

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

---



**Estudio de células stem mesenquimales  
en pacientes con osteoporosis**

M<sup>a</sup> Sandra Muntión Olave  
2010



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**Departamento de Medicina**

**D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> CONSUELO DEL CAÑIZO FERNÁNDEZ-ROLDÁN,**  
**PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA**  
**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado **“Estudio de células stem mesenquimales en pacientes con osteoporosis”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada M<sup>a</sup> Sandra Muntión Olave en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 7 de Mayo de 2010.

**Fdo. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán.**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Departamento de Medicina**

**D. FERMÍN MARTÍN SÁNCHEZ-GUIJO,  
PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y  
FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado **“Estudio de células stem mesenquimales en pacientes con osteoporosis”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada M<sup>a</sup> Sandra Muntión Olave en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 7 de Mayo de 2010.

**Fdo. Dr. D. Fermín Martín Sánchez-Guijo.**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Departamento de Medicina**

**D. JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO,  
PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado **“Estudio de células stem mesenquimales en pacientes con osteoporosis”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada M<sup>a</sup> Sandra Muntión Olave en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 7 de Mayo de 2010.

**Fdo. Dr. D. Juan Francisco Blanco Blanco**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Dra. Chelo del Cañizo por acogerme en el laboratorio de Terapia Celular y tener tanta paciencia en el desarrollo de este trabajo.*

*Al Dr. Fermín M. Sánchez- Guijo por corregir con paciencia mis múltiples errores, enseñarme a considerar las cosas desde otro punto de vista.*

*Al Dr. Juan Blanco, sin su apoyo y sus muestras este trabajo no se habría comenzado.*

*Al Prof. Dr. Jesús San Miguel, por haberme permitido desarrollar este trabajo en el Servicio de Hematología.*

*A la futura Dra. Soraya Carrancio, buena maestra y mejor persona, absolutamente insustituible e imprescindible en la realización de este trabajo.*

*A Belén, Pilar y Miriam, sin cuya ayuda y conocimientos varios, hubiera sido imposible desarrollar gran parte de esta tesis.*

*A Nacho, María, Conchi, Luis, Teresa Caballero, Carmen por lo mucho que he aprendido a su lado , su buena disposición para ayudar y por crear una atmosfera distendida y con buen humor en el trabajo diario.*

*Al futuro Jefe de Servicio, José Antonio Pérez Simón, por su más silencioso apoyo. ( No te preocupes que te envió el cassette.)*

*A Carlos, Noemí, Maru por su amistad, su ayuda totalmente desinteresada y tantas comidas juntos. En definitiva a todo el departamento de Biología Molecular por acogerme siempre con una tacita de café.*

*A Manu, Eva Lorenzo, Eva García, Silvia, siempre dispuestos a hacer algo por mi*

*Al resto de compañeros del laboratorio Eva Villaron, Teresa García, Olga López, Natalia López, Rebeca y los nuevos Verónica y Carlos por su compañía y colaboración*

*A los miembros del Laboratorio 12: Irene, Sara, Rocío, Cristina, Eva, Mercedes, Montse, Ana, Mónica y especialmente a Antoñito Garayoa por su inagotable paciencia , calidad humana y enseñarme MUCHAS, MUCHAS técnicas.*

*Al departamento de Citogenética por su voluntad a dejarme siempre lo que día tras día sigo pidiendo sin fin y como no a Manolo que tantos y tantos archivos de esta tesis me ha recuperado.*

*A los miembros de este Servicio de Hematología, por ser buena gente y tan amablemente, siempre que he necesitado me han ayudado. Gracias.*

*A mis amigas Ester, Silvia, Nieva, Ana y Elena por su apoyo a lo largo de todos estos meses y su amistad de tantos y tantos años.*

*Finalmente para mis amigos, Juan Luis, Gemma, Manuel, María, M<sup>a</sup> Angeles, Amador, Maite, Belén, Pilar, Don Agustín y especialmente a Norma por que sin su ayuda, hoy no estaría en este Servicio y la citogenética sería una gran desconocida en mi vida.*

# 1. Introducción



## **1. CELULAS STEM PROCEDENTES DE MÉDULA ÓSEA:**

### **1.1 Concepto, antecedentes y tipos principales**

Una célula madre (también denominada célula “stem” ) se define como aquella que tiene las siguientes tres características<sup>1</sup>:

- a) Capacidad de autorrenovación o de formar durante su división al menos una copia idéntica de la célula inicial, con las mismas características y propiedades biológicas.
- b) Capacidad de diferenciación hacia una (o varias) células maduras con función especializada.
- c) Capacidad de proliferación a largo plazo.

En los años 60, los experimentos de Till y McCulloch basados en el trasplante de células mononucleadas de la médula ósea en ratones letalmente irradiados, demostraron por primera vez la existencia de células con estas propiedades en la médula ósea, las células madre hematopoyéticas<sup>2</sup>.

Posteriormente, un número creciente de estudios han demostrado que la médula ósea contiene células madre con mayor versatilidad que las células madre hematopoyéticas, además de las células progenitoras del estroma medular, o células madre mesenquimales<sup>3</sup>.

Hay por ello un interés creciente en el aislamiento y expansión de estos tipos celulares por su potencial empleo como herramienta terapéutica en programas de terapia celular somática.

Son muchos los estudios que se han realizado con el fin de identificar, aislar y caracterizar las subpoblaciones celulares existentes en la médula ósea (MO). Hoy en día, se sabe que en la MO existen diversos tipos celulares, algunos de ellos con características de célula stem. Entre ellos se pueden distinguir los siguientes:

- *Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC)*. Fueron descritas por el grupo de C.Verfaillie (Multipotent adult...). Existen algunos trabajos que describen su aislamiento, expansión y potencial de diferenciación hacia la mayoría de estirpes celulares lo que sugiere que estas células pueden considerarse como pluripotenciales. Las dificultades que presentan para su aislamiento y expansión ha hecho que actualmente no se contemple su uso en clínica.
- *Hemangioblasto*. Considerado como un progenitor común de línea hematopoyética (CSH) y endotelial (CPE).(Farrari a)(Loges S)(Xiong JW) se sabía de su existencia en el embrión. En la actualidad se considera que pueden estar también presentes en la médula ósea (M.O) y que pueden estar implicados en mecanismos de reparación vascular.
- *Célula stem hematopoyética (CSH)*. Es posiblemente la célula stem adulta mejor estudiada y caracterizada. Se aisló por primera vez en 1988 de la MO de ratón (Spangrude). Actualmente se caracteriza por la expresión de distintos marcadores de membrana entre los que destaca el CD34, mientras que carece de otros como CD38. Es capaz de regenerