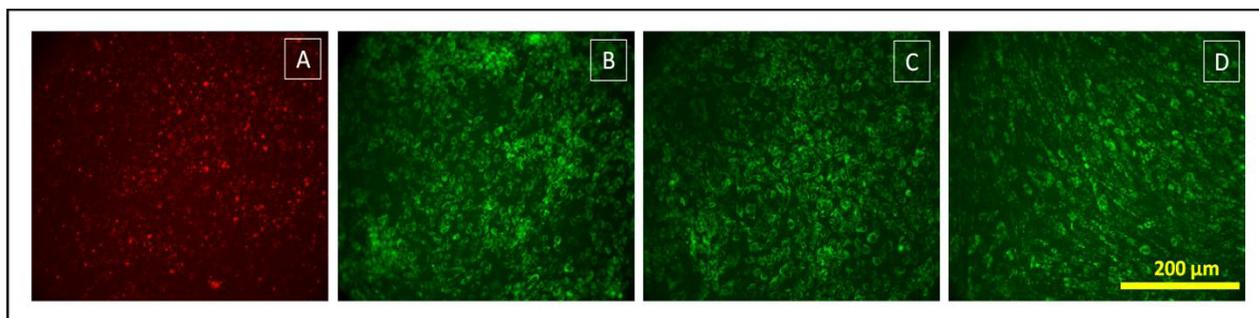


Figura 80. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HUVEC y hADSCs marcadas con colorantes Vybrant creciendo en monocultivo sobre plástico tras 7 días de cultivo. (A) células HUVEC con medio endotelial basal (EBM-2), (B) células hADSCs en medio proliferativo (PM), (C) células hADSCs en medio EBM-2, (D) células hADSCs en medio endotelial de crecimiento (EGM-2). En ningún caso se observan cambios morfológicos significativos. Barra 200 µm

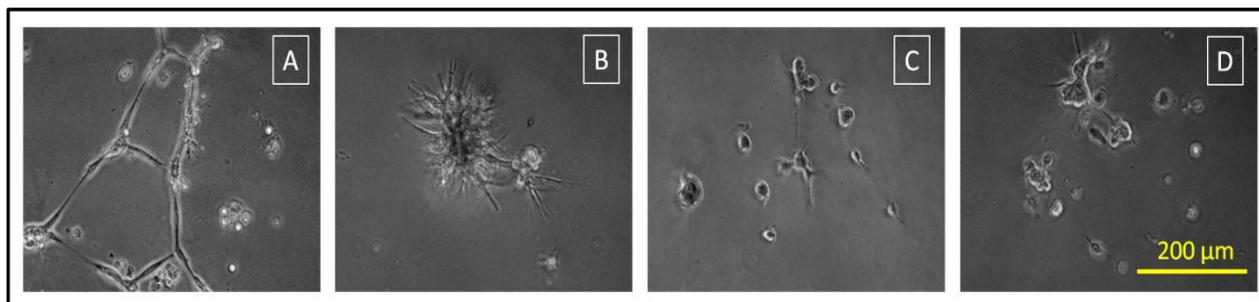


Figura 81. Imágenes de microscopía de contraste de fases de células HUVEC y hADSCs sembradas sobre matrigel tras 24 horas de cultivo. (A) células HUVEC con medio endotelial basal (EBM-2), (B) células hADSCs en medio proliferativo (PM), (C) células hADSCs en medio EBM-2, (D) células hADSCs en medio endotelial de crecimiento (EGM-2). Únicamente las células HUVEC forman estructuras capilares. Barra 200 µm

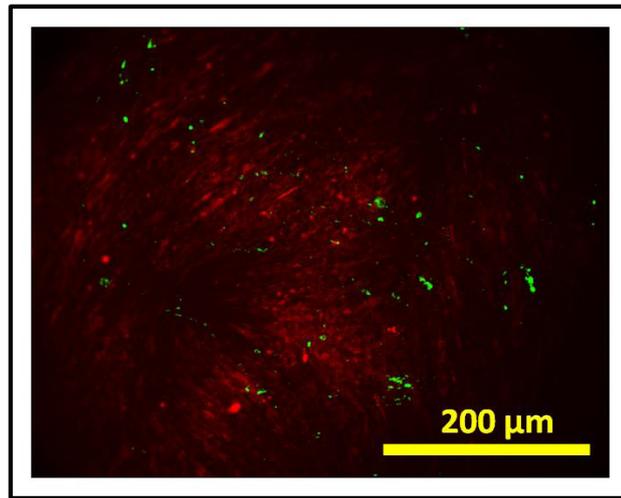


Figura 82. Imagen representativa de cocultivos de células HDF-HUVEC con medio de cultivo endotelial de crecimiento (EGM-2) tras 7 días de cultivo. El marcaje de las células se realizó con los colorantes Vybrant. Rojo: células HDF Verde: HUVEC. Se observan pocas células HUVEC en el cultivo.

La evaluación de la expresión de genes asociados a rutas de diferenciación osteogénicas y angiogénicas en cocultivos de células hADSCs y HUVEC sobre plástico con y sin recubrimiento de FN se realizó tal como se indica en la sección 3.14. Tras 7 días de cultivo con los medios OM, EBM-2 y EGM-2 se cuantificaron los marcadores ALP, ON, OC, VEGF, VE-Cad, α -SMA y Ang-1 de las células en cocultivo respecto a las células hADSCs en monocultivo (ver Figura 83).

El medio OM induce los mayores niveles de expresión de los genes osteogénicos respecto a los medios EBM-2 y EGM-2, pero la expresión de los angiogénicos es muy baja. Esto es coherente con los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia, donde empleando el medio OM, se observa una reorganización de las células HUVEC pero en ningún caso la formación de estructuras tipo capilares (ver Figura 84). Por otra parte el medio EGM-2, el cual contiene factores requeridos para el mantenimiento y proliferación de células endoteliales (ver tabla Tabla 11), es el que induce el mayor aumento de los marcadores angiogénicos, pero además induce la expresión de niveles importantes de ALP, OC y ON. Sin embargo, el resultado más interesante es que el cocultivo de las células hADSCs con HUVEC, en un medio basal endotelial EBM-2 que únicamente contiene los factores aportados por el suero fetal bovino (FBS), también se cuantifica la sobreexpresión de todos los genes evaluados. Es decir que las HUVEC incrementan el potencial osteogénico de las células hADSCs y que a su vez la condición de cocultivo favorece la formación de estructuras tipo micro-capilares en las células HUVEC.

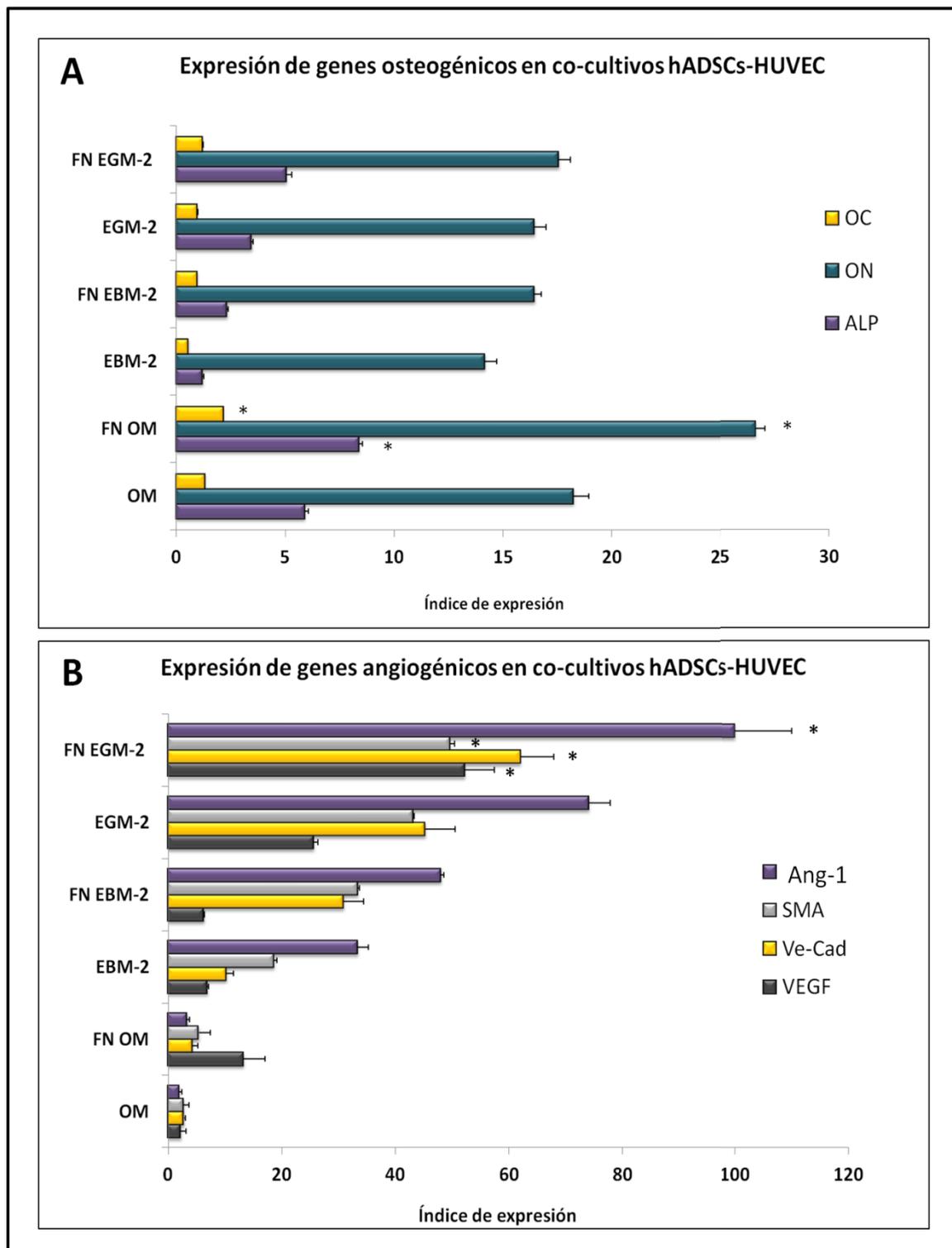


Figura 83. Expresión relativa de genes osteogénicos (A) y angiogénicos (B) en cocultivos de células hADSCs-HUVEC cultivadas sobre plástico con medios proliferativo (PM), osteogénico (OM), endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) tras 7 días. Los datos se obtuvieron mediante PCR en tiempo real. El análisis de la expresión se realizó respecto a las células hADSCs en monocultivo mantenidas en plástico sin recubrir con medio PM. Un análisis comparativo de todas las condiciones indicó que los máximos valores de expresión de los genes ALP, ON y OC se encontraron en plástico recubierto con FN y medio osteogénico (FN OM) (* $P \leq 0.05$). Por otra parte los máximos valores de los genes Ang-1, α -SMA, VE-Cad y VEGF se encontraron en el plástico recubierto con FN y medio EGM-2 (FN EGM-2) (* $P \leq 0.05$).

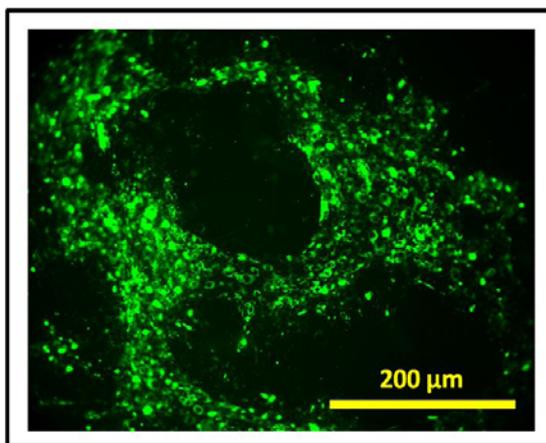


Figura 84. Imagen de microscopía de fluorescencia de cocultivos de células hADSCs-HUVEC con medio osteogénico (OM) tras 7 días de cultivo. El marcaje de las células se realizó con los colorantes Vybrant. Verde: células HUVEC. Se observa una agrupación y reorganización de las células HUVEC, aunque no la formación de estructura tipo microcapilares.

Tomando en cuenta que los resultados obtenidos sobre plástico nos indican que el cocultivo de las células hADSCs con células HUVEC favorece tanto la osteogénesis como la formación de estructuras tipo capilares, se procedió a la realización de cocultivos sobre el material cerámico KeraOs con y sin recubrimiento de Fibronectina (KOD y KOD FN).

Imágenes representativas de células hADSCs en cocultivo con células HUVEC sobre el material KOD y KOD FM empleando los medios de cultivo OM, EBM-2 y EGM-2 se muestran en la Figura 85. Tras 7 días de cultivo con medios EBM-2 y EGM-2, las células HUVEC forman estructuras tipo capilares similares a las descritas en los cocultivos sobre plástico. Sin embargo, no se forman las estructuras tipo redes vasculares observadas a día 7 sobre plástico. En el medio OM hay pocas células HUVEC sobre el disco; aunque al recubrir el material con FN se llegan inclusive a formar algunas estructuras tipo capilares en las zonas más superficiales del material. La mayor densidad de estructuras tipo capilares se observa en los cultivos mantenidos con medio EGM-2 y en todos los casos el recubrimiento con FN induce un incremento en la formación de dichas estructuras.

La cuantificación los marcadores ALP, ON, OC, VEGF, VE-Cad, α -SMA y Ang-1 de las células en cocultivo respecto a las células hADSCs en monocultivo cultivadas sobre el disco KOD se muestran en la Figura 86. La tendencia de los datos de expresión obtenidos son similares a las descritas para los cocultivos sobre plástico, sin embargo las magnitudes de los índices de expresión son significativamente inferiores. El único marcador angiogénico que incrementa significativamente en el cultivo sobre el material recubierto con FN en medio OM respecto al material sin recubrir es el VEGF. Este hecho evidencia la importancia de este factor en la formación de las estructuras tubulares en las HUVEC que crecen en cocultivo con las hADSCs en esta condición.

Otro dato interesante es que sobre el biomaterial, los medios OM y EGM-2 inducen una expresión similar de los genes ALP, ON y OC, sin mostrar diferencias significativas entre sí. Por el contrario la expresión de los genes VEGF, VE-Cad, Ang-1 y α -SMA se sobreexpresan significativamente en el medio EGM-2 y poco en el OM. Al igual que sobre plástico, el cocultivo de las células hADSCs con HUVEC en el medio EBM-2, induce sobreexpresión de todos los genes evaluados, tanto los angiogénicos como los osteogénicos. El recubrimiento de los discos con FN incrementa significativamente la formación de estructuras capilares y la expresión de los genes osteogénicos y angiogénicos evaluados, respecto al disco sin recubrir.

Estos resultados sugieren que los discos KOd no solo son biocompatibles con las células hADSCs sino que proveen un microambiente adecuado para la adhesión, interacción y diferenciación de dos tipos celulares (hADSCs y HUVEC). Este proceso se favorece significativamente al aplicar un recubrimiento de la superficie del disco con FN.

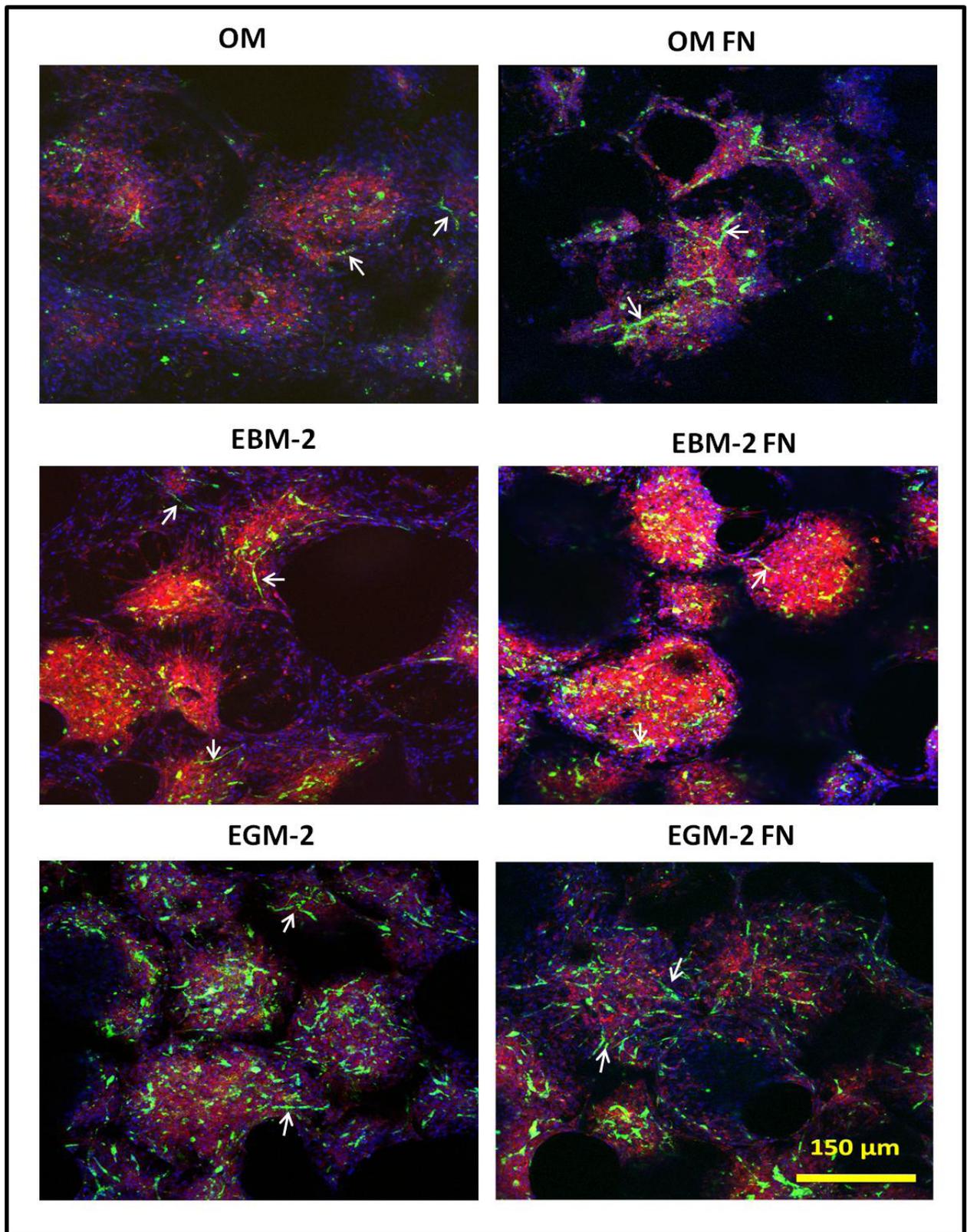


Figura 85. Imágenes de microscopía confocal de cocultivos de células hADSCs-HUVEC sobre granulados KeraOs sin recubrimiento (KO) y con recubrimiento de fibronectina (KO FN). Se mantuvieron los cultivos con medio osteogénico (OM), endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) durante 7 días. El marcaje de las células se realizó con los colorantes Vybrant. Rojo: células hADSCs Verde: células HUVEC. Se observa la formación de estructuras tipo capilares (flechas) en todas las condiciones, con excepción de las células crecidas sobre el material sin recubrimiento en medio OM (KOd OM). Tanto el recubrimiento con FN como el medio EGM-2 incrementan significativamente la formación de las mencionadas estructuras.

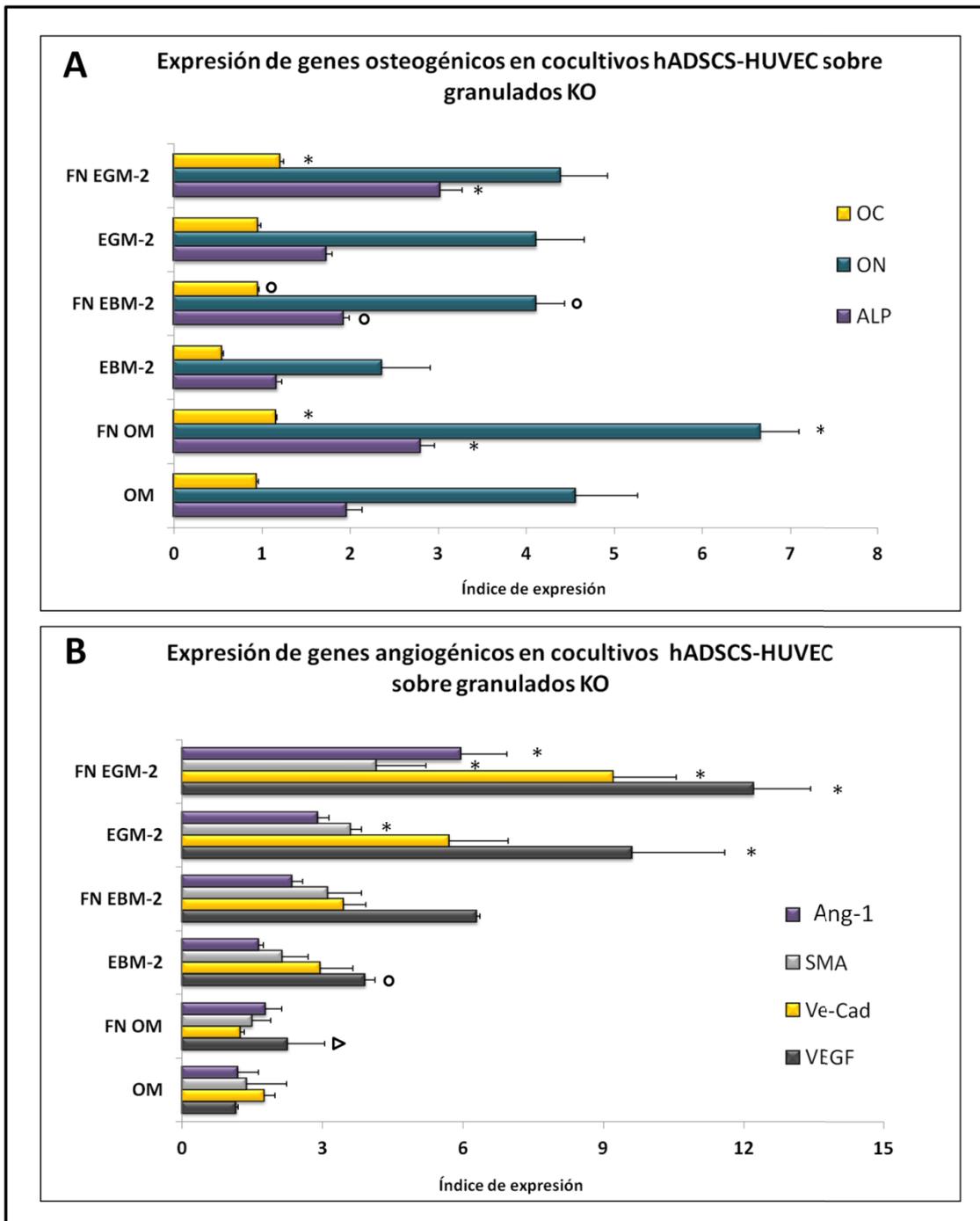


Figura 86. Expresión relativa de genes osteogénicos (A) y angiogénicos (B) de cocultivos de células hADSCs-HUVEC sobre granulados KeraOs sin recubrimiento (KO) y con recubrimiento de fibronectina (KO FN). Se mantuvieron los cultivos con medio osteogénico (OM), endotelial basal (EBM-2) y endotelial de crecimiento (EGM-2) durante 7 días. Los datos se obtuvieron mediante PCR en tiempo real. El análisis de la expresión se realizó respecto a las células hADSCs en monocultivo sobre el disco KO con medio PM. Un análisis comparativo de todas las condiciones, indica que los máximos valores de expresión de los genes fosfatasa alcalina (ALP), osteonectina (ON) y osteocalcina (OC) se induce en los medios OM y EGM-2 ($*P \leq 0.05$), sin embargo no hay diferencias significativas entre sí. Por el contrario la máxima expresión de los genes Ang-1 y VE-Cad se induce en exclusivamente en el medio EGM-2 ($*P \leq 0.05$), mientras que los genes α -SMA y VEGF se inducen tanto en el EGM-2 como en el EBM-2 ($*P \leq 0.05$). El único marcador angiogénico que incrementa significativamente sobre el material recubierto con FN respecto al material sin recubrir empleando el medio OM, es el VEGF ($\blacktriangleright P \leq 0.05$). El medio EBM-2 (que no contiene factores de crecimiento adicionales a los aportados por el FBS), induce sobreexpresión de todos los marcadores osteogénicos y angiogénicos. Además el recubrimiento con FN potencia la expresión para los genes ALP, ON, OC y VEGF en el medio EBM-2, respecto al material sin recubrir ($\circ P \leq 0.05$).

4.7 Regeneración ósea en perros Beagle

Tal como se describió en la sección 3.17 de materiales y métodos, se realizó un experimento *in vivo* en perros Beagles con la finalidad de evaluar el efecto del biomaterial granulado KO, el recubrimiento con FN y la implantación de células cADSCs autólogas adheridas al material, en la regeneración ósea maxilar. En este contexto la contribución de nuestro laboratorio en este proyecto fue la siguiente:

- A. Aislamiento y caracterización de células mesenquimales de tejido adiposo canino (cADSCs) de 18 perros Beagles. Los resultados de este apartado han sido descritos previamente en la sección 4.1.
- B. Realización de pruebas de biocompatibilidad y diferenciación osteogénica con células cADSCs de un perro piloto empleando el biomaterial KOd y KOd FN.

La siembra y cultivo celular de las células hADSCs sobre discos KOd se realizó tal como se describe en la sección 3.5.2.1 empleando los medios de cultivo PM y OM. Los resultados obtenidos mediante la técnica AB indican que un $53 \% \pm 2,2 \%$ de las células cADSCs se adhieren a los discos KOd y que la FN induce un incremento significativo de $5 \% \pm 2 \%$ en la adhesión de las células al material. El número de células adheridas a los discos KOd y KOd FN incrementó significativamente durante el tiempo de estudio. No se encontraron diferencias significativas entre las células crecidas con medio OM y PM (ver Figura 87). Asimismo el recubrimiento con FN no indujo cambios significativos en la proliferación.

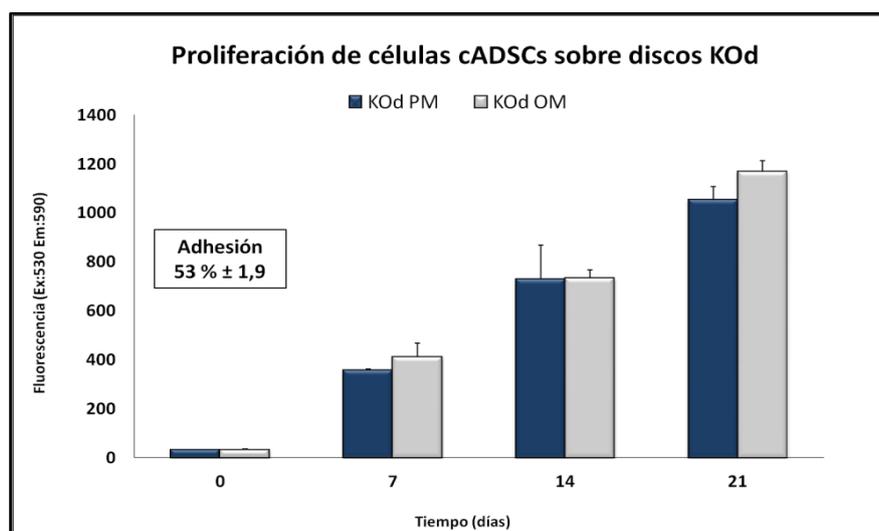


Figura 87. Adhesión y proliferación de células cADSCs sobre discos KeraOs (KOd) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 0, 7, 14 y 21 días de cultivo. Un 53% de las células sembradas se adhieren al disco y proliferan en el tiempo en ambos medios de cultivo (medios PM y OM). No existen diferencias significativas en el número de células a día 21 ($P \geq 0.05$).

Imágenes representativas de microscopía estereoscópica (Figura 88 A1 y A2) y microscopía electrónica de barrido (Figura 88 B, C y D) evidencian la población de células que cubren casi por completo la superficie de los discos KOD con medios PM y OM tras 21 días de cultivo. Particularmente en las células crecidas con medio OM se observa la formación de estructuras tipo nódulos en algunas zonas del disco. Un detalle de las células permite diferenciar una morfología alargada tipo fibroblástica en las células mantenidas con el medio PM y una morfología tipo osteoblástica en las células mantenidas con medio OM. Al aplicar el recubrimiento con FN tanto en plástico como en el disco KOD (KOD FN) hay un incremento en la formación de las estructuras nodulares en ambos medios de cultivo (Figura 88).

Además de adherirse y proliferar, las células cADSCs se diferencian hacia linaje osteogénico cuando se cultivan sobre el material KOD. Los valores de actividad ALP y el índice de expresión de los marcadores ALP, ON y OC aumentan respecto a las células cultivadas sobre plástico (ver Figura 90 y Figura 91). Al igual que en las células madre mesenquimales humanas (hADSCs), en las aisladas de tejido adiposo caninas (cADSCs) el recubrimiento con FN potencia la respuesta inducida por el material cuantificándose los máximos valores de actividad ALP y los máximos valores de expresión de los marcadores osteogénicos en la condición del disco recubierto con FN en medio osteogénico (KOD FN OM).

Tomando en cuenta el tamaño de los defectos óseos creados en la mandíbula de los perros, se utilizó el material en formato de granulado. Se repitieron las pruebas de adhesión y proliferación celular obteniendo datos muy similares a los descritos anteriormente.

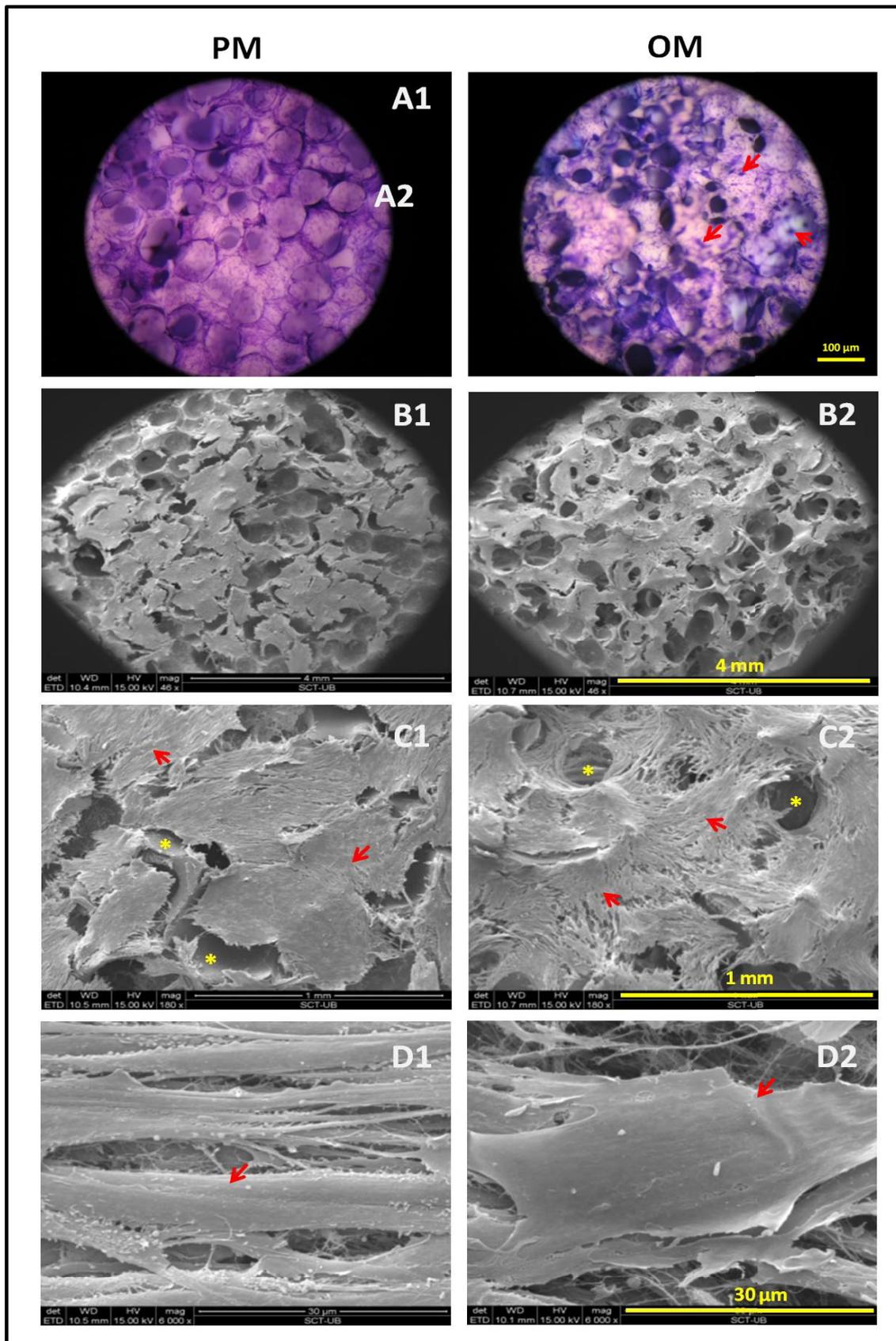


Figura 88. Células cADSCs sobre discos KeraOs (KOD) con medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 días de cultivo. **A1, A2)** Imágenes de microscopía estereoscópica. Tinción azul de toluidina, Aumento 4X. En el medio OM se observan estructuras tipo nódulos en algunas zonas del disco. Barra 100μm. **Imágenes de microscopía electrónica de Barrido. B1, B2)** Barra 4 mm. **C1, C2)** Barra 1mm. **D1, D2)** Barra 30 μm. La morfología de las células cultivadas con el medio PM tipo fibroblástica (D1), mientras que las cultivadas con medio OM (D2) la morfología es similar a la de osteoblastos. Células (flechas), material (asterisco).

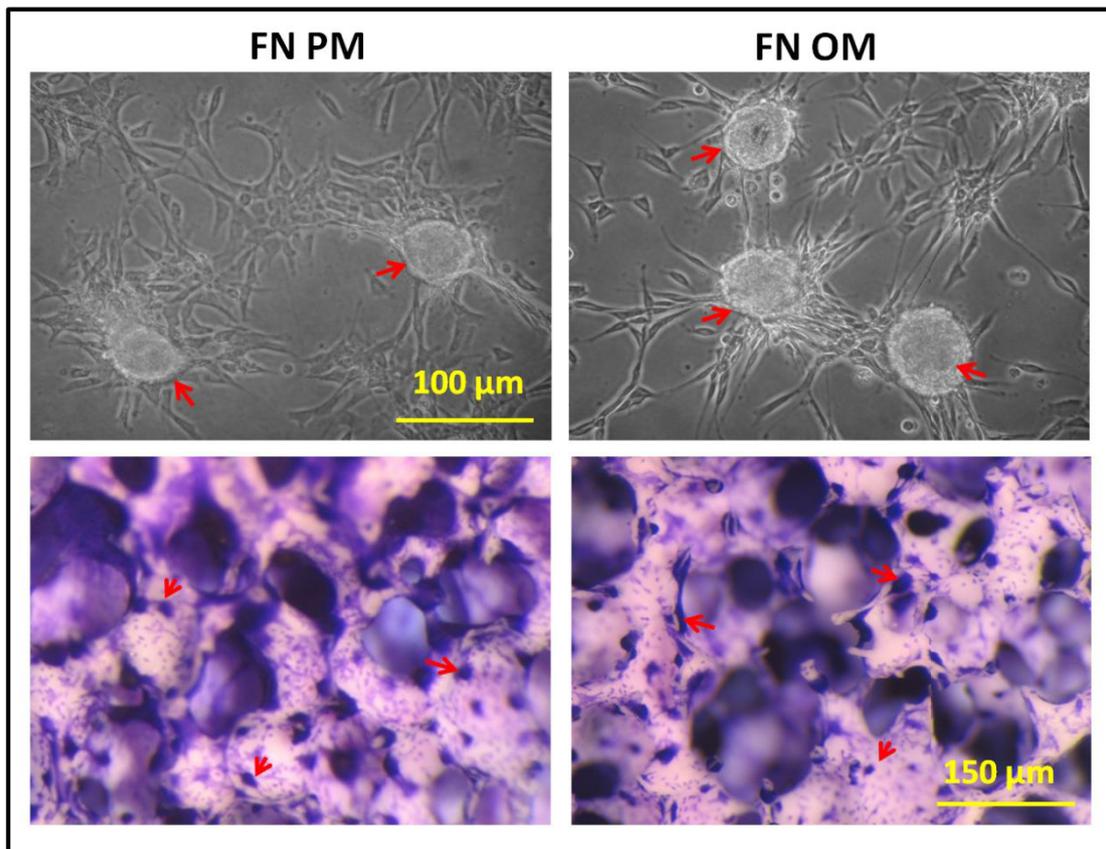


Figura 89. Células cADSCs cultivadas sobre plástico y discos KeraOs (Kod) con y sin recubrimiento de fibronectina (FN) en medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 de cultivo. A1, A2) Imágenes de microscopía de contraste de fases de células crecidas sobre plástico recubierto con FN. Barra 100 μm . B1, B2) Imágenes de microscopía estereoscópica de células crecidas sobre discos KOD y KO FN. Barra 150 μm . Tanto en plástico como en el disco se observan estructuras tipo nódulos (flechas) que se distribuyen por toda la superficie.

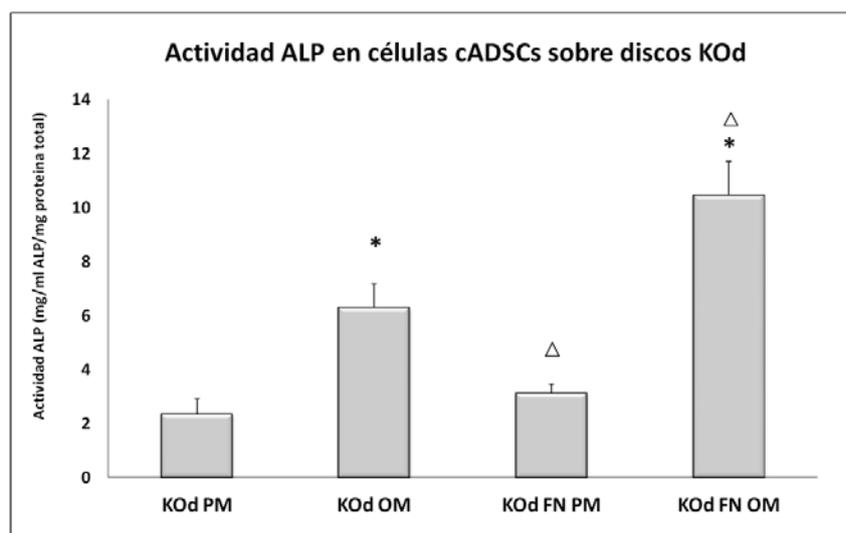


Figura 90. Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) en células cADSCs cultivadas sobre discos KeraOs (Kod) con y sin recubrimiento de fibronectina (Kod FN) en medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 de cultivo. Los valores de actividad son significativamente superiores cuando se utiliza el medio OM respecto al medio de cultivo PM (* $P \leq 0.05$). Sin embargo, con medio PM también se registran valores de actividad. El recubrimiento de los discos con FN incrementa significativamente los valores de actividad de la ALP respecto al disco sin recubrir en ambos medios de cultivo (Δ $P \leq 0.05$).

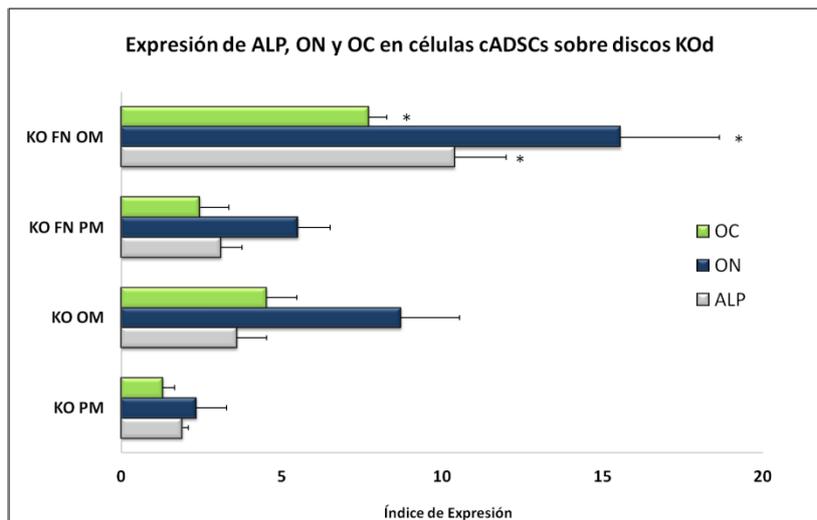


Figura 91. Expresión relativa de los genes fosfatasa alcalina (ALP), osteonectina (ON) y osteocalcina (OC) en células cADSCs cultivadas sobre discos KeraOs (KOd) con y sin recubrimiento de fibronectina (KOd FN) en medio proliferativo (PM) y osteogénico (OM) tras 21 de cultivo. Un análisis comparativo de todos los tratamientos indica que los máximos valores de expresión de los marcadores osteogénicos ALP, ON y OC se encuentran en la condición del disco recubierto con FN en medio osteogénico (KOd FN OM) (* $P \leq 0.05$).

C. Recubrimiento de granulados KO con FN y siembra de células cADSCs autólogas para su posterior implantación en los defectos óseos mandibulares creados en cada perro.

El recubrimiento y siembra de los granulados KO se realizó tal como se describe en la sección 3.5.2.2. El número de células sembradas por cada 1,25 g de granulado (cantidad de material necesario para cubrir toda la perforación mandibular) fue de 500.000 células cADSCs. El seguimiento de la proliferación celular pre y post- manipulación tal como se describió en la sección 3.17. Este procedimiento se realizó con la finalidad de verificar que durante el traslado y el tiempo transcurrido durante la cirugía (entre 4 y 5 horas), las células no tuvieran efectos negativos en su capacidad de proliferación por no mantenerse en las condiciones óptimas (37°C, 5% CO₂ y 90% humedad). En la Figura 92A se muestran imágenes representativas de la implantación de los granulados KO FN con células cADSCs en los defectos óseos de la mandíbula de perros Beagles. Los resultados obtenidos mediante el método AB indican que tanto las células pre-manipuladas como las post-manipuladas proliferan en el tiempo de estudio y no muestran diferencias significativas entre sí (ver Figura 92B). Los datos graficados corresponden al promedio de los valores obtenidos en los 18 perros evaluados. Estos resultados han sido +confirmados mediante microscopía estereoscópica tras 9 días de cultivo (ver Figura 92C) donde pueden observarse las células adheridas al material.

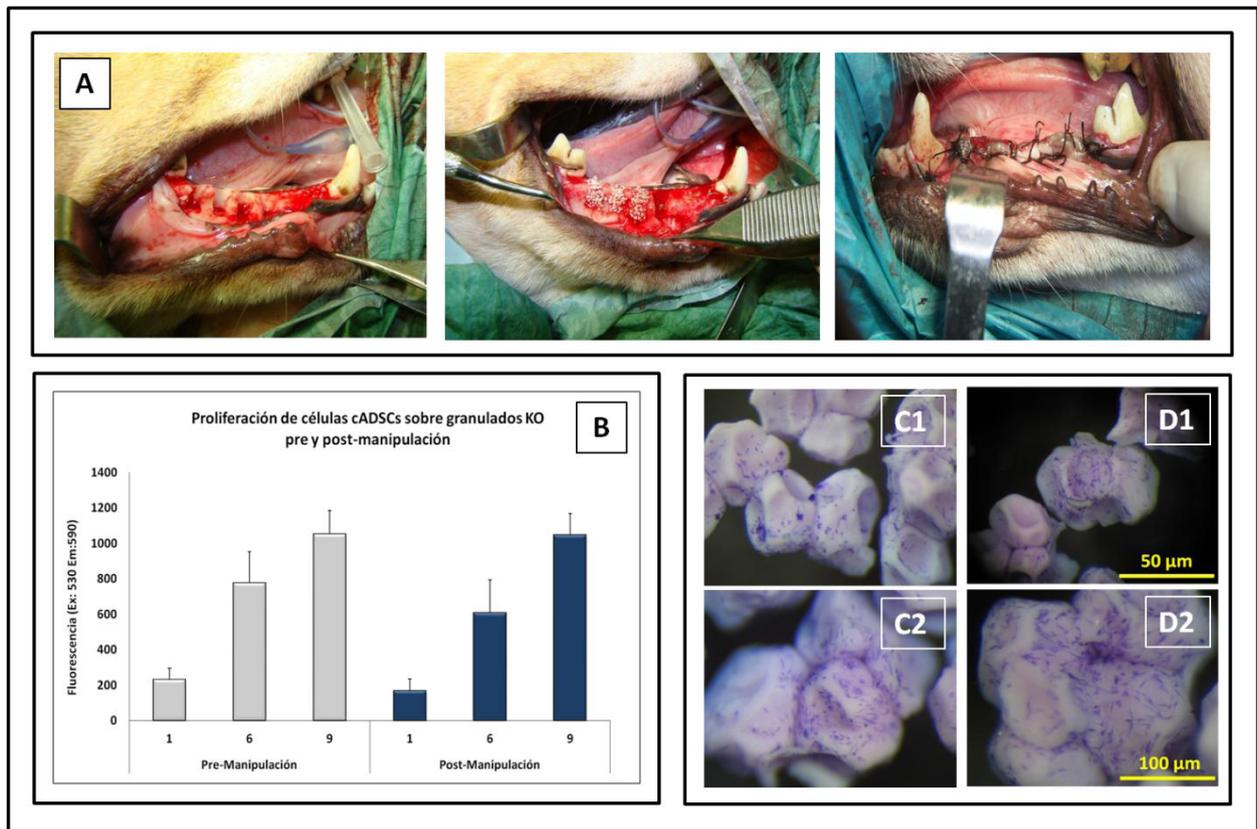


Figura 92. Experimento de implantación de granulados KeraOs recubiertos con fibronectina (KOFN) con y sin células madre autólogas de tejido adiposo en defectos óseos mandibulares de perros Beagles. (A) Imágenes representativas de la implantación de células cADSCs autólogas adheridas a granulados KeraOs recubiertos con fibronectina (KO FN) en los defectos óseos mandibulares de perros Beagles. **(B)** Proliferación de células cADSCs pre y post-manipulación tras 1, 6 y 9 días de cultivo. Los datos se obtuvieron mediante el método Alamar Blue®. **(C)** Imágenes de microscopía estereoscópica de células cADSCs sobre granulados KOd FN pre-manipulación **(C1 y C2)** y post-manipulación **(D1 y D2)**. Tinción azul de Toluidina. Barra 50 μ m (C1 y D1) y Barra 100 μ m (C2 y D2). No existen diferencias significativas en la proliferación de las células pre-manipuladas y post-manipuladas ($P \geq 0.05$).

5. DISCUSIÓN

La sustitución o regeneración de grandes cantidades de tejido óseo, sigue siendo hoy día uno de los principales retos clínico-quirúrgicos, siendo la ingeniería de tejidos del hueso una de las estrategias más prometedoras. La combinación de células, biomateriales y factores inductores del proceso osteogénico, son factores claves para la creación de un constructo células-biomaterial con potencial uso en la reconstrucción de defectos óseos. A pesar de que en la última década se han diseñado numerosos materiales sintéticos con la finalidad de regenerar tejido óseo, en ningún caso superan la capacidad regenerativa de los implantes naturales. Por lo tanto, se sigue investigando en la combinación de materiales sintéticos con elementos químicos y biológicos que incrementen la bioactividad del material y potencien la respuesta regenerativa.

Las células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADSCs) tienen un gran potencial en la ingeniería de tejidos debido a su fácil obtención, capacidad de diferenciación a múltiples linajes, propiedades Inmunomoduladoras y producción de factores proangiogénicos y antiapoptóticos. Asimismo, los materiales cerámicos son ampliamente utilizados como biomateriales, debido a su similitud con la fase mineral del tejido óseo. Además, su combinación con proteínas de ECM o factores osteoinductores pueden incrementar la bioactividad del constructo células-biomaterial. A pesar de ello, pocos trabajos existen en la literatura que evalúen la repuesta de células ADSCs sobre materiales cerámicos de fosfatos de calcio. En este sentido, el objetivo principal de ésta tesis ha sido evaluar la biocompatibilidad y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo (ADSCs) frente a materiales cerámicos de fosfato de calcio y determinar el efecto del recubrimiento de la superficie del material con proteínas de ECM sobre la diferenciación osteogénica. Adicionalmente evaluamos el potencial osteogénico y angiogénico de las células hADSCs en cocultivo con células HUVEC.

5.1 Aislamiento y caracterización de células madre derivadas de tejido adiposo humano (hADSCs) y canino (cADSCs)

En primer lugar se realizó el aislamiento de células madre de tejido adiposo humano a partir de tejido adiposo subcutáneo (lipoaspirados) de cuatro donantes. La población de células obtenidas presentó capacidad de adhesión al plástico, una expresión positiva (≥ 95 %) de los antígenos de superficie asociados con células progenitoras CD105, CD73, CD90, CD29 y CD44; y una expresión negativa (≤ 2 %) de los antígenos asociados a células del linaje hematopoyético CD14, CD34, CD45, CD271 y HLA-DRII. Además se demostró su capacidad de diferenciarse a diversos linajes, tales como el adipogénico, osteogénico, miogénico y condrogénico (ver sección 4.1). Los resultados indican que las células aisladas son células madre mesenquimales, pues cumplen con todos los criterios establecidos por la

International Society for Cellular Therapy para la identificación de un tipo celular como célula progenitora (ver Tabla 6) ⁷⁸.

Resultados similares han sido descritos previamente por otros autores. Zuk y col. ^{86,95}, han sido los primeros en aislar y caracterizar las células madre adultas derivadas de lipoaspirados de tejido adiposo sub-cutáneo humano. Demostraron que las células hADSCs tienen características similares a las células madre mesenquimales provenientes de médula ósea (BM-MSCs) y que mediante la utilización de medios de cultivo con factores específicos (factores de crecimiento o agentes químicos), se induce la diferenciación de las células hacia diversos linajes. Estos resultados han sido confirmados por De Ugarte y col. ⁸⁷, quienes compararon las células hADSCs y BM-MSCs provenientes del mismo paciente y demostraron que no existen diferencias significativas en la cinética de crecimiento, senescencia celular y la capacidad de diferenciación a múltiples linajes. Asimismo, destacan que el tejido adiposo es una fuente abundante y prometedora de células madre mesenquimales (MSCs) y que su posible utilidad clínica se ve reforzada por su fácil cultivo con medios no selectivos, rápida expansión en cultivo y la capacidad de diferenciación a múltiples linajes *in vitro*.

A partir de estos tres trabajos, varios artículos han sido publicados referentes a la caracterización inmuno-fenotípica de las células hADSCs, su potencialidad *in vitro*, su uso en modelos animales para evaluar la regeneración de diversos tejidos y en algunos casos su aplicación clínica. Dichas células, han pasado a convertirse en una de las poblaciones de células madre adultas más populares en los campos de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

Gronthos y col. ¹⁷³, realizaron una evaluación exhaustiva de la expresión de antígenos de superficie en las células hADSCs con la finalidad de identificar un patrón único o específico para este tipo celular. Subsiguientes artículos publicados por otros investigadores, evidencian pequeñas diferencias en el perfil de expresión encontrado por los diferentes grupos de investigación ^{96,97,174-179} (ver Tabla 29). Sin embargo, coinciden en que las hADSCs son positivas para los antígenos de superficie CD13, CD90, CD44 y CD105; y negativos para CD14, CD31, CD45, CD144 y HLA-DR. Los resultados obtenidos en la presente tesis coinciden con estos datos (ver sección 4.1).

Quizás uno de los marcadores más controversiales es el CD34. Hasta hace algunos años se consideraba un marcador que debía tener una expresión negativa en células madre mesenquimales, debido a que es un marcador de células progenitoras del linaje hematopoyético. Sin embargo, algunos autores han descrito que su expresión es positiva en células hADSCs y debe ser considerado una característica particular de éstas células, asociando su expresión a su localización perivascular en el tejido adiposo ^{175,177-179}. Nuestros resultados difieren de ésta última teoría, pero coinciden con lo descrito inicialmente

por Zuk y col. ^{86,95}, ya que en el análisis mediante citometría de flujo de las células hADSCs la expresión del marcador CD34 es negativa ($\leq 2\%$).

Author and Year	Expression profile	
	Positive expression	Negative expression
Gronthos y col. 2001 ¹⁷³	CD90, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD105, CD146, CD166, HLA-ABC	CD11a, CD11b, CD11c, CD31, CD45, CD50, CD56, CD62e, HLA-DR
Zuk y col. 2001 ⁸⁶	CD13, CD29, CD44, CD49d, CD71,	CD14, CD16, CD31, CD34, CD45,
Zuk y col. 2002 ⁹⁵	CD90, CD105, STRO-1, SH3	CD56, CD62e, CD104, CD106, SMA
Katz y col. 2005 ¹⁷⁴	CD29, CD49b, CD49d, CD49e, CD51, CD61, CD90, CD138, CD140a	CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD41a, CD49f, CD62L, CD62P, CD106, CD117, CD133, HLA-DR, ABCG2
Mitchell y col. 2006 ⁹⁶	CD13, CD29, CD34, CD44, CD49a, CD63, CD73, CD90, CD146, CD166	CD31, CD144
Yoshimura y col. 2006 ¹⁷⁵	CD34, CD90	CD31, CD45, CD105, CD146
Oedayrajsingh-Varma y col. 2007 ⁹⁷	CD34, CD54, CD90, CD105, CD117, HLA-ABC, HLA-DR	CD31, CD45, CD106, CD146, CD166
Zannettino y col. 2008 ¹⁷⁶	CD44, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, STRO-1, 3G5	CD14, CD31, CD45
Traktuev y col. 2008 ¹⁷⁷	CD10, CD13, CD34, CD90, CD140a, CD140b, SMA	CD31, CD45, CD144
Zimmerlin y col. 2010 ¹⁷⁸	CD34, CD90	CD31, CD146, SMA
Lin y col. 2008 ¹⁷⁹	CD34	CD31, CD140b, SMA
Proposed phenotype of ADSCs (common between two or more studies)	CD13, CD29, CD105, CD44, CD49d, CD54, CD90, CD140a, STRO-1	CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD31, CD45, CD106, CD144, HLA-DR
Controversial markers in ADSCs	CD34, CD140b, CD146, CD166, SMA	
Stromal cell markers	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166	
Hematopoietic markers	CD31, CD34, CD45, ABCG2	
Pericyte markers	CD146, Stro-1, 3G5	

Tabla 29. Perfil de expresión de antígenos de superficie de las células madre de tejido adiposo humano (hADSCs) obtenidos por varios grupos de investigación. Obtenido de Zuk ¹⁸⁰.

Debido a la importancia que tiene la diferenciación osteogénica de las células hADSCs en esta tesis, es importante destacar, la elevada expresión del marcador CD90 en las células hADSCs, inclusive a países

muy elevados. Este marcador ha sido asociado previamente con células osteoprogenitoras y/o células que tienen una elevada capacidad de diferenciación osteogénica bajo señales de inducción específicas ^{98,99}.

El potencial de diferenciación de las células hADSCs aisladas, se demostró mediante su capacidad de diferenciarse hacia tres linajes mesodérmicos (osteogénico, adipogénico y condrogénico) y un linaje endodérmico (miogénico).

EL mantenimiento de las células hADSCs con el medio de cultivo OM, el cual contiene factores inductores tales como dexametasona (DMS), glicerol 2 fosfato (Gly 2P) y ácido ascórbico, indujo la mineralización de la ECM de las células (ver Figura 39). Este fenómeno, unido al incremento en la actividad de la enzima ALP y la expresión de los genes ALP, ON, OC, demuestra la capacidad de diferenciación osteogénica de las células hADSCs aisladas. El papel de estos factores y la capacidad de diferenciación osteogénica se discute en párrafos posteriores.

El potencial de diferenciación adipogénico, se demostró con la formación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas tras 21 días de cultivo con el medio AM, el cual contenía los factores inductores IBMX, DMS, indometacina e insulina (ver Figura 40). La formación de lípidos y la detección de genes asociados a rutas de diferenciación adipogénica se ha descrito previamente por otros autores, empleando medios de cultivo con factores inductores a los utilizados en el presente trabajo ¹⁸¹⁻¹⁸⁴. Por otra parte, el potencial condrogénico se demostró tras detectar la presencia de proteoglicanos mediante la tinción de Azul Alcian (ver Figura 42), después de cultivar las células concentradas en un pellet y con un medio que contenía los factores inductores ácido ascórbico, ITS y TGF- β 1. Estos resultados apoyan los obtenidos previamente por Zuk y col. ⁹⁵, Danisovic y col. ¹⁸⁵ y Awad y col. ¹⁸⁶, quienes además reportan un incremento en la expresión de genes relacionados con el desarrollo de tejido cartilaginoso.

Finalmente, se demostró el potencial de diferenciación de las células hADSCs hacia músculo esquelético, empleando el medio de cultivo MM que contiene DMS e hidrocortisona (ver Figura 41). La presencia de células multinucleadas similares a miotubos, la expresión de la proteína MyoD (una proteína clave en el desarrollo del músculo esquelético), y la proteína MyHC (uno de los principales componentes del aparato contráctil del músculo estriado), son datos similares a los descritos por Zuk y col. ^{86,95}, y Mizuno y col. ¹⁸⁷.

Además del aislamiento de células madre de tejido adiposo humano (hADSCs), se realizó el aislamiento de células madre de tejido adiposo canino (cADSCs) a partir de 18 perros Beagles (ver sección 4.1). Dichas células serían empleadas posteriormente en estudios *in vivo* relacionados con la regeneración de defectos óseos mandibulares empleando células autólogas en perros Beagles.

Los estudios de caracterización de la población de células cADSCs mediante citometría flujo, revelaron que la expresión es negativa ($\leq 2\%$) para todos los antígenos ensayados con excepción del CD44 (ver Figura 44). Nosotros sugerimos que este resultado negativo se debe a los anticuerpos utilizados, puesto que no existe en el mercado anticuerpos para la detección del perfil de antígenos seleccionado que hayan sido probados en perro.

Si bien no pudimos demostrar que las células cADSCs aisladas tienen un perfil de células progenitoras mediante citometría de flujo al no disponer de anticuerpos contra las formas caninas de los marcadores CD evaluados, si se demostró su capacidad de diferenciarse hacia múltiples linajes tales como osteogénico (ver Figura 45), adipogénico (ver Figura 46), miogénico (ver Figura 47) y condrogénico (Figura 48). En todos los casos, los resultados son muy similares a los descritos para las células hADSCs. Estudios previos han descrito el aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales a partir de adiposo de animales tales como rata, ratón, conejo, cerdo y perro ^{72,188}. Particularmente, el aislamiento de células cADSCs de tejido sub-cutáneo canino fue descrito por primera vez por Neupane y col. ¹⁸⁹. Las describe como una población de células similar a fibroblastos, que pueden ser mantenidas en cultivo durante largos períodos de tiempo con una baja tasa de senescencia y que expresan los marcadores OCT4, NANOG y SOX2 asociados con células madre. Según sus resultados, las células cADSCs tienen una proliferación más lenta que las células hADSCs y muestran dificultades en diferenciarse hacia los linajes osteogénico y adipogénico en ausencia de un recubrimiento de la superficie del plástico con laminina ¹⁸⁹. Por el contrario, Vieira y col. ¹⁹⁰, reportan la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de las células cADSCs, empleando medios de cultivo que contienen factores inductores específicos de cada linaje sin requerir ningún tipo de recubrimiento de la placa de cultivo. Nuestros resultados coinciden con los descritos por Viera y col. ¹⁹⁰ respecto a las condiciones y la capacidad de diferenciación a diversos linajes de las células cADSCs. Asimismo, difieren en parte con lo encontrado por Neupane y col. ¹⁸⁹, ya que en nuestro caso la tasa de proliferación de las células cADSCs es superior a la encontrada en las células hADSCs. Teniendo en cuenta que las células cADSCs son fáciles de aislar, tienen una elevada velocidad de proliferación en cultivo y bajo condiciones de inducción se diferencian a múltiples linajes, podemos deducir que son un buen modelo para estudios de interacción células-biomaterial.

5.2 Capacidad de diferenciación osteogénica de células hADSCs y cADSCs

Antes de evaluar la respuesta de las hADSCs y cADSCs frente a materiales cerámicos diseñados con la finalidad de reparar tejido óseo, consideramos importante evaluar la capacidad de diferenciación osteogénica de ambos tipos celulares y compararla con la de dos modelos celulares (MCT3T3 y hFOB 1.19) ampliamente utilizados para evaluar biocompatibilidad y Osteoinductividad de diversos biomateriales ¹⁶⁷⁻¹⁷¹.

La diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre mesenquimales (MSCs), requiere de la presencia de tres componentes básicos: 1) la presencia de colágeno tipo I como principal proteínas en la matriz mineralizada del tejido óseo, 2) la disponibilidad de fosfato y 3) la ausencia de inhibidores de la mineralización ¹⁹¹. En esta tesis, la diferenciación osteogénica de las células hADSCs y cADSCs se indujo mediante su cultivo en un medio que contenía los factores inductores DMS, ácido Ascórbico y Gly 2P (medio OM). Tanto el ácido ascórbico como DMS, inducen sobreexpresión de colágeno en diferentes tipos celulares, por lo que representan los factores inductores de la producción de esta proteína ¹⁹²⁻¹⁹⁵. Por su parte, el Gly-2P es la fuente de fosfato requerido también para la mineralización de la matriz ¹⁹⁶. Pese a que estos factores químicos son suficientes para la inducción de la diferenciación osteogénica, otros componentes tales como factores de crecimiento o citoquinas también son utilizados con este fin.

Las condiciones de diferenciación *in vitro* hacia el linaje osteogénico de las líneas MC3T3 y hFOB. 1.19 son muy diferentes a las descritas previamente para las células hADSCs y cADSCs. En el caso de la línea de osteoblastos murinos MC3T3, las células tienen un perfil preosteoblástico y únicamente la presencia de ácido ascórbico en el medio de cultivo induce su diferenciación hacia un fenotipo de osteoblasto maduro. Por otra parte, los osteoblastos embrionarios humanos (hFOB. 1.19), son una línea inmortalizada que expresa un antígeno sensible a la temperatura (SV40 T). De esta forma las células muestran altas tasas de proliferación a una temperatura de 33.5 °C, mientras que a temperaturas restrictivas de 39 °C la tasa de proliferación disminuye y se induce su diferenciación hacia un fenotipo de fibroblasto maduro.

En la sección 4.2 se muestran de forma comparativa los resultados obtenidos tras inducción de la diferenciación osteogénica de las células hADSCs, cADSCs, MCT3T3 y hFOB 1.19. A día 14, las células hADSCs, cADSCs y hFOB 1.19 sometidas a condiciones de diferenciación osteogénica, ya exhiben una matriz mineralizada revelada mediante la tinción Rojo de Alizarina (ver Figura 49). Además la actividad de la enzima ALP es superior respecto a las células cultivadas bajo condiciones de proliferación (ver Figura 50). A pesar de que en las células MC3T3 no exhibieron una matriz mineralizada, la actividad de la enzima ALP es muy elevada, presentando valores similares a los cuantificados en la línea hFOB 1.19 y

significativamente mayores a los encontrados en las células hADSCs y cADSCs. Tomando en cuenta que la enzima ALP está involucrada directamente en el proceso de calcificación de la ECM durante fases tempranas de la diferenciación osteogénica ^{197,198}, este resultado no es el esperado. Sin embargo, previamente se ha reportado, que en algunos tipos celulares el incremento de la actividad ALP no siempre es proporcional a los niveles de mineralización detectados ¹⁹⁹.

A día 21, los cuatro tipos celulares mantenidos bajo condiciones de diferenciación, exhiben mineralización de la ECM. La actividad de la enzima ALP y la expresión de los genes osteogénicos ALP, ON y OC son significativamente superiores respecto a día 14 en las células hADSCs, cADSCs y hFOB 1.19 (ver Figura 49, Figura 50 y Tabla 24). Por el contrario en las MC3T3 disminuyó drásticamente la actividad de la enzima ALP, aunque la expresión de los genes ALP, ON y OC es ligeramente superior o no muestra diferencias significativas. Comparando todos los tratamientos, los máximos valores de actividad se cuantificaron en las células hADSCs y hFOB 1.19.

Es importante destacar que en la Tabla 24, se indican los datos de expresión de los marcadores ALP, ON y OC como una tasa de variación de la expresión genética entre las células cultivadas bajo condiciones de diferenciación respecto a las cultivadas en condiciones de diferenciación. Esto se realizó para comparar más fácilmente los datos, pues los valores basales de expresión varían significativamente en función de los tipos celulares, encontrándose los niveles más elevados en las líneas MC3T3 y hFOB 1.19. Además de las diferencias inherentes al tipo celular, esto puede ser debido a que estas dos líneas de por sí ya tienen un fenotipo preosteoblástico; mientras que las hADSCs y cADSCs tienen un fenotipo inicial que es de células madre progenitoras y requieren diferenciarse primero a preosteoblastos y posteriormente a osteoblastos, tal como se indicó en la sección 1.4 (ver Figura 16).

Nuestros resultados sugieren que tanto las células hADSCs como las cADSCs, exhiben señales claras de diferenciación osteogénica *in vitro*, incluyendo mineralización de la ECM, actividad de la enzima ALP y la expresión de genes involucrados en las rutas de diferenciación osteogénicas tales como ALP, ON y OC. Estos resultados coinciden con los reportados previamente por otros autores e indican el alto potencial osteogénico éstas células ^{86,95,200,201}. Adicionalmente estos datos son comparativos con los encontrados en líneas ampliamente utilizadas para la evaluación de biomateriales en el campo de la ingeniería de tejidos del hueso como las MC3T3 y hFOB 1.19. Esto implica las células ADSCs además de ser un tipo celular con gran potencial en el campo de la ingeniería de tejidos del hueso, también es útil como modelo celular en la evaluación de biomateriales.

5.3 Biocompatibilidad del biomaterial KeraOs®

La evaluación de ventajas y posibles efectos adversos de un nuevo material como KeraOs® (KO), requiere la realización de una serie de ensayos biocompatibilidad *in vitro* empleando una línea celular conocida (por ejemplo fibroblastos), tal como lo establece la norma ISO 10993-5⁶⁴. Si bien esta norma establece los parámetros generales para la valoración de la compatibilidad y citotoxicidad, los protocolos y técnicas utilizadas con este propósito dependen de cada investigador.

Técnicas ampliamente utilizadas en la evaluación de la respuesta celular en modelos 2D, han sido aplicadas para la evaluación de la biocompatibilidad de materiales 3D. Algunos ejemplos que pueden citarse son el test MTT²⁰²⁻²⁰⁴, test WST-1®^{205,206}, la liberación de lactato deshidrogenasa^{29,207}, Incorporación de BrdU^{206,208,209}, el ensayo de Alamar Blue®^{210,211} y el ensayo de proliferación CyQUANT²¹². Si bien estas técnicas han sido ampliamente utilizadas, algunos autores reportan que la ausencia de un protocolo sistemático de técnicas adaptadas a la aplicación de matrices 3D, en muchos casos genera la obtención de resultados que no son coherentes¹⁵. Este hecho sumado al elevado precio de la producción de matrices 3D cuando están en fase de prueba, limita en gran medida la aplicación de diversas técnicas que permitan obtener información clara, precisa y que aporte una medida veraz y reproducible de la respuesta celular como modo de evaluación de la biocompatibilidad de uno o más materiales. Así pues la estandarización y selección de técnicas es un aspecto esencial, especialmente cuando se realiza la mencionada evaluación a nivel industrial, ya que en este ámbito el ahorro de material, dinero y tiempo juega un papel crucial.

En el presente trabajo, hemos diseñado dos nuevas metodologías para el trabajo con biomateriales en formato de disco y granulado (ver secciones 3.5.2.1 y 3.5.2.2). Estas metodologías junto con la técnica Alamar Blue® (AB), permite una cuantificación eficiente y altamente reproducible del porcentaje de células que se adhieren al material y el seguimiento de la proliferación a lo largo del tiempo. La principal ventaja de estas metodologías, es que a diferencia de lo reportado en otros trabajos^{33,213,214}, desde el inicio se separan las células adheridas de las no adheridas al material, evitando así la sobre-estimación del número de células presentes en el material debido a la cuantificación de células no adheridas al material y que quedan adheridas al plástico del pocillo en la placa de cultivo.

Tras ensayar diferentes condiciones, se establecieron los parámetros óptimos de densidad celular de siembra (ver Figura 51) y de la relación del volumen de acondicionamiento/ volumen de siembra (ver Figura 52), con lo que se consiguió la estandarización de la metodología del cultivo celular sobre discos KOd, la adaptación del método al trabajo sobre granulados y finalmente la evaluación de la biocompatibilidad del material KO en ambos formatos.

La biocompatibilidad, es la capacidad que tiene el material de inducir las respuestas celulares y funcionales deseadas ⁴². Uno de los principales criterios de la biocompatibilidad, es que el contacto directo e indirecto con el material no debe ser tóxico para las células. En este sentido, en el presente trabajo evaluamos la citotoxicidad directa e indirecta del material KOd empleando como modelo celular fibroblastos dérmicos humanos (HDF). Nuestros resultados mostraron, que las células son capaces de adherirse y proliferar sobre el biomaterial KOd, aunque su tasa de proliferación es inferior a la cuantificada sobre plástico (ver Figura 53). Éste fenómeno, se ha reportado previamente, asociándose a una mayor dificultad en los procesos de adhesión y *spreading* celular a causa de las características de la superficie porosa del material ²¹³. En ningún caso, el mencionado fenómeno implica toxicidad celular. Asimismo, la aplicación de productos de degradación del material (extractos suaves y severos) no induce toxicidad en las células (ver Figura 54).

Considerando que el material KO estaba en desarrollo y por ende no teníamos referencias bibliográficas previas, se comparó la respuesta de las células HDF sobre el granulado KO respecto a la de los materiales comerciales Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC) y Cerasorb® (CS) empleando la misma metodología de trabajo. Nuestros datos indicaron que la respuesta de los fibroblastos sobre los tres materiales cerámicos de origen sintético (BC, CS y KO) es similar, mientras que sobre el material de origen natural BO tanto la adhesión como la proliferación es inferior respecto a los otros tres materiales (ver Figura 59 y Figura 60). Nuestros resultados, coinciden con los reportados por Tamai y col. ²¹⁵, quienes demuestran que fibroblastos murinos, son capaces de adherirse y proliferar sobre materiales cerámicos de fosfato de calcio de diferente naturaleza tales como β -TCP, HA y HA/ β -TCP. Asimismo, apoyan los obtenidos por Kauschke y col. ²¹³, quienes evalúan la respuesta de fibroblastos humanos y de ratón sobre dos materiales granulados (NanoBone® y BC), demostrando que ambos tipos celulares se adhieren y proliferan sobre los dos materiales sin cuantificar diferencias significativas entre sí. Además tras 28 días de cultivo observan una gran red celular cubriendo la superficie del material. Chouteau y col. ²¹⁶, también reportan que fibroblastos y osteoblastos son capaces de proliferar y colonizar las crestas y poros de la superficie de un material de fosfato cálcico en formato de disco.

Basados en nuestros resultados y los datos publicados por otros autores, podemos afirmar que el material KO es biocompatible.

Además de los estudios de toxicidad, la evaluación de la biocompatibilidad de materiales diseñados para la regeneración de tejido óseo, involucra el estudio de la respuesta celular en función de la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica empleando líneas primarias de osteoblastos (por ejemplo las hFOB 1.10 o las MC3T3) o células madre mesenquimales.

5.4 Respuesta de células hADSCs frente a materiales cerámicos

En este estudio, se evaluó la biocompatibilidad y diferenciación osteogénica de células hADSCs sobre los materiales Bio-Oss® (BO), Bone Ceramic® (BC), Cerasorb® (CS) y KeraOs® (KOD y KO) utilizando medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM). Nuestros resultados revelaron que la adhesión celular, proliferación y diferenciación osteogénica varía de acuerdo al biomaterial utilizado, observándose un perfil de expresión genético específico inducido por cada tipo de material.

Es conocido, que el microambiente tridimensional proporcionado por los biomateriales, induce una respuesta celular *in vitro* que difiere de la generada en ambientes bidimensionales. Particularmente en las células hADSCs, ha sido descrito que los ambientes tridimensionales inducen una variación del patrón de expresión de genes asociados a rutas de diferenciación osteogénica y angiogénica ¹³¹. Propiedades físico-química de los materiales tales como composición, topografía, porosidad e interconectividad proveen un ambiente 3D para la colonización y organización de las células, teniendo esto un papel crítico en la respuesta celular ¹⁴⁰. En este contexto, se ha descrito que los materiales deben ser biodegradables, osteo-inductivos, osteoconductoros y promover la adhesión, proliferación y diferenciación celular ²¹⁷.

En primer lugar, nosotros evaluamos la respuesta de las células hADSCs frente al material KO en formato de disco, el cual fue suministrado por la empresa Keramat para facilitar los estudios iniciales de estandarización de la metodología y evaluación de la respuesta celular (ver sección 4.5.1). Adicionalmente, evaluamos el efecto del recubrimiento del disco KOD con fibronectina, sin embargo, este punto será discutido más adelante (ver sección 5.5). Las células hADSCs fueron capaces de adherirse y proliferar sobre el biomaterial KO en ambos medios de cultivo PM y OM, aunque en este último la proliferación fue más lenta, lo cual puede estar relacionado al proceso de diferenciación. Adicionalmente, el material indujo un incremento en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) y la expresión de marcadores característicos de las rutas de diferenciación osteogénica tales como la ALP, la osteonectina (ON) y la osteocalcina (OC), respecto a las células cultivadas en plástico.

Es importante destacar que, aunque la actividad de la enzima ALP y la expresión de los marcadores genéticos son superiores en el medio de cultivo OM, el biomaterial es capaz de inducir la diferenciación osteogénica de las células en el medio PM, es decir en un medio libre de factores adicionales a los aportados por el FBS. Este fenómeno también fue descrito por Liu y col. ¹⁰, quienes comparaban la respuesta *in vitro* de células hADSCs cultivadas sobre discos de akermanite y β -TCP. En su trabajo, cuantifican un ligero incremento de la expresión de los genes Runx-2, ALP, OC y COL1 al emplear el medio PM tras 10 días de cultivo. Por su parte Marino y col. ¹⁴⁶, tras evaluar la diferenciación

osteogénica de células hADSCs sobre discos de β -TCP, concluyen que el biomaterial de β -TCP solo es capaz de inducir la diferenciación de las células hacia un fenotipo osteoblástico, aunque reportan que la expresión de proteínas tales como la ALP, OC y OP tienen un retraso cuando las células se cultivan en el medio PM respecto al medio OM. Resultados similares se han descrito tras evaluar la interacción de células BM-MSCs con discos de HA y BCP^{141,218}. Aunque poco se conoce como los materiales de fosfato de calcio inducen la diferenciación osteogénica de células mesenquimales, algunos autores han reportado que los iones Ca^{2+} y P inorgánico liberados por el material favorecen la diferenciación y mineralización de la matriz de osteoblastos, mediante la activación del receptor sensor de calcio²¹⁹⁻²²¹.

Tal como se ha mencionado previamente, el material KO fue suministrado en los formatos de disco y granulado. La biocompatibilidad y diferenciación osteogénica de las células hADSCs fue valorada en ambos materiales y existen algunas diferencias en la respuesta celular frente a ambos. Por ejemplo, el porcentaje de adhesión al disco fue de 56 %, mientras que sobre el granulado fue del 66 %. Dichas diferencias, se atribuyen principalmente a la variación en la forma y topografía de ambos materiales, a pesar de que su composición química es la misma. Sin embargo, en el presente trabajo no estamos interesados en comparar las respuestas frente diferentes formatos de un mismo material, ya que el formato disco fue suministrado para facilitar la manipulación y el trabajo de estandarización, valoración de la biocompatibilidad con fibroblastos y la evaluación de la respuesta de las células hADSCs.

Una vez valorada la respuesta de las células hADSCs sobre los discos KOd, se procedió a la evaluación y comparación de la respuesta de éstas células sobre los granulados BO, BC, CS y KO. En este punto, es importante recordar la naturaleza química de los granulados evaluados para comprender la discusión y la comparación de nuestros resultados con la de otros autores:

- BO —————> material de origen natural derivado de hueso bovino deproteínizado
- BC —————> material sintético de Hidroxiapatita (HA)
- CS y KO —————> materiales sintéticos de fosfato tricálcico (β -TCP)

Nuestros resultados indicaron que las células hADSCs se adhieren y proliferan sobre los granulados BC, CS y KO en los medios de cultivo proliferativo (PM) y osteogénico (OM), aunque en este último la proliferación fue más lenta, lo que puede estar asociado con el proceso de diferenciación. Es de destacar, los mayores porcentajes de adhesión y de células metabólicamente activas tras 21 días de cultivo se encontraron en los granulados KO y BC. Por el contrario, sobre el granulado BO el porcentaje de adhesión fue muy bajo y las células no proliferan a lo largo del tiempo de estudio (ver Figura 67). Este resultado difiere en parte con el obtenido empleando los fibroblastos HDF (ver Figura 59), puesto que en ese caso a pesar de un bajo porcentaje de adhesión, las células proliferaron, aunque con una tasa

menor a la registrada sobre el resto de los materiales. Datos similares a los obtenidos con las células hADSCs en presente trabajo, han sido publicados previamente por Handschel y col.²¹², encontrando que los niveles de proliferación de células madre mesenquimales embrionarias son bajos sobre el material BO, respecto a los cuantificados sobre otros materiales cerámicos y poliméricos. En otro estudio, Riechert y col.²²², empleando una línea celular de osteoblastos humanos cultivados sobre diferentes biomateriales, determinaron que el número de células presentes en los materiales en orden decreciente es el siguiente: Bioresorb® (β -TCP), NanoBone® ($\text{SiO}_2 + \text{HA}$), BC, CS, BONIT®matrix ($\text{SiO}_2 + \text{HA} + \beta$ -TCP), BO. Estos datos coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, donde tras 21 días de cultivo, el mayor número de células metabólicamente activas fue encontrado en KO y BC, seguido por CS y finalmente BO (ver Figura 67 y Figura 68).

Paradójicamente, varios trabajos muestran las aplicaciones clínicas del material BO como material de implante en defectos periodontales tales como la elevación del seno maxilar, cresta alveolar y reparación del esqueleto maxilo-facial. De hecho, este material de origen natural, es considerado uno de los materiales de referencia en los procedimientos que involucran la implantación de injertos óseos sintéticos²²³⁻²²⁸. Estudios *in vitro* muestran, que células madre derivadas de sangre periférica y la línea de osteoblastos MG-63, son capaces de expresar marcadores de diferenciación osteogénica sobre BO^{229,230}.

Como era de esperar, debido a las diferencias físico-químicas de los biomateriales analizados, cada material indujo un patrón específico de expresión de genes asociados a procesos de diferenciación osteogénica en las células hADSCs. Datos similares han sido publicados por otros autores en experimentos con células pre-diferenciadas de sangre de cordón umbilical humano cultivadas sobre los biomateriales CS, Cerasorb M® (nueva generación del material CS), RESORBA® (material de colágeno) e ICBM (matriz ósea bovina con colágeno insoluble)²³¹. Interesantes trabajos han demostrado que las proteínas osteogénicas secretadas por células mesenquimales cultivadas en ambientes tridimensionales, tales como OC y BSP-1, se unen a los biomateriales y modulan la respuesta de las células²³². Esta unión o absorción selectiva de proteínas, depende en gran medida de la naturaleza química y la superficie de los materiales⁶², lo cual podría explicar en parte la diferencia en los perfiles de respuesta de las células hADSCs sobre los biomateriales evaluados.

Los datos obtenidos revelan, que los mayores porcentajes de adhesión y de células metabólicamente activas a tiempo final se encuentran en los granulados KO y BC (ver Tabla 26, Figura 67 y Figura 68). Además, estos dos materiales inducen patrones similares de expresión de los marcadores ALP y OC (Figura 70 A y C). Por otra parte, los mayores niveles de actividad ALP y de expresión génica de ON, son inducidos por el material KO tras 14 y 21 días de cultivo (ver Figura 69 y Figura 70 B). Este conjunto de

resultados sugieren, que la mejor biocompatibilidad e inducción del proceso de diferenciación osteogénico fue conseguido en KO, seguido por BC y finalmente CS.

Dada la similitud en la composición química, tamaño y porosidad de los materiales KO y CS; era de esperar que la respuesta de las células hADSCs fuera parecida en ambos materiales. Sin embargo, nuestros datos muestran diferencias significativas en la adhesión, proliferación y expresión de marcadores osteogénicos. Estas diferencias en la respuesta celular pueden explicarse en parte debido a características específicas de los materiales tales como micro-estructura, textura, superficie, forma, entre otros ^{224,233}. De hecho, el aspecto morfológico de ambos materiales al ser observados mediante microscopía electrónica de barrido, es muy diferente (Figura 68 F y H).

Cómo la célula “siente” las propiedades estructurales del material dependerá en gran medida de la macro y micro-estructura de dicho material. Por ejemplo, cuando el tamaño del poro excede en gran medida el tamaño de la célula, el sustrato es plano o ligeramente curvado, por lo tanto las células se adhieren a éste sustrato de una manera similar al cuando lo hacen en superficies 2D (plástico) ²³⁴. Así, los mecanismos de mecano-transducción y el grado de diferenciación puede ser similar en ambos sustratos. Por el contrario, cuando los poros son más pequeños que la célula, estas realmente se encuentran en un ambiente 3D donde las zonas de adhesión son diferenciales. En este sentido, la estructura intrínseca del material creada por los poros, genera patrones de curvatura específicas en las células que se adhieren al material en distintas dimensiones. Así, se crean patrones de tensión específicas sobre el citoesqueleto celular que finalmente se traducen en la activación de cascadas de señalización que dan origen a procesos de diferenciación ²³⁵⁻²³⁷ (ver Figura 93). Por lo tanto, independientemente de que la composición química de los materiales KO y CS sea similar, la respuesta celular puede variar en función de las interacciones físicas, las cuales están condicionadas por el patrón estructural del material.

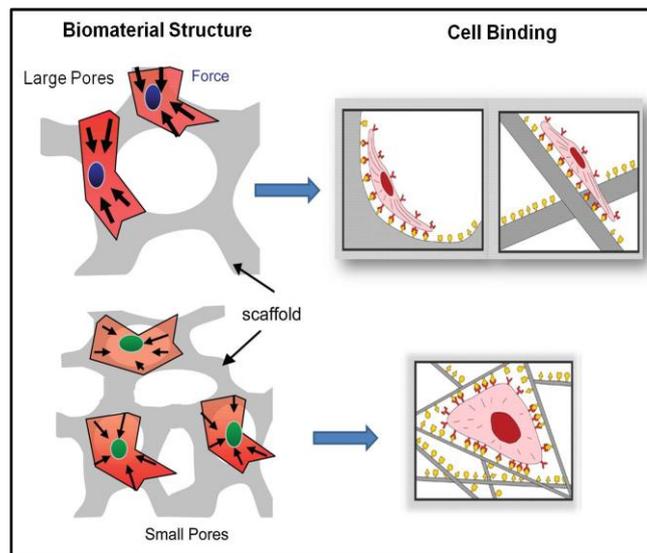


Figura 93. Estructura de los biomateriales y su influencia sobre adhesión celular, *spreading* y fuerzas de tensión. Modificado de Reilly y col.²³⁸ y Stevens y col.²³⁴.

Otro punto fundamental a tener en cuenta, es la adhesión de las células al biomaterial induce la síntesis de proteínas tales como el colágeno, fibronectina, laminina, elastina, entre otras; generando así su propia ECM. Estas proteínas de matriz, modifican y determinan las nuevas interacciones células-matriz y célula-célula, lo que introduce una variable adicional a la interacción inicial de las células con el biomaterial y que son determinantes en la inducción del proceso de diferenciación en células madre mesenquimales²³⁸. Es decir, que el destino de las células mesenquimales está determinado dentro de los primeros días de la interacción célula-material mediante el proceso de adhesión, y con el tiempo la producción de ECM puede ser una variable crítica en la modulación y dirección del proceso de diferenciación²³⁹. Esta información sugiere, que la similitud en la adhesión y producción de ECM, han podido ser factores claves en la inducción de respuestas celulares parecidas entre los granulados KO y BC, a pesar de tener composiciones químicas diferentes.

De acuerdo a nuestros resultados y la información encontrada en la literatura, las células hADSCs son capaces de adherirse y proliferar sobre los granulados BC, CS y KO, aunque no sobre BO. Asimismo, son capaces de inducir la diferenciación osteogénica de las células inclusive en ausencia de factores inductores específicos en el medio de cultivo. Sin embargo, la respuesta osteogénica es incrementada en presencia de factores estimuladores tales como dexametasona, glicerol 2-fosfato y ácido ascórbico. Estos datos soportan la noción de que el ambiente tridimensional y los factores solubles juegan un papel fundamental en la creación de un microambiente bioquímico y mecánico que puede conducir la diferenciación de células mesenquimales hacia un tipo celular específico⁴.

A pesar de que se han publicado algunos estudios *in vitro* e *in vivo* que utilizan los biomateriales BC, CS y BO; nuevos estudios empleando células hADSCs combinadas con materiales cerámicos de fosfato de calcio, serán necesarios para entender el proceso de osteogénesis en éstas células y comparar su respuesta y utilidad en el campo de la ingeniería de tejidos. Además resultará interesante, seguir realizando pruebas con el granulado KO, el cual ha resultado ser un biomaterial con alta biocompatibilidad y capacidad de inducción de respuesta osteogénica en las células hADSCs.

5.5 Efecto del recubrimiento de la superficie del material KeraOs® sobre la biocompatibilidad y diferenciación osteogénica de células hADSCs.

La adhesión inicial de las células al biomaterial, es una de las fases críticas en la creación de un constructo células- biomaterial con potencial uso en la ingeniería de tejidos del hueso. En este campo de trabajo, la búsqueda de estrategias para incrementar la adhesión de células al material es uno de los principales retos, siendo el recubrimiento de superficies con proteínas de matriz extracelular (ECM) una de las posibles alternativas. La principal razón, es que las células dependientes de anclaje no solo se unen a sustratos físicos tales como el plástico o un biomaterial, sino también a proteínas. Procesos celulares tales como *spreading*, proliferación y la activación de rutas de diferenciación, están influenciadas por la adhesión de las células a las proteínas de ECM mediante integrinas^{240,241}. En este sentido, la ECM no solo provee un soporte estructural para las células, sino que también modula la fisiología y el fenotipo mediante señales bioquímicas (ver Figura 94).

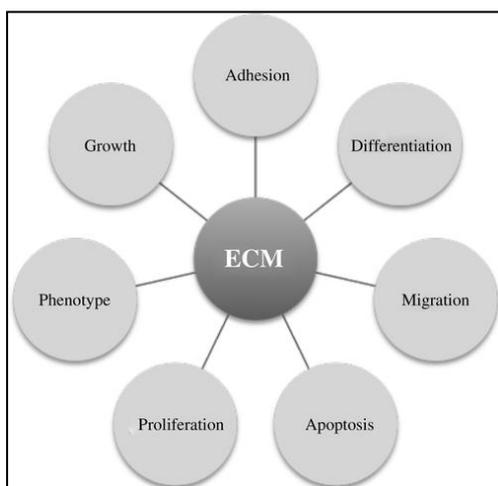


Figura 94. Procesos celulares que pueden ser influenciados por la matriz extracelular (ECM). Obtenido de Hidalgo-Bastidas y Cartmell⁶².

Aunque la modificación de la superficie de materiales con proteínas de EMC se ha demostrado para mejorar la adhesión, la respuesta celular depende en gran medida de la composición físico-química del biomaterial y el tipo celular utilizado²⁴²⁻²⁴⁶. De manera que, la selección del tipo de proteína y la

concentración aplicada para la realización del recubrimiento, varía en función del material y tipo celular de interés. En este sentido, hemos evaluado inicialmente el efecto del recubrimiento del material KOD con fibronectina (FN), colágeno (COL), albúmina (HSA) y plasma AB (P), sobre la adhesión y proliferación de fibroblastos (HDF). Nuestros resultados mostraron, que el único recubrimiento que incrementó significativamente tanto la adhesión como la proliferación fue la FN (ver Figura 55). Teniendo en cuenta este resultado, seleccionamos esta proteína y posteriormente evaluamos la respuesta de las células hADSCs. Los datos indicaron, que el recubrimiento con FN también incrementaba el porcentaje de adhesión estas células al disco, aunque no influyen en la proliferación celular (ver Tabla 25 y Figura 61).

La FN y el COL, son dos de las proteínas de ECM más utilizadas para la modificación de superficies, debido a que están presentes en cantidades elevadas en diversos tejidos. El incremento de la adhesión celular en superficies de distinta naturaleza recubiertas con FN ha sido demostrada en varios tipos celulares ²⁴⁷⁻²⁵⁰. En una revisión bibliográfica Hidalgo-Bastidas y Cartmell ⁶² mencionan, que en la mayoría de los estudios de adhesión donde se compara la respuesta de células madre mesenquimales (MSCs) frente a diferentes tipos de recubrimientos, la FN es la que induce la mayor adhesión, lo que se atribuye a que esta proteína es reconocida al menos por 20 tipos diferentes de integrinas (ver Figura 95). La mayoría de los estudios citados en esta revisión, han sido realizados con células mesenquimales provenientes de la médula ósea (BM-MSCs) ^{9,251,252}.

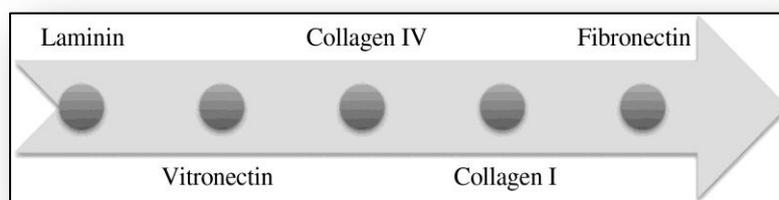


Figura 95. Afinidad de las células madre mesenquimales (MSCs) por las proteínas de matriz extracelular (ECM). La dirección de la flecha indica los mejores resultados de adhesión, cuando las superficies son modificadas con esas proteínas. Obtenido de Hidalgo-Bastidas y Cartmell ⁶².

En otro trabajo Li y col. ⁶¹, encontraron que el recubrimiento de biomateriales de fosfato de calcio bifásico (HA/ β -TCP) con FN y COL, induce un incremento en la adhesión y proliferación de células hADSCs respecto al disco sin recubrir, sin embargo, no reportan diferencias significativas en la respuesta celular inducida por ambos recubrimientos. Estos datos difieren de los encontrados en el presente trabajo, donde claramente la FN o la combinación de FN/COL, incrementan la adhesión tanto en discos KOD (ver Tabla 25) como en granulados KO (ver Tabla 27); mientras que el COL no muestra diferencias

significativas respecto al disco sin recubrir. Asimismo, en ningún caso los recubrimientos inducen diferencias significativas sobre la proliferación de células hADSCs.

Además de influencia de los recubrimientos de la superficie del granulado KO con FN, COL y la combinación FN/COL sobre la adhesión y proliferación, se realizó la evaluación de la respuesta osteogénica de las células hADSCs. Respecto al material sin recubrir, los tres tipos de recubrimiento indujeron un incremento en la producción de ECM calcificada (ver Figura 71), en la actividad de la enzima ALP (ver

Figura 73) y la sobreexpresión de un conjunto importante de genes involucrados en las rutas de diferenciación osteogénicas que fueron cuantificados mediante qPCR-array (ver Figura 74 y Tabla 28). Sin embargo, la respuesta de diferenciación más potente fue inducida por el recubrimiento con FN. Este dato resulta curioso y relevante, dado que algunos autores han descrito que, a diferencia del COL²⁵³⁻²⁵⁵, la FN es una proteína que induce una elevada adhesión en células MSCs, pero que tiene una influencia mínima en el proceso de inducción de diferenciación osteogénica^{62,256,257}.

A diferencia de estos autores, Martino y col.²⁵², demostraron que el recubrimiento de superficies con FN o con fragmentos recombinantes de la proteína (FN III0-10), inducen la expresión de genes tales como ALP, RUNX-2, BSP y OC en las células BM-MSCs. Además sugieren que la integrina $\alpha 5\beta 1$ (receptor de reconocimiento en la superficie celular específico de la FN) tiene un papel fundamental en el proceso de diferenciación. En esta misma dirección, Hamidouche y col.²⁵⁸ mediante un análisis transcriptómico demostraron que las células BM-MSCs bajo condiciones de diferenciación osteogénica, sobreexpresan la subunidad $\alpha 5$ de la integrina y que su inhibición mediante un shRNA disminuye considerablemente la expresión de marcadores osteogénicos. Adicionalmente realizan un análisis molecular, determinando que la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 5$ incrementa significativamente el potencial osteogénico de éstas células, mediante la activación de rutas de señalización tales como ERK1/2-MAPk y PI3K. Si bien, en el presente trabajo no estudiamos los mecanismos moleculares de inducción y diferenciación osteogénica, demostramos que la subunidad $\alpha 5$ de la integrina está sobreexpresada en las células hADSCs cultivadas sobre los granulados KO y que los máximos valores de expresión son inducidos sobre el material recubierto con FN (ver Figura 76). Todos los datos descritos, unidos a los publicados por otros autores^{9,137,252,258-261}, sugieren que existe una correlación entre los mecanismos de adhesión y diferenciación osteogénica en células madre hADSCs. Asimismo, que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría ser una de las moléculas involucradas el incremento de la respuesta osteogénica de las células hADSCs sobre el material recubierto con FN, respecto al material solo o recubierto con COL. Resultados similares también fueron descritos por Moursi y col.⁶⁰, demostrando que la FN regula la diferenciación osteogénica de osteoblastos embrionarios de rata.

La cuantificación y análisis de la expresión genética mediante qPCR-array de las células hADSCs cultivadas sobre los granulados KO recubiertos con FN, COL y la combinación FN/COL, evidenció la sobreexpresión de numerosos genes tales como BMP1, BMP2, BMP4, Runx2, SMAD1, ALP, OC (BGLAB) y COL1A1, respecto al material sin recubrir (ver Figura 74 y Tabla 28). Dichos genes codifican la expresión de moléculas de señalización y proteínas que han sido previamente descritas como marcadores y/o inductores del proceso de diferenciación osteogénico en células MSCs y osteoblastos tanto *in vitro* como *in vivo* ^{66,123,254,255,262-268}. Particularmente, las moléculas morfogenéticas del hueso (BMPs) 1, 2, 4 y 7 estimulan y activan los factores de transcripción Runx-2 y Osterix, que a su vez inducen la transcripción de genes expresados en fases tempranas (ALP, COL, ON, BSP) y tardías (OCN, OP) de la diferenciación osteoblástica ^{118,269}. Un ejemplo de la capacidad inductora de las BMPs se evidencia en un reciente trabajo publicado por Overman y col. ²⁷⁰, demostrando que la incubación durante 15 minutos con BMP-2 de células hADSCs crecidas sobre granulados de β -TCP (similar a KO) y BCP, es capaz de incrementar la expresión de los genes ALP, RUNX-2, COL y OC. Asimismo, Park y col. ²⁷¹, demostraron previamente que el cultivo de células BM-MSCs sobre microesferas de un biomaterial de ácido poli-láctico que incorpora BMP-2 y el fragmento de unión Arg-Gly-Asp (RGD; sitio de reconocimiento de las integrinas a ciertas proteínas de ECM), induce la diferenciación de las células hacia linaje osteoblástico. Es de destacar que en este último trabajo, los datos demuestran que este fragmento RGD (presente en la FN y el COL) es capaz de inducir una respuesta osteogénica, superior a la del material sin RGD y similar a la inducida por la proteína BMP-2 al ser añadida al medio de cultivo. Sin embargo, en conjunto (RGD + BMP-2) potencian el efecto. Este resultado, es comparable con el obtenido en el presente trabajo donde el recubrimiento del material KO recubierto con FN o COL en ausencia de factores inductores en el medio de cultivo (medio PM), incrementa el efecto de inducción que ya tiene el granulado KO sobre las hADSCs, alcanzando valores de expresión similares a los encontrados sobre el granulado KO con medio OM. Sin embargo, en conjunto (recubrimiento con FN, COL o FN/COL + medio OM) potencian el efecto de diferenciación.

Por otra parte, en el presente trabajo los datos del array arrojaron que inhibidores del proceso de diferenciación osteogénica mediante la ruta de BMPs tales como BMP3 y TWIST están sub-expresados.

Tal como se mencionó en la sección 1.4, además de la ruta de las BMPs, otras rutas asociadas al TGF- β han sido involucradas en la proliferación de células progenitoras y producción de factores tempranos de la diferenciación ¹²⁸. En el qPCR-array, se evaluó la expresión de TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 y sus receptores; sin embargo, únicamente las células cultivadas con el medio OM incrementaron significativamente la expresión de estos tres factores. Además, ninguno de los tres recubrimientos tuvo un efecto adicional al inducido por el medio de cultivo en esta ruta. Este resultado puede sugerir que

tras 21 días de cultivo, la principal ruta de diferenciación activada por los recubrimientos es la de las BMPs, ya que también detectamos un incremento en la mineralización de la matriz, la actividad ALP y expresión genética de marcadores osteogénicos, cuando las células han sido mantenidas en medio PM con recubrimiento respecto al disco sin recubrir.

Finalmente, destacar que uno de los genes con mayor índice de expresión del conjunto de genes evaluados en el array, fue el colágeno tipo XII (COL12A1). Los tres recubrimientos, inducen un incremento significativo respecto al granulado KO sin recubrir en ambos medios de cultivo (PM y OM). Aunque no es considerado un marcador de diferenciación osteogénica y su función no está bien definida, se han demostrado altos niveles de expresión de mRNA de esta proteína en el periostium (sitio de formación activa de hueso) ²⁷². Además, en un estudio reciente Iza y col. ²⁷³, demostraron que ratones “knock-out” para COL12A1 (COL12A1 -/-), exhiben anomalías en el esqueleto respecto a ratones control, tales como disminución del tamaño del fémur, reducción de la densidad ósea, desorganización de la estructura del tejido, alteración de la relación osteoblastos/osteocitos y disminución de la estructura polarizada de las células. Asimismo a nivel *in vitro* demuestran, que los osteoblastos provenientes del ratón COL12A1 -/-, no exhiben diferencias significativas en la expresión de marcadores tempranos de la diferenciación tales como Runx-2 o COL, pero sí una disminución significativa de marcadores tardíos tales como OC y OPN, una alteración de la comunicación célula-célula a través de uniones GAP, y una variación en la composición y organización de la ECM. Sus resultados sugieren una implicación directa del COL12A1 en el proceso de diferenciación osteogénica, por lo que resulta interesante que el recubrimiento con COL, FN y la combinación FN/COL induzcan un incremento importante en la expresión de esta proteína.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el recubrimiento con FN del biomaterial KO, no solo incrementa el porcentaje de adhesión celular, sino que induce una potente respuesta de diferenciación osteogénica en células hADSCs, siendo inclusive superior a la inducida por el recubrimiento con COL. Una mayor producción de matriz mineralizada, incremento de la actividad de la enzima ALP y la expresión de un mayor número de genes asociados a rutas de diferenciación osteogénica de células hADSCs así lo demuestran.

5.6 Cocultivo de células hADSCs y HUVEC: diferenciación osteogénica y formación de estructuras capilares

El mantenimiento, restauración y formación de nuevo hueso, requiere la comunicación entre los vasos sanguíneos y células formadoras de hueso (MSCs y osteoblastos). La osteogénesis, es un proceso complejo que está influenciado por condiciones fisiológicas, interacciones célula-célula, formación de una ECM especializada y la formación e invasión de vasos sanguíneos^{23,274-276}. Tras la implantación de un constructo células-biomaterial, la inducción de la vascularización es necesaria para la supervivencia de las células osteogénicas localizadas en el centro del biomaterial, donde la llegada de componentes esenciales tales como el oxígeno y factores de crecimiento, entre otros, es muy limitada²⁷⁷. Además la formación de una red capilar alrededor del implante, permite la liberación de un conjunto de factores proangiogénicos y proosteogénicos por parte de las células endoteliales, que influyen directamente en los procesos de osteogénesis y angiogénesis¹⁴⁸. En este sentido, resultaría evidente que la adición de células vasculares, podría proporcionar ventajas adicionales para la inducción de osteogénesis, respecto al cultivo de osteoblastos o células MSCs solas sobre un biomaterial.

Hemos evaluado la interacción de células madre mesenquimales derivadas de tejidos adiposo (hADSCs) con células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y su influencia en los procesos de inducción de osteogénesis y angiogénesis *in vitro*. Tras 7 días del cocultivo de células hADSCs y células HUVEC sobre plástico, se formó una red de estructuras tipo capilares (ver Figura 77). El marcaje con el anticuerpo CD31 reveló, que dicha red está formada únicamente por células endoteliales (ver Figura 78). Adicionalmente, un elevado porcentaje de células hADSCs migran, localizándose alrededor de las mencionadas estructuras y expresando el marcador actina de músculo liso alfa (α -SMA), el cual es característico de células musculares lisas o pericitos (ver Figura 79)²⁷⁸. Esto sugiere, que las células hADSCs pueden estar actuando como estabilizadoras de las estructuras capilares formadas por las células HUVEC, pues expresan un fenotipo perivascular o de células murales. Resultados similares han sido descritos por otros autores empleando células MSCs y endoteliales aisladas de diversas fuentes^{177,279-282}. Particularmente Merfeld-Clauss y col.¹⁵⁶, demostraron que además de expresar el marcador α -SMA, las células hADSCs que migran y se localizan alrededor de las redes vasculares muestran un aumento en la producción de proteínas de ECM características de la membrana basal de los vasos sanguíneos tales como colágeno tipo IV, laminina y fibronectina. En su trabajo, también reportan que, aunque los factores solubles liberados por las células hADSCs tienen un papel importante (efecto paracrino), la formación de redes vasculares estables depende en gran medida del contacto directo de ambos tipos celulares y su interacción bidireccional. Si bien en el presente trabajo no demostramos este fenómeno mediante el cocultivo en dispositivos transwell (donde no hay contacto directo entre las

células) o aplicando medios condicionados de células hADSCs sobre células HUVEC; si demostramos el fenómeno de formación de capilares depende de la presencia de las células hADSCs, ya que el cocultivo de células HUVEC con fibroblastos no induce el fenómeno descrito (Figura 82).

Al evaluar marcadores involucrados en procesos de diferenciación osteogénica y angiogénica, obtuvimos diferentes patrones en función del medio de cultivo utilizado. El cocultivo de células hADSCs con células HUVEC mantenido con medio osteogénico (medio OM), incrementó significativamente los marcadores ALP, ON y OC, respecto a la condición de monocultivo de células hADSCs (ver Figura 83). Es decir que las células HUVEC, incrementan el potencial osteogénico de las células hADSCs. Sin embargo, la expresión de marcadores angiogénicos en los cocultivos mantenidos con el medio OM fue muy baja, lo que se corresponde con una ausencia de formación de estructuras capilares al emplear este medio de cultivo (ver Figura 84). Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Pedersen y col.¹⁵⁴, quienes reportaron que la utilización de condiciones de estimulación osteogénica (medio OM) en cocultivos de células BM-MSCs con HUVEC, incrementa el crecimiento y maduración de redes microcapilares; y la sobreexpresión de marcadores endoteliales tales como angiopoietina 1 (Ang-1), angiopoietina 2 (Ang-2) y el factor de Von Willebrand (vWF).

La capacidad de las células HUVEC de incrementar el potencial osteogénico de las células hADSCs, también quedó evidenciado en nuestros resultados, al encontrar que el cocultivo de estos dos tipos celulares en un medio libre de factores osteogénicos y angiogénicos adicionales a los aportados por el FBS (medio EBM-2); cuantificamos una sobreexpresión de los marcadores de osteogénesis ALP, ON y OC. Datos similares han sido reportados por Wang y col.²⁸³, quienes empleando los mismos tipos celulares, reportaron un incremento en la expresión de ALP, Runx2, ON y OC, respecto a las células ADSCs cultivadas en condición de monocultivo. Asimismo, demostraron que las células HUVEC secretan BMP-2 al medio de cultivo, relacionando la presencia de este factor con el incremento de la osteogénesis en la condición de cocultivo. Xue y col.¹⁵³, reportaron una respuesta similar al cocultivar células BM-MSCs con células HUVEC, encontrando un incremento significativo en la expresión de ALP. Mientras que Kaigler y col.²⁸⁴, determinaron que células endoteliales de la microvasculatura dérmica humana (HDMECs), incrementan el potencial osteogénico de células BM-MSCs tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los cocultivos mantenidos con medio EBM-2, también sobreexpresan los marcadores angiogénicos VEGF, VE-Cad, α -SMA y Ang-1 (ver Figura 83), lo que se corresponde con la formación de redes capilares observadas mediante microscopía de fluorescencia. Esto sugiere que las células hADSCs, también tienen un papel en la inducción de diferenciación de las células HUVEC hacia un fenotipo vascular, lo cual ha sido atribuido previamente a la liberación de citoquinas y factores proangiogénicos (por ejemplo VEGF)

por parte de las células mesenquimales^{158,285}. La función del VEGF y sus receptores en la angiogénesis y formación de vasos ha sido ampliamente investigado²⁸⁶, y se considera un factor necesario para la formación de redes vasculares^{287,288}. Las células hADSCs producen cantidades elevadas de este factor^{104,289–291}, lo que puede contribuir significativamente tanto a la osteogénesis como a la formación de estructuras capilares *in vitro*²⁹². Por otra parte la Ang-1, ha sido descrita como un mediador de la maduración vascular, teniendo un papel importante en el reclutamiento de células peri-vasculares y el mantenimiento de las interacciones célula-matriz^{293,294}. Algunos autores sostienen que la formación inicial de estructuras vasculares es inducida por VEGF promoviendo la migración, proliferación y el brote de las células endoteliales, mientras que la Ang-1 contribuye a la formación de un vaso funcional^{295,296}. Por otra parte, la VE-Cad es una proteína de adhesión transmembrana característica de las células endoteliales. Es responsable de la unión célula-célula y está implicada en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. El bloqueo con anticuerpos anti VE-Cad inhibe la formación de estructuras capilares *in vitro*²⁹⁷, de manera que la sobreexpresión de este marcador es un dato importante dentro de nuestros resultados.

Al evaluar la respuesta celular de los cocultivos mantenidos con un medio que contiene numerosos factores requeridos para el cultivo y proliferación de células endoteliales tales como VEGF, IGF, heparina, entre otros (medio EGM-2, ver tabla Tabla 11), se obtuvo una respuesta osteogénica similar a la inducida por el medio basal EBM-2, pero una respuesta angiogénica más potente. La magnitud de expresión de los marcadores VEGF, VE-Cad, α -SMA y Ang-1, fue significativamente superior en el medio EGM-2 respecto a la obtenida al emplear los medios OM y EBM-2 (ver Figura 83), lo cual era de esperar conocida la capacidad de inducción angiogénica de estos factores^{298–300}.

El recubrimiento del plástico con FN, además de incrementar el potencial osteogénico de las células hADSCs crecidas en cocultivo con las HUVEC con los tres medios de cultivo (OM, EBM-2 y EGM-2), indujo un incremento significativo en la magnitud de expresión de los marcadores angiogénicos en los medios EBM-2 y EGM-2, respecto al plástico sin recubrir. Es decir, que la FN potencia el efecto osteogénico y angiogénico de las células y los medios de cultivo empleados.

En la última década han sido numerosos los trabajos publicados, en los que se evalúa la respuesta osteogénica y/o angiogénica de células MSCs u osteoblastos en cocultivo con células endoteliales sobre matrices tridimensionales de distinta naturaleza, tanto *in vitro* como *in vivo*^{301–309}. Sin embargo, muy pocos se han centrado en evaluar dichas respuestas sobre biomateriales de fosfato cálcico (particularmente los de β -TCP). En el presente trabajo, se evaluó la respuesta de cocultivos de hADSCs con HUVEC sobre el biomaterial KOD (discos), obteniéndose un comportamiento similar al descrito

previamente sobre plástico. Se observó la formación estructuras tipo capilares en los cocultivos mantenidos con los medios EBM-2 y EGM-2, y un incremento en la expresión de genes osteogénicos y angiogénicos respecto a las células crecidas en condiciones de monocultivo sobre el biomaterial (ver Figura 85 y Figura 86). El recubrimiento con FN, incrementó la cantidad de estructuras capilares formadas, así como la magnitud de expresión de todos los genes evaluados. A diferencia de lo observado en plástico, en los cocultivos sobre el biomaterial con medio OM, se detectó la formación de algunos capilares. Además, el recubrimiento con FN, incrementó significativamente la formación de dichos capilares y la expresión del gen VEGF-2, lo que evidencia la importancia de este factor. Unger y col.³¹⁰, cocultivaron osteoblastos con células endoteliales de micro-vasculatura dérmica (HDMEC) sobre materiales porosos de β -TCP. Al evaluar la respuesta morfológica tras 28 días de cultivo, reportaron la formación de estructuras tipo capilares similares a las encontradas en nuestro trabajo. En un trabajo reciente bajo, este mismo contexto, Kang y col.³¹¹ evaluaron la respuesta osteogénica y angiogénica de células BM-MSCs y HUVEC en monocultivo y cocultivo sobre discos de β -TCP, empleando un método de cultivo similar al utilizado en nuestro trabajo. En concordancia con nuestros resultados, reportan que el cocultivo de células BM-MSCs con HUVEC induce un incremento de la expresión de los genes osteogénicos tales como ALP, ON, OC, BSP y Runx 2, la formación de estructuras tipo capilares y un incremento del marcador angiogénico DC31 respecto las células en condición de monocultivo.

En nuestros resultados reportamos que el cocultivo de células hADSCs con HUVEC sobre biomaterial KOd, si bien se forman estructuras tipo capilares, no se llega a formar una red capilar tal como la observada sobre plástico. Únicamente sobre el disco recubierto con FN y con los medios EBM-2 y EGM-2, se observó la formación de pequeñas estructuras circulares formando un lumen central (ver Figura 85). La capacidad de las células HUVEC para formar estas estructuras tipo redes vasculares con un lumen central puede depender las propiedades de la ECM, ya que se ha demostrado que las mismas afectan la capacidad de migración de este tipo celular. En este sentido, podemos sugerir que el recubrimiento del material con FN además de favorecer la diferenciación osteogénica de las células hADSCs, también favorece la migración y formación de estructuras capilares de las HUVEC. Cooper y Sefton³¹², encontraron que el recubrimiento con FN de un material basado en colágeno, incrementó significativamente la supervivencia células HUVEC y formación de vasos sanguíneos *in vivo*. Por otra parte Kang y col.³¹³, reportaron que la matriz descelularizada derivada de células HUVEC sobre un biomaterial de β -TCP, incrementa la diferenciación osteogénica de células BM-MSCs. Es de destacar que una de las principales proteínas constituyentes de la ECM secretada por las HUVEC es la FN.

Nuestros datos sugieren que las células HUVEC incrementan el potencial osteogénico de las células hADSCs tanto en plástico como en el biomaterial KeraOs (KOd). Asimismo las células hADSCs, soportan e

inducen la formación de estructuras tipo capilares por parte de las células HUVEC. Además, el recubrimiento de la superficie con FN favorece ambos procesos. Por lo tanto, el cocultivo de estos dos tipos celulares sobre un biomaterial de β -TCP recubierto con FN, puede resultar una estrategia interesante para la creación de un constructo células-biomaterial con fines en la reparación de daños óseos en la ingeniería de tejidos. Asimismo, es un modelo de cultivo tridimensional que puede resultar muy útil en la evaluación de la interacción de múltiples tipos celulares involucrados en los procesos de reparación ósea, pues el biomaterial KOd provee un microambiente adecuado para la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

5.7 Efecto del biomaterial KO combinado FN y células madre mesenquimales autólogas derivadas de tejido adiposo canino (cADSCs), sobre la regeneración ósea en perros Beagle

Una de las principales aplicaciones de la ingeniería de tejidos, es la reconstrucción de huesos cráneo y maxilofaciales. El modelo canino (particularmente los perros Beagles), es uno de los modelos animales más utilizados en la evaluación de la biocompatibilidad y capacidad regenerativa de biomateriales o constructos células-biomaterial *in vivo*³¹⁴.

Los resultados obtenidos hasta el momento a nivel *in vitro*, sugirieron que el material cerámico KeraOs[®] en formato de disco y granulado (KOd y KO), es biocompatible e induce la diferenciación osteoblástica de células hADSCs. Además el recubrimiento del biomaterial con FN, potencia la respuesta osteogénica de las mencionadas células. En este sentido, nos resultó interesante evaluar la respuesta *in vivo* sobre la regeneración de defectos óseos mandibulares en perros Beagles, empleando un constructo células-biomaterial que combina el material granulado KO recubierto con FN y células madre autólogas derivadas de tejido adiposo canino.

Tal como discutimos previamente (ver secciones 5.1 y 5.2), demostramos que las células cADSCs aisladas tienen la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes, y particularmente tienen un alto potencial osteogénico cuando son cultivadas en plástico y mantenidas con un medio de cultivo osteoinductor (medio OM). Al evaluar la respuesta de las células cADSCs sobre discos y granulados KO, obtuvimos resultados muy similares a los encontrados con las células hADSCs. Las células son capaces de adherirse, proliferar (ver Figura 87 y Figura 88), y diferenciarse sobre el material hacia un fenotipo osteoblástico, mostrando una elevada actividad de la enzima ALP (ver Figura 90) y la sobre-expresando marcadores ALP, ON y OC (Figura 91). El recubrimiento con FN, además de incrementar la adhesión, la actividad ALP y la sobreexpresión de los genes evaluados, indujo cambios morfológicos importantes en las células

cADSCs, formándose estructuras tipo nódulos que se distribuyen por toda la superficie (ver Figura 89). Resultados similares han sido reportados previamente con células madre derivadas de la médula ósea canina³¹⁵ y células madre embrionarias³¹⁶.

Conocidos estos resultados, se procedió realizar el experimento *in vivo*. Para llevar a cabo el estudio se utilizaron 18 perros adultos de raza Beagle, a los que se le crearon 4 defectos óseos mandibulares que fueron rellenados de manera aleatoria con alguno de los siguientes tratamientos: a) ningún tipo de implante (control), b) el granulado KO, c) el material KO recubierto con FN (KOFN), d) el granulado KOFN con células cADSCs autólogas. Nuestro principal trabajo fue el recubrimiento del material, la creación del constructo células-biomaterial (cADSCs-KO) y el seguimiento de las células a lo largo de todo el procedimiento para verificar la correcta adhesión, su viabilidad y proliferación. En todos los casos la creación del implante fue exitosa y la manipulación del constructo no afectó la viabilidad celular.

Hasta el momento no se ha culminado el procesamiento y análisis radiológico e histológico de las muestras provenientes de las mandíbulas de los perros tratados. De manera que no podemos aún sacar conclusiones en este sentido. Algunos datos preliminares sugieren que el recubrimiento con FN incrementa significativamente la regeneración del tejido óseo respecto al material sin recubrir. Sin embargo, es necesario el análisis completo de las muestras y la verificación del papel de las células cADSCs en el proceso de regeneración.

A pesar de no tener aún estos resultados, es importante destacar que otros autores han evaluado el efecto de células cADSCs autólogas y alogénicas sembradas sobre biomateriales de diversa naturaleza en la reconstrucción de defectos craneo y maxilofaciales en perros Beagles. Los resultados son diversos y muy variables en función del biomaterial utilizado, aunque en la mayoría de los casos se ha demostrado que las células cADSCs tienen un alto potencial regenerativo³¹⁷⁻³²⁰.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

- Las células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo humano (hADSCs), expresan marcadores característicos de células progenitoras y se diferencian hacia linajes osteogénico, adipogénico, condrogénico y miogénico.
- Las células mesenquimales humanas son útiles como modelo celular en la evaluación de biomateriales, ya que exhiben señales de diferenciación osteogénica *in vitro* similares a la de otras líneas (MC3T3 y hFOB 1.19) ampliamente utilizadas en el campo de ingeniería de tejidos.
- Las metodologías diseñadas para el cultivo celular sobre biomateriales, permiten una cuantificación eficiente y reproducible del porcentaje de células que se adhieren específicamente al material, así como el seguimiento de su proliferación.
- El biomaterial KeraOs® es biocompatible según los parámetros definidos en la ISO 10993-5. El material, no induce toxicidad sobre fibroblastos dérmicos humanos. De las proteínas de recubrimiento evaluadas, solo la fibronectina incrementó el porcentaje de adhesión de los fibroblastos.
- Las células hADSCs se adhieren, proliferan y se diferencian hacia un fenotipo osteoblástico sobre los granulados Bone Ceramic®, Cerasorb® y KeraOs®, aunque no sobre Bio-Oss®. Cada material induce una respuesta osteogénica que muestra un perfil particular en la actividad de la enzima ALP y la expresión de los genes ALP, ON y OC. Dichas respuestas son máximas en presencia de dexametasona, glicerol 2 fosfato y ácido ascórbico en el medio de cultivo, pero incluso en ausencia de estos factores también los materiales son capaces de inducir una respuesta significativa.
- El recubrimiento con fibronectina incrementa el porcentaje de adhesión de células hADSCs sobre el biomaterial KeraOs® e induce una respuesta de diferenciación osteogénica muy superior a la inducida por colágeno. Respecto al material sin recubrir, ambas proteínas aumentan la producción de matriz mineralizada, la actividad de la enzima ALP y la expresión de un mayor número de genes asociados a rutas de diferenciación osteogénica tales como BMP1, BMP2, BMP4, BMP6, Runx2, SMAD1, ALP, COL XII, COL1, entre otros.
- El cocultivo de células hADSCs y endoteliales tanto en plástico como en el biomaterial KeraOs®, incrementa el potencial osteogénico de las células hADSCs. En condiciones de cocultivo, las células endoteliales forman estructuras tipo capilar y expresan marcadores angiogénicos tales como VEGF, VE-Cad, α -SMA y Ang-1.

- Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo canino (cADSCs) se adhieren, proliferan y se diferencian en cultivo hacia un fenotipo osteoblástico evidenciando la utilidad de estas células como modelo para el estudio de regeneración ósea *in vitro* e *in vivo*. Al igual que para las células mesenquimales humanas, el recubrimiento del material KeraOs® con y sin FN favorece los procesos de adhesión y diferenciación de este tipo celular.

7. REFERENCIAS

1. Langer, R. & Vacanti, J. Tissue engineering. *Science (80-.)*. **260**, 920–926 (1993).
2. Naderi, H., Matin, M. M. & Bahrami, A. R. Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J. Biomater. Appl.* **26**, 383–417 (2011).
3. Seong, J. M. *et al.* Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **5**, 062001 (2010).
4. Discher, D., Mooney, D. & Zandstra, P. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science (80-.)*. **324**, 1673–1677 (2009).
5. Ringe, J. & Sittinger, M. Tissue engineering in the rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 211 (2009).
6. Jean, J., Lapointe, M., Soucy, J. & Pouliot, R. Development of an *in vitro* psoriatic skin model by tissue engineering. *J. Dermatol. Sci.* **53**, 19–25 (2009).
7. Elliott, N. & Yuan, F. A Review of Three-Dimensional *In Vitro* Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. *J Pharm Sci* **100**, 2–8 (2011).
8. Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D. & Steimberg, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* **4**, 13–22 (2009).
9. Zhang, Y., Xiang, Q., Dong, S., Li, C. & Zhou, Y. Fabrication and characterization of a recombinant fibronectin/cadherin bio-inspired ceramic surface and its influence on adhesion and ossification *in vitro*. *Acta Biomater.* **6**, 776–785 (2010).
10. Liu, Q. *et al.* A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and beta-TCP ceramics. *Biomaterials* **29**, 4792–4799 (2008).
11. Shen, F. *et al.* Osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells treated with GDF-5 cultured on a novel three-dimensional sintered microsphere matrix. *spine J.* **6**, 615–623 (2006).
12. Burdick, J. & Vunjak-Novakovic, G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng. Part A* **15**, 205–219 (2009).
13. Yamada, K. & Cukierman, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* **130**, 601–610 (2007).
14. Abbott, A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* **424**, 870–872 (2003).
15. Lee, J., Cuddihy, M. & Kotov, N. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng. Part B Rev.* **14**, 61–86 (2008).
16. 3DCellculture. at <<http://3dcellculture.com/Home>>
17. LeGeros, R. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. Rev.* **108**, 4742–4753 (2008).
18. Jayakumar, P. & Di Silvio, L. Osteoblasts in bone tissue engineering. *J. Eng. Med.* **224**, 1415–1440 (2010).
19. Freemont, A. Basic bone cell biology. *Int J Exp Pathol* **74**, 411–416 (1993).
20. Bringhurst, R., Demay, M., Krane, S. & Kronenberg, H. in *Harrison Principios Med. Interna* (Fauci, A. *et al.*) 2365–2376 (McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V., 2009).
21. Haynesworth, S., Goldberg, V. & Caplan, A. in *Musculoskelet. Soft-Tissue Aging Impact Mobil.* (Buckwalter, J., Goldberg, V. & Woo, S.) 80–86 (1994).
22. Dimitriou, R., Tsiridis, E. & Giannoudis, V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* **36**, 1392–1404 (2005).
23. Al-Aql, Z., Alagl, A., Graves, D., Gerstenfeld, L. & Einhorn, T. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *J. Dent. Res.* **87**, 107–118 (2008).

24. Deschaseaux, F., Sensébé, L. & Heymann, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol. Med.* **15**, 417–429 (2009).
25. Tsou, I. & Chng, H. The Bone and Joint Decade 2000-2010 : For Prevention and Treatment of Musculoskeletal Disease. *Ann Acad Med Singapore* **31**, 2000–2001 (2010).
26. Klein, R. Understanding the burden of musculoskeletal conditions. *BMJ* **322**, 1079–1080 (2001).
27. Woolf, A. *et al.* Musculoskeletal pain in Europe: its impact and a comparison of population and medical perceptions of treatment in eight European countries. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 342–347 (2004).
28. Picavet, H. & Hazes, J. Prevalence of self reported musculoskeletal diseases is high. *Ann Rheum Dis.* **62**, 644–651 (2003).
29. Cerroni, L. *et al.* Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an *in vitro* study. *Biomol. Eng.* **19**, 119–124 (2002).
30. Brodie, J., Goldie, E., Connel, G., Merry, J. & Grant, M. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. *J. Biomed. Mater. Res. A* **73**, 409–421 (2005).
31. Habibovic, P. & Groot, K. De. Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **1**, 25–32 (2007).
32. Neumann, M. & Epple, M. Composites of Calcium Phosphate and Polymers as Bone Substitution Materials. *Eur. J. Trauma* **32**, 125–131 (2006).
33. Gürpınar, A. & Onur, A. *In Vitro* Investigation of Cell Compatibility of pure B-TCP Granules. *Bioact. Compat. Polym.* **20**, 183–196 (2005).
34. Hohlfeld, J. *et al.* Tissue engineered fetal skin constructs for paediatric burns. *Lancet* **366**, 840–842 (2005).
35. Deutsch, H. High-dose bone morphogenetic protein-induced ectopic abdomen bone growth. *spine J.* **10**, 1–4 (2010).
36. Smith, D., Cooper, G., Mooney, M., Marra, K. & Losee, J. Bone morphogenetic protein 2 therapy for craniofacial surgery. *J Craniofac Surg.* **19**, 1244–1259 (2008).
37. Carragee, E., Hurwitz, E. & Weiner, B. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *spine J.* **11**, 471–491 (2011).
38. Bianco, P. & Robey, P. Stem cells in tissue engineering. *Nature* **414**, 118–121 (2001).
39. Chatterjea, A., Meijer, G., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int.* **2010**, 215–225 (2010).
40. Cancedda, R., Giannoni, P. & Mastrogiacomo, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* **28**, 4240–4250 (2007).
41. Peter, X. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 184–198 (2008).
42. Lee, J., Cuddihy, M. J. & Kotov, N. a. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **14**, 61–86 (2008).
43. Hannink, G. & Arts, J. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury* **42 Suppl 2**, 8–11 (2011).
44. Hench, L. . Biomaterials. *Science (80-.)*. **208**, 826–831 (1980).
45. Ohgushi, H. & Caplan, A. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 913–927 (1999).

46. Hench, L. & Polak, J. Third-generation biomedical materials. *Science (80-.)*. **295**, 1014–1017 (2002).
47. Place, E., Evans, N. & Stevens, M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat. Mater.* **8**, 457–470 (2009).
48. Vallet-Regí, M. & Salinas, A. . in *Bone Repair Biomater.* (Planell, J. .) 194–230 (Woodhead Publishing Limited, 2009).
49. Stevens, M. Biomaterials for bone Materials that enhance bone regeneration have a wealth of potential. *Materialstoday* **11**, 18–25 (2008).
50. Dorozhkin, S. Calcium orthophosphates Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomatter* **1**, 121–164 (2011).
51. Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art. *J. Funct. Biomater.* **1**, 22–107 (2010).
52. Karageorgiou, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474–5491 (2005).
53. Sánchez-Salcedo, S., Arcos, D. & Vallet-Regí, M. Upgrading calcium phosphate scaffolds for tissue engineering applications. *Key Eng. Mater.* **377**, 19–42 (2008).
54. Dorozhkin, S. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* **31**, 1465–1485 (2010).
55. Hing, K. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2**, 184–199 (2005).
56. Sundelacruz, S. & Kaplan, D. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 646–655 (2009).
57. Blokhuis, T. *et al.* Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. *J. Trauma* **48**, 179–186 (2000).
58. Torres, J. *et al.* in *Implant Dent.* (Turkyilmaz, P. I.) 91–108 (InTech, 2011). doi:10.5772/964
59. Chai, C. & Leong, K. Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Mol. Ther.* **15**, 467–480 (2007).
60. Moursi, A. *et al.* Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J. Cell Sci.* **109**, 1369–1380 (1996).
61. Li, X., Yao, J., Yang, X., Tian, W. & Liu, L. Surface modification with fibronectin or collagen to improve the cell adhesion. *Appl. Surf. Sci.* **255**, 459–461 (2008).
62. Hidalgo-Bastida, L. & Cartmell, S. Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **16**, 405–412 (2010).
63. Bumgardner, J. *et al.* in *Encycl. Biomater. Biomed. Eng.* (Bowlin, G. & Wnek, G.) 169–178 (2004). doi:10.1081/E-EBBE-120007261
64. Bollen, L. & Svendsen, O. Medical devices and diagnostic industry. *Regul. Guidel. Biocompat. Saf. Test.* **11** (1997). at <<http://www.mddionline.com/article/regulatory-guidelines-biocompatibility-safety-testing>>
65. Svendsen, O., Garthoff, B., Spielmann, H., Hensten-Pettersen, A. & Jensen, J. *Alternatives to the animal testing of medical devices.* (1996). at <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/archive-publications/publication/WorkshopReport17.pdf>
66. Cai, X., Su, X., Li, G., Wang, J. & Lin, Y. in *Osteogenesis* (Yunfeng, L.) 135–152 (InTech Europe, 2012). at <<http://www.intechopen.com/books/osteogenesis/osteogenesis-of-adipose-derived-stem-cells>>
67. Orbay, H., Tobita, M. & Mizuno, H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int.* 461718 (2012). doi:10.1155/2012/461718

68. Kisiel, A. *et al.* Isolation, characterization, and *in vitro* proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *Am. J. Vet. Res.* **73**, 1305–1317 (2012).
69. Tan, S., Ahmad, T., Selvaratnam, L. & Kamarul, T. Isolation, characterization and the multi-lineage differentiation potential of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Anat.* **222**, 437–450 (2013).
70. Zhang, L. & Chan, C. Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs. *J. Vis. Exp.* **22**, 2–5 (2010).
71. Khatri, M., O'Brien, T. & Sharma, J. Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells Dev.* **18**, 1485–1492 (2009).
72. Arrigoni, E., Lopa, S., De Girolamo, L., Stanco, D. & Brini, A. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res.* **338**, 401–411 (2009).
73. Vats, A., Tolley, N., Polak, J. & Buttery, L. Stem cells: sources and applications. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **27**, 227–232 (2002).
74. Singer, N. G. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 457–478 (2011).
75. Dezawa, M. *et al.* Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. **113**, 1701–1710 (2004).
76. Snykers, S., De Kock, J., Rogiers, V. & Vanhaecke, T. *In vitro* differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells* **27**, 577–605 (2009).
77. Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S. & Dezawa, M. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **59**, 369–378 (2011).
78. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
79. Mosna, F., Sensebé, L. & Krampera, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev.* **19**, 1449–1470 (2010).
80. Gimble, J., Katz, A. & Bunnell, B. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* **100**, 1249–1260 (2007).
81. Adas, G. *et al.* Mesenchymal stem cells improve the healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). *Langenbecks Arch Surg.* **396**, 115–126 (2011).
82. Dezawa, M. *et al.* Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science (80-)*. **309**, 314–317 (2005).
83. Wang, Z. *et al.* Efficacy of Bone Marrow – Derived Stem Cells in. *Tissue Eng.* **12**, 1753–1763 (2006).
84. Kawaguchi, H. *et al.* Enhancement of Periodontal Tissue Regeneration by Transplantation of Bone. *J Periodont* **75**, 1281–1287 (2004).
85. Ide, C. *et al.* Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. *Brain Res.* **1332**, 32–47 (2010).
86. Zuk, P. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228 (2001).
87. De Ugarte, D. *et al.* Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells Tissues Organs* **174**, 101–109 (2003).

88. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. & Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**, 1294–12301 (2006).
89. Lin, C. *et al.* Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol. Histopathol.* **25**, 807–815 (2010).
90. Ong, W. & Sugii, S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1083–1086 (2013).
91. Baer, P. & Geiger, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* **2012**, (2012).
92. Ong, W. & Sugii, S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1083–1086 (2013).
93. Oedayrajsingh-Varma, M. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* **8**, 166–177 (2006).
94. Levi, B. *et al.* In vivo directed differentiation of pluripotent stem cells for skeletal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 20379–20384 (2012).
95. Zuk, P. *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
96. Mitchell, J. *et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* **24**, 376–385 (2006).
97. Varma, M. *et al.* Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* **16**, 91–104 (2007).
98. Montoro, D. *et al.* CD90 (Thy-1)-Positive Selection Enhances Osteogenic Capacity of Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Tissue Eng. Part A* **19**, 1–9 (2013).
99. Hosoya, A., Hiraga, T. & Ninomiya, T. Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol* **137**, 733–742 (2012).
100. Lindroos, B., Suuronen, R. & Miettinen, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* **7**, 269–291 (2011).
101. Gonzalez-Rey, E. *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells *in vitro* in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **69**, 241–248 (2010).
102. Salgado, A., Reis, R., Sousa, N. & Gimble, J. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **5**, 103–110 (2010).
103. Kilroy, G. *et al.* Cytokine Profile of Human Adipose-Derived Stem Cells : Expression of Angiogenic , Hematopoietic , and Pro-Inflammatory Factors. *J. Cell. Physiol.* **202**, 702–709 (2007).
104. Rehman, J. *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292–1298 (2004).
105. Matsuda, K. *et al.* Adipose-Derived Stem Cells Promote Angiogenesis and Tissue Formation for In Vivo Tissue Engineering. *TISSUE Eng. Part A* **19**, 1327–1335 (2013).
106. Wang, M., Crisostomo, P., Herring, C., Meldrum, K. & Meldrum, D. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF , HGF , and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **291**, 880–884 (2006).
107. Cai, L. *et al.* Human Adipose Tissue-Derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells.* **27**, 230–237 (2009).

108. Suga, H., Glotzbach, J., Sorkin, M., Longaker, M. & Gurtner, G. Paracrine Mechanism of Angiogenesis in Adipose-Derived Stem Cell Transplantation. *Ann Plast Surg* (2013).
109. Braddock, M., Houston, P., Campbell, C. & Ashcroft, P. Born again bone: Tissue engineering for bone repair. *News Physiol Sci* **16**, 208–213 (2001).
110. Favus, M. in *Bone Form. Maturation Funct. Act. osteoblast lineage cells* (Lian, J. ., Stein, G. . & Aubin, I. .) (2003).
111. Zamurovic, N. Transcriptional program of osteoblast differentiation. Coordinated activation of Notch, Wnt, and TGF- β signaling pathways in MC3T3 cell line. 173 (2005).
112. Bruder, S. & Scaduto, T. in *Bone Regen. Repair. Biol. Clin. Appl.* (Lieberman, J. & Friedlaender, G.) 80–92 (Humana Press Inc, 2005).
113. Levi, B. & Longaker, M. Adipose Derived Stromal Cells for Skeletal Regenerative Medicine. *Stem Cells* **29**, 576–582 (2011).
114. Bandyopadhyay, A. *et al.* Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* **2**, e216 (2006).
115. Wegman, F. *et al.* Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy *in vitro* and *in vivo*. *Eur. Cell. Mater.* **21**, 230–242 (2011).
116. McMahon, M. Bone Morphogenic Protein 3 Signaling in the Regulation of Osteogenesis. *Orthopedics* **35**, 920 (2012).
117. Heldin, C., Miyazono, K. & ten Dijke, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465–471 (1997).
118. Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- β superfamily and Runx proteins. *Oncogene* **23**, 4232–4237 (2004).
119. Lian, J. *et al.* Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* **7**, 1–16 (2006).
120. Nakashima, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17–29 (2002).
121. Nishio, Y. *et al.* Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* **372**, 62–70 (2006).
122. Song, B., Estrada, K. & Lyons, K. Smad Signaling in Skeletal Development and Regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 379–388 (2009).
123. Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. Bone morphogenetic proteins. *Growth factors Chur Switz.* **22**, 233–421 (2004).
124. Bialek, P. *et al.* A Twist Code Determines the Onset of Osteoblast Differentiation Bone Disease Program of Texas. *Dev. Cell* **6**, 423–435 (2004).
125. Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. & Kohei, M. Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. *Genes to Cells* **7**, 1191–1204 (2002).
126. Alliston, T., Choy, L., Ducky, P., Karsenty, A. & Derynck, R. TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* **20**, 2254–2272 (2001).
127. Maeda, S., Hayashi, M., Komiya, S., Imamura, T. & Miyazono, K. Endogenous TGF- β signaling suppresses. *EMBO J.* **23**, 552–563 (2004).
128. Derynck, R., Piek, E., Schneider, R., Choy, L. & Alliston, T. in *TGF- β Fam.* (Derynck, R. & Miyazono, K.) 613–666 (2008).
129. Franceschi, R. & Xiao, G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J. Cell. Biochem.* **88**, 446–454 (2003).

130. Shen, B. *et al.* The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells *in vitro*. *J. Cell. Biochem.* **109**, 406–416 (2010).
131. Huang, C. *et al.* Genetic markers of osteogenesis and angiogenesis are altered in processed lipoaspirate cells when cultured on three-dimensional scaffolds. *Plast. Reconstr. Surg.* **121**, 411–423 (2008).
132. García, A. Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* **26**, 7525–7529 (2005).
133. Simmons, C. *et al.* Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech* **36**, 1087–1096. (2006).
134. Carvalho, R., Kostenuik, P., Salih, E., Bumann, A. & Gerstenfeld, L. Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression. *Matrix Biol* **22**, 241–249 (2003).
135. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667–681 (2000).
136. Wade, R. & Burdick, J. Engineering ECM signals into biomaterials. *Mater. Today* **15**, 454–459 (2012).
137. Chastain, S., Kundu, A., Dhar, S., Calvert, J. & Putnam, A. Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation. *J Biomed Mater Res* **78**, 73–85 (2006).
138. Petite, H., Kacem, K. & Triffitt, J. Adhesion, growth and differentiation of human bone marrow stromal cells on non-porous calcium carbonate and plastic substrata: effects of dexamethasone and 1,25dihydroxyvitamin D3. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **7**, 665–671 (1996).
139. Toquet, J. *et al.* Osteogenic potential *in vitro* of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J. Biomed. Mater. Res.* **44**, 98–108 (1999).
140. Kasten, P. *et al.* Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an *in vitro* and *in vivo* study. *Acta Biomater.* **4**, 1904–1915 (2008).
141. Cordonnier, T. *et al.* 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **21**, 981–987 (2010).
142. Bernhardt, A., Lode, A., Peters, F. & Gelinsky, M. Optimization of culture conditions for osteogenically-induced mesenchymal stem cells in β -tricalcium phosphate ceramics with large interconnected channels. *J Tissue Eng Regen Med* **5**, 444–453 (2010).
143. Dennis, J., Haynesworth, S., Young, R. & Caplan, A. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant.* **1**, 23–32 (92AD).
144. Tsai, K. *et al.* Type I collagen promotes proliferation and osteogenesis of human mesenchymal stem cells via activation of ERK and Akt pathways. *J. Biomed. Mater. Res. A* **94**, 673–682 (2010).
145. Hattori, H. *et al.* Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **76**, 230–239 (2006).
146. Marino, G. *et al.* Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: *in vitro* study. *J Mater Sci Mater Med.* **21**, 353–363 (2010).
147. E, L.-L. *et al.* The interactions between rat-adipose-derived stromal cells, recombinant human bone morphogenetic protein-2, and beta-tricalcium phosphate play an important role in bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **16**, 2927–2940 (2010).
148. Grellier, M., Bordenave, L. & Amédée, J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **27**, 562–571 (2009).
149. Rouwkema, J., Rivron, N. & van Blitterswijk, C. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **26**, 434–441 (2008).

150. Rouwkema, J., de Boer, J. & Van Blitterswijk, C. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng.* **12**, 2685–2693 (2006).
151. Unger, R. *et al.* Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* **28**, 3965–3976 (2007).
152. Rivron, N., Liu, J., Rouwkema, J., de Boer, J. & van Blitterswijk, C. Engineering vascularised tissues *in vitro*. *Eur. Cell. Mater.* **15**, 27–40 (2008).
153. Xue, Y., Xing, Z., Hellem, S., Arvidson, K. & Mustafa, K. Endothelial cells influence the osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biomed. Eng. Online* **8**, 34 (2009).
154. Pedersen, T. *et al.* Osteogenic stimulatory conditions enhance growth and maturation of endothelial cell microvascular networks in culture with mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng.* **3**, (2012).
155. Jiang, B. & Brey, E. M. in *Regen. Med. Tissue Eng. Biomater.* (Eberli, D.) 477–502 (InTech Europe, 2003). at <<http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissueengineering->>
156. Merfeld-Clauss, S., Gollahalli, N., March, K. & Traktuev, D. Adipose Tissue Progenitor Cells Directly Interact with Endothelial Cells to Induce Vascular Network Formation. *Tissue Eng. Part A* **16**, 2953–2966 (2010).
157. Mayer, H. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J. Cell. Biochem.* **95**, 827–839 (2005).
158. Deckers, M. *et al.* Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* **143**, 1545–1553 (2002).
159. KERAMAT, S. L. Keramat. at <[>](http://keramat.es/products/dental/keraos/keraos-properties)
160. Martinez, A., Franco, J., Saiz, E. & Guitian, F. Maxillary sinus floor augmentation on humans: Packing simulations and 8 months histomorphometric comparative study of anorganic bone matrix and β -tricalcium phosphate particles as grafting materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **30**, 763–769 (2010).
161. Geistlich Pharma AG. Bio-Oss®. at <<http://www.bio-oss.com/>>
162. STRAUMANN. Bone Ceramic®. at <[>](http://www.straumann.us/en/professionals/products-and-solutions/regeneration-solutions/bone-grafts/BoneCeramic.html)
163. Curasan AG. Cerasorb®. at <[>](http://www.curasan.de/com/products/orthopedics/cerasorb/brief_description.php)
164. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. BLAST®. at <[>](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
165. Chen, X. D., Qian, H. Y., Neff, L., Satomura, K. & Horowitz, M. C. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *J. bone Miner. Res.* **14**, 362–375 (1999).
166. Lee, H., Chung, Y., Heo, S. & Kim, N. Augmentation of bone healing of nonunion fracture using stem cell based tissue engineering in a dog : a case report. *Vet. Med. (Praha)*. **4**, 198–203 (2009).
167. Popp, J., Laffin, K., Love, B. & Goldstein, A. *In vitro* evaluation of osteoblastic differentiation on amorphous calcium phosphate-decorated poly (lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Eng.* **5**, 780–789 (2011).
168. Pereira, C. *et al.* Human and mouse osteoprogenitor cells exhibit distinct patterns of osteogenesis in three-dimensional tissue engineering scaffolds. *Plast. Reconstr. Surg.* **124**, 1869–1879 (2009).
169. Ignatius, A. *et al.* Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials* **26**, 311–318 (2005).
170. Ponader, S. *et al.* *In vitro* response of hFOB cells to pamidronate modified sodium silicate coated cellulose scaffolds. *Colloids Surf B Biointerfaces* **64**, 275–283 (2008).

171. Vasilescu, C. *et al.* Synthesis, mechanical and structural properties and biological activity of some nanostructured bone scaffolds. *J. Nanomater. Biostructures* **6**, 523–534 (2011).
172. Carano, R. & Filvaroff, E. Angiogenesis and bone repair Bone healing. *Drug Discov Today*. **8**, 980–989 (2003).
173. Gronthos, S. *et al.* Surface Protein Characterization of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *J. Cell. Physiol.* **63**, 54–63 (2001).
174. Katz, A., Tholpady, A., Tholpady, S., Shang, H. & Ogle, R. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* **23**, 412–423 (2005).
175. Yoshimura, K. *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* **208**, 64–76 (2006).
176. Zannettino, A. *et al.* Multipotential Human Adipose-Derived Stromal Stem Cells Exhibit a Perivascular Phenotype *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Cell. Physiol.* **214**, 413–421 (2008).
177. Traktuev, D. O. *et al.* A Population of Multipotent CD34-Positive Adipose Stromal Cells Share Pericyte and Mesenchymal Surface Markers ,reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* **102**, 77–85 (2008).
178. Zimmerlin, L. *et al.* Stromal Vascular Progenitors in Adult Human Adipose Tissue. *Cytometry* **77**, 22–30 (2010).
179. Lin, G. *et al.* Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* **17**, 1053–1064 (2008).
180. Zuk, P. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration : A Review. *ISRN Stem Cells* (2013). at <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/713959>>
181. Hong, L. I. U. *et al.* Differentiation of Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Tissue Eng.* **13**, 1197–1203 (2007).
182. Rodriguez, A. *et al.* Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 255–263 (2004).
183. Lee, J., Kim, I. & Kim, M. Adipogenic Differentiation of Human Adipose Tissue – Derived Stem Cells Obtained from Cryopreserved Adipose Aspirates. *Dermatol Surg.* **36**, 1078–1083 (2010).
184. Wosnitza, M., Hemmrich, K. & Pallua, N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation* **75**, 12–23 (2007).
185. Danišovič, L. *et al.* Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Appl. Biomed.* **5**, 139–150 (2007).
186. Awad, H., Halvorsen, Y., Gimble, J. & Guilak, F. Effects of Transforming Growth Factor b1 and Dexamethasone on the Growth and Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells. *Tissue Eng.* **9**, 1301–1312 (2003).
187. Mizuno, H. *et al.* Experimental Myogenic Differentiation by Human Processed Lipoaspirate Cells. *Plast. Reconstr. Surg.* **109**, 199–209 (2002).
188. Levi, B. *et al.* Differences in osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells from murine, canine, and human sources *in vitro* and *in vivo*. *Plast. Reconstr. Surg.* **128**, 373–386 (2011).
189. Neupane, M., Chang, C., Kiupel, M. & Yuzbasiyan-Gurkan, V. Isolation and Characterization of Canine Adipose–Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng. Part A* **14**, 1007–1015 (2008).
190. Vieira, N. *et al.* Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* **19**, 279–289 (2010).
191. Allori, A., Sailon, A. & Warren, S. Biological Basis of Bone Formation, Remodeling, and Repair—Part I: Biochemical Signaling Molecules. *Tissue Eng. Part B* **14**, 259–273 (2008).

192. Ganta, D., McCarthy, M. & Gronowicz, G. Ascorbic acid alters collagen integrins in bone culture. *Endocrinology* **138**, 3606–3612 (1997).
193. Ramoshebi, L. *et al.* Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med.* **4**, 1–11 (2002).
194. Franceschi, R. & Young, J. Regulation of alkaline phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and ascorbic acid in bone-derived cells. *J Bone Min. Res* **5**, 1157–1167 (1990).
195. Takamizawa, S., Maehata, Y., Imai, K. & Senoo, H. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol. Int.* **28**, 255–265 (2004).
196. Laurencin, C., Attawia, M., Elgendy, H. & Herbert, K. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices. *Bone* **19**, 93S–99S (1996).
197. Golub, E. E. & Boesze-battaglia, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr. Opin. Orthop.* **18**, 444–448 (2007).
198. Orimo, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* **77**, 4–12 (2010).
199. Hoemann, C., El-gabalawy, H. & Mckee, M. *In vitro* osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Phatology Biol.* **57**, 318–323 (2009).
200. Bunnell, B. a, Flaas, M., Gagliardi, C., Patel, B. & Ripoll, C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* **45**, 115–20 (2008).
201. Halvorsen, Y. *et al.* Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* **7**, 729–741 (2001).
202. Navarro, M. *et al.* Surface characterization and cell response of a PLA/CaP glass biodegradable composite material. *J. Biomed. Mater. Res. A* **85**, 477–486 (2008).
203. Ferreira, L. *et al.* Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* **28**, 2706–2717 (2007).
204. Park, E. *et al.* Cellular biocompatibility and stimulatory effects of calcium metaphosphate on osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells. *Biomaterials* **25**, 3403–3411 (2003).
205. Saunders, R., Gough, J. & Derby, B. Delivery of human fibroblast cell by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. *Biomaterials* **29**, 193–203 (2008).
206. Socol, G. *et al.* Biocompatible nanocrystalline octacalcium phosphate thin films obtained by pulsed laser deposition. *Biomaterials* **25**, 2539–2545. (2004).
207. Serrano, M. *et al.* *In vitro* biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials* **25**, 5603–5611 (2004).
208. Ignatius, A. & Claes, L. *In vitro* biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* **27**, 831–839 (1996).
209. Ahmed, I., Collins, C., Lewis, M., Olsen, I. & Knowles, J. Processing, characterisation and biocompatibility of iron-phosphate glass fibres for tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 3223–3232 (2004).
210. Sun, H., Wu, C., Dai, K., Chang, J. & Tang, T. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials* **27**, 5651–5657 (2006).
211. Mondrinos, M. *et al.* Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 4399–4408 (2006).

212. Handschel, J. *et al.* Compatibility of embryonic stem cells with biomaterials. *J. Biomater. Appl.* **23**, 549–560 (2009).
213. Kauschke, E. *et al.* The *in vitro* viability and growth of fibroblasts cultured in the presence of different bone grafting materials (NanoBone and Straumann Bone Ceramic). *Folia Morphol. (Warsz)*. **65**, 37–42 (2006).
214. Foschi, F. *et al.* Graft materials and bone marrow stromal cells in bone tissue engineering. *J. Biomater. Appl.* **26**, 1035–1049 (2012).
215. Tamai, M., Makaoka, R. & Tsichiya, T. Cytotoxicity of various calcium phosphate ceramics. *Key Eng. Mater.* **309-311**, 263–266 (2006).
216. Chouteau, J. *et al.* Cellular culture of osteoblasts and fibroblasts on porous calcium-phosphate bone substitutes. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* **89**, 44–52. (2003).
217. Leong, D., Nah, W., Gupta, A., Hutmacher, D. & Woodruff, M. The osteogenic differentiation of adipose tissue-derived precursor cells in a 3D scaffold/matrix environment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **5**, 319–327 (2008).
218. Müller, P. *et al.* Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med* **12**, 281–291 (2008).
219. Pierre, M. The calcium-sensing receptor in bone cells : A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* **46**, 571–576 (2010).
220. Barradas, A. *et al.* A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* **33**, 3205–3215 (2012).
221. Valerio, P., Pereira, M., Goes, A. & Leite, M. Effects of extracellular calcium concentration on the Glutamate release by bioactive glass (BG60S) preincubated osteoblasts. *Biomed Mater.* **4**, (2009).
222. Reichert, C. *et al.* *In vitro* proliferation of human osteogenic cells in presence of different commercial bone substitute materials combined with enamel matrix derivatives. *Head Face Med.* **5**, (2009).
223. Valentini, P., Abensur, D., Densari, D., Graziani, J. & Hämmerle, C. Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clin Oral Implant. Res.* **9**, 59–64 (1998).
224. Tawil, G. & Mawla, M. Sinus floor elevation using a bovine bone mineral (Bio-Oss) with or without the concomitant use of a bilayered collagen barrier (Bio-Gide): a clinical report of immediate and delayed implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implant.* **16**, 713–721 (2001).
225. Zitzmann, N., Schärer, P., Marinello, C., Schüpbach, P. & BerGlnndh, T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restor. Dent* **21**, 288–295 (2001).
226. Pinholt, E., Bang, G. & Haanaes, H. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand J Dent Res.* **99**, 154–161 (1991).
227. Turhani, D. *et al.* *In vitro* study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg* **34**, 543–550 (2005).
228. Sollazzo, V. *et al.* Bio-Oss® acts on Stem cells derived from Peripheral Blood. *Oman Med. J.* **25**, 26–31 (2010).
229. Carinci, F. *et al.* Genetic effects of anorganic bovine bone. *Arch. Oral Biol.* **51**, 154–163 (2006).
230. Kieswetter, K., Schwartz, Z., Dean, D. D. & Boyan, B. D. The Role of Implant Surface Characteristics in the Healing of Bone. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **7**, 329–345 (1996).
231. Naujoks, C. *et al.* Biocompatibility of osteogenic predifferentiated human cord blood stem cells with biomaterials and the influence of the biomaterial on the process of differentiation. *J. Biomater. Appl.* **25**, 497–512 (2011).
232. Datta, N. *et al.* *In vitro* generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *PNAS* **103**, 2488–93 (2006).

233. Mitragotri, S. & Lahann, J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat. Mater.* **8**, 15–23 (2009).
234. Stevens, M. M. & George, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science (80-.)*. **310**, 1135–1138 (2005).
235. Mcbeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. Cell Shape , Cytoskeletal Tension , and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Dev. Cell* **6**, 483–495 (2004).
236. Nelson, C. M. *et al.* Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *PNAS* **102**, 11594–11599 (2005).
237. Ruiz, S. & Chen, C. Emergence of Patterned Stem Cell Differentiation Within Multicellular Structures. *Stem Cells* **26**, 2921–2927 (2008).
238. Reilly, G. C. & Engler, A. J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J. Biomech.* **43**, 55–62 (2010).
239. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
240. Curtis, A. S. . & Forrester, J. . The competitive effects of serum proteins on cell adhesion. *J Cell Sci* **71**, 17–35 (1984).
241. Gronthos, S., Simmons, P. J., Graves, S. E. & Robey, P. G. Integrin-mediated Interactions Between Human Bone Marrow Stromal Precursor Cells and the Extracellular Matrix. *Bone* **28**, 174–181 (2001).
242. Hennessy, K. M. *et al.* Biomaterials The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation , and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials* **30**, 1898–1909 (2009).
243. Chen, Y. *et al.* Morphology and adhesion of mesenchymal stem cells on PLLA , apatite and apatite / collagen surfaces. *J Mater Sci Mater Med* **19**, 2563–2567 (2008).
244. Dolder, J. Van Den & Jansen, J. A. The response of osteoblast-like cells towards collagen type I coating immobilized by p-nitrophenylchloroformate to titanium. *Biomed Mater Res Part A* **83**, 712–719 (2007).
245. Dennis, J. & Caplan, A. Porous ceramic vehicles for rat-marrow derived (rattus norvegicus) osteogenic cell delivery: effects of pre-treatment with fibronectin or laminin. *J Oral Implant.* **19**, 136–137 (1993).
246. Kantlehner, M. *et al.* Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation. *CHEMBIOCHEM* **1**, 107–114 (2000).
247. Wittmer, C. R., Phelps, J. A., Saltzman, W. M. & Tassel, P. R. Van. Fibronectin terminated multilayer films : Protein adsorption and cell attachment studies. *Biomaterials* **28**, 851–860 (2007).
248. Gold, L. & Pearlstein, E. Fibronectin–collagen binding and requirement during cellular adhesion. *Biochem J* **186**, 551–559 (1980).
249. Pugdee, K. *et al.* Gene expression of MC3T3-E1 cells on fibronectin-immobilized titanium using tresyl chloride activation technique. *Dent Mater J.* **26**, 647–55. (2007).
250. Rivera-Chacon, D. *et al.* Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces. *J Biomed Nanotechnol* **9**, 1092–1097 (2013).
251. Ogura, N. *et al.* Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin. *J. Oral Sci.* **46**, 207–213 (2004).
252. Martino, M. *et al.* Biomaterials Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials* **30**, 1089–1097 (2009).

253. Takamoto, T., Hiraoka, Y. & Tabata, Y. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells in collagen sponge reinforced with different poly(ethylene terephthalate) fibers. *J Biomater Sci Polym Ed.* **18**, 865–881 (2007).
254. Wang, J., Yang, Q., Mao, C. & Zhang, S. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on the collagen / silk fibroin bi-template-induced biomimetic bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **100A**, 2929–2938 (2012).
255. Charoenpanich, A. *et al.* Microarray Analysis of Human Adipose-Derived. *TISSUE Eng. Part A* **17**, 2615–2627 (2011).
256. Salasznyk, R. M., Williams, W. A., Boskey, A., Batorsky, A. & Plopper, G. E. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **1**, 24–34 (2004).
257. Payushina, O. . *et al.* Influence of primary adhesive interactions with fibronectin on clonal growth and osteogenic potential of rat mesenchymal stromal cells. *Cell tissue biol.* **4**, 313–321 (2010).
258. Hamidouche, Z. *et al.* Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18587–91 (2009).
259. Park, I.-S. *et al.* The correlation between human adipose-derived stem cells differentiation and cell adhesion mechanism. *Biomaterials* **30**, 6835–6843 (2009).
260. Kundu, A. K., Khatiwala, C. B. & Putnam, A. J. 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* **15**, 273–283 (2009).
261. Linsley, C., Wu, B. & Tawil, B. The Effect of Fibrinogen , Collagen Type I , and Fibronectin on Mesenchymal Stem Cell Growth and Differentiation into Osteoblasts. *TISSUE Eng. Part A* **19**, 1416–1423 (2013).
262. Liu, T. *et al.* Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* **25**, 750–760 (2007).
263. Von Bubnoff, a & Cho, K. W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev. Biol.* **239**, 1–14 (2001).
264. Sykaras, N. & Opperman, L. a. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J. Oral Sci.* **45**, 57–73 (2003).
265. Luu, H. H. *et al.* Distinct Roles of Bone Morphogenetic Proteins in Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J. Orthop. Res.* **25**, 665–677 (2007).
266. Valcourt, U. & Moustakas, A. BMP Signaling in Osteogenesis, Bone Remodeling and Repair. *Eur. J. Trauma* **31**, 464–479 (2005).
267. Jeon, O. *et al.* In Vivo Bone Formation Following Transplantation of Human Adipose-Derived Stromal Cells That Are Not Differentiated Osteogenically. *TISSUE Eng. Part A* **14**, 1285–1294 (2008).
268. Li, H. *et al.* Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 836–842 (2007).
269. Zanetti, A. S., Sabliov, C., Gimble, J. M. & Hayes, D. J. Review Article Human adipose-derived stem cells and three-dimensional scaffold constructs : A review of the biomaterials and models currently used for bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **101**, 187–199 (2013).
270. Overman, J. R., Helder, M. N. & Bruggenkate, C. M. Short (15 Minutes) Bone Morphogenetic Protein-2 Treatment Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Adipose Stem Cells Seeded on Calcium Phosphate Scaffolds *In Vitro.* *TISSUE Eng. Part A* **19**, 571–581 (2013).
271. Park, J. S. *et al.* Biomaterials Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using RGD-modified BMP-2 coated microspheres. *Biomaterials* **31**, 6239–6248 (2010).

272. Bohme, K., Li, Y., Paul, S. & Olsen, B. R. Primary Structure of the Long and Short Splice Variants of Mouse Collagen XI1 and Their Tissue-Specific Expression During Embryonic Development. *Dev Dyn.* **204**, 432–445 (1995).
273. Izu, Y. *et al.* Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *J. Cell Biol.* **193**, 1115–30 (2011).
274. Kanczler, J. M. & Oreffo, R. O. C. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur. Cell. Mater.* **15**, 100–14 (2008).
275. Street, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *PNAS* **99**, 9656–9661 (2002).
276. Dai, J. & Rabie, A. VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and. *J Dent Res.* **86**, 937–50 (2007).
277. Kneser, U., Schaefer, D., Polykandriotis, E. & Horch, R. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med.* **10**, 7–19 (2006).
278. Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **9**, 685–693 (2003).
279. Villars, F., Guillotin, B., Ame, T., Bareille, R. & Ame, J. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol.* **218**, 775–785 (2002).
280. Joensuu, K. *et al.* INTERACTION BETWEEN MARROW-DERIVED HUMAN MESEN- CHYMAL STEM CELLS AND PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN ENDOTHELIAL CELL DIFFERENTIATION. *Scand. J. Surg.* **100**, 216–222 (2011).
281. Duffy, G., Ahsan, T., O'Brien, T., Barry, F. & Nerem, R. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Angiogenic Processes in a Time- and Dose-Dependent Manner *In Vitro.* *Tissue Eng Part A.* **15**, 2459–2470 (2009).
282. Bidarra, S. J. *et al.* Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells. *Stem Cell Res.* **7**, 186–197 (2011).
283. Wang, J. *et al.* *In vitro* osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**, 143–149 (2011).
284. Kaigler, D. *et al.* Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J.* **19**, 665–682 (2005).
285. Furumatsu, T. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Principally Acts as the Main Angiogenic Factor in the Early Stage of Human Osteoblastogenesis. *J Biochem* **133**, 633–639 (2003).
286. Olsson, A., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-welsh, L. REVIEWS VEGF receptor signalling — in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 359–371 (2006).
287. Evensen, L. *et al.* Mural cell associated VEGF is required for organotypic vessel formation. *PLoS One* **4**, e5798 (2009).
288. Donovan, D., Brown, N., Bishop, E. & Lewis, C. Comparison of three *in vitro* human “angiogenesis” assays with capillaries formed *in vivo.* *Angiogenesis* **4**, 113–121 (2001).
289. Jun, S., Traktuev, D. O. & March, K. L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **15**, 86–91 (2010).
290. Fan, W. *et al.* Adipose Stromal Cells Amplify Angiogenic Signaling via the VEGF / mTOR / Akt Pathway in a Murine Hindlimb Ischemia Model : A 3D Multimodality Imaging Study. *PLoS One* **7**, (2012).
291. Deveza, L., Choi, J., Imanbayev, G. & Yang, F. Paracrine Release from Nonviral Engineered Adipose-Derived Stem Cells Promotes Endothelial. *Stem Cells Dev.* **22**, 483–491 (2013).
292. Behr, B., Tang, C., Germann, G., Longaker, M. & Quarto, N. Locally Applied Vascular Endothelial Growth Factor A Increases the Osteogenic Healing Capacity of Human Adipose-Derived Stem Cells by Promoting Osteogenic and Endothelial Differentiation. *Stem Cells* **29**, 286–296 (2011).

293. Hayes, A. *et al.* Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res*. **58**, 224–237 (1999).
294. Saharinen, P. *et al.* Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol* **10**, 527–537 (2008).
295. Gerhardt, H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting SC ND Introduction RIB ND ES SC. *Organogenesis* **4**, 241–246 (2008).
296. Thomas, M. & Augustin, Æ. H. G. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* **12**, 125–137 (2009).
297. Bach, T. L. *et al.* VE-Cadherin Mediates Endothelial Cell Capillary Tube Formation in Fibrin and Collagen Gels 1. *Exp. Cell Res*. **238**, 324–334 (1998).
298. Aizawa, T. & Hashizume, K. IGF-1 Regulates Migration Endothelial Cells and Angiogenesis of Human. *Endocr J*. **46**, 59–62 (1999).
299. Cross, M. J. & Claesson-welsh, L. FGF and VEGF function in angiogenesis : signalling pathways , biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 201–207 (2001).
300. Mehta, V. & Besner, G. HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways. *Growth Factors*. **25**, 253–263 (2007).
301. Pedersen, T. O. *et al.* Endothelial microvascular networks affect gene-expression profiles and osteogenic potential of tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 52–62 (2013).
302. Tsigkou, O. *et al.* Engineered vascularized bone grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3311–3316 (2010).
303. Mertsching, H., Walles, T., Hofmann, M., Schanz, J. & Knapp, W. H. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*. **26**, 6610–6617 (2005).
304. Gershovich, J. G., Dahlin, R. L., Kasper, F. K. & Mikos, A. G. Enhanced Osteogenesis in Cocultures with Human Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Cells on Polymeric Microfiber Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. **00**, (2013).
305. Yamamoto, M. *et al.* Generation of Stable Co-Cultures of Vascular Cells in a Honeycomb Alginate Scaffold. *Tissue Eng Part A*. **16**, 299–308 (2010).
306. Gardin, C. *et al.* *In vitro* concurrent endothelial and osteogenic commitment of adipose-derived stem cells and their genomical analyses through comparative genomic hybridization array: novel strategies to increase the successful engraftment of tissue-engineered bone grafts. *Stem Cells Dev*. **21**, 767–77 (2012).
307. Traktuev, D. O. *et al.* Robust Functional Vascular Network Formation In Vivo by Cooperation of Adipose Progenitor and Endothelial Cells. *Circ Res* **104**, 1410–1420 (2009).
308. Duffy, G. P. *et al.* TOWARDS IN VITRO VASCULARISATION OF COLLAGEN-GAG SCAFFOLDS. *Eur Cell Mater* **21**, 15–30 (2011).
309. Brennan, M., Davaine, J. & Layrolle, P. Pre-vascularization of bone tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res Ther.* **4**, 96 (2013).
310. Unger, R. E., Halstenberg, S., Sartoris, A. & Kirkpatrick, C. J. Human endothelial and osteoblast co-cultures on 3D biomaterials. *Methods Mol Biol*. **695**, 229–241 (2011).
311. Kang, Y., Kim, S., Fahrenholtz, M., Khademhosseini, A. & Yang, Y. Osteogenic and angiogenic potentials of monocultured and co-cultured human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and human-umbilical-vein endothelial cells on three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold. *Acta Biomater.* **9**, 4906–4915 (2013).
312. Cooper, T. P. & Sefton, M. V. Fibronectin coating of collagen modules increases in vivo HUVEC survival and vessel formation in SCID mice. *Acta Biomater.* **7**, 1072–1083 (2011).

313. Kang, Y., Kim, S., Bishop, J., Khademhosseini, A. & Yang, Y. The osteogenic differentiation of human bone marrow MSCs on HUVEC-derived ECM and b-TCP scaffold. *Biomaterials* **33**, 6998–7007 (2012).
314. Pearce, a I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E. & Pearce, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur. cells Mater.* **13**, 1–10 (2007).
315. Eslaminejad, M. B. & Taghiyar, L. Study of the Structure of Canine Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Culture. *Anat Histol Embryol.* **39**, 446–455 (2010).
316. Woll, N., Heaney, J. & Bronson, S. Osteogenic nodule formation from single embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells Dev.* **879**, 865–879 (2006).
317. Haghghat, A. *et al.* Adipose derived stem cells for treatment of mandibular bone defects: An autologous study in dogs. *Dent Res J (Isfahan).* **8**, 51–57 (2011).
318. Liu, G. *et al.* Biomaterials Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials* **34**, 2655–2664 (2013).
319. Cui, L. *et al.* Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* **28**, 5477–5486 (2007).
320. Tobita, M., Uysal, C. A., Guo, X. I. N., Hyakusoku, H. & Mizuno, H. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model. *Cytotherapy* **0**, 1–10 (2013).

Una vez finalizada la escritura mi tesis doctoral, quisiera plasmar una pequeña muestra de mi agradecimiento mediante mis dos grandes pasiones: la música y la fotografía



.....“Por eso Gracias,
a quien me ha dado alguna flor o algún suspiro,
pues allanó con su fragancia mi camino,
a los amigos de mi calle, a los que aprecian lo que vale.



Gracias, a quien me ha dado sufrimiento a manos llenas
y me ha enseñado que la vida es una escuela,
entre el llanto y la locura, la ilusión y la amargura.



A todos gracias, por la experiencia de escalar acompañado,
cada barrera que la ruta me ha marcado, pues yo solo soy,
la suma de todo lo que he pasado”...



Autor: Gilberto Santa Rosa



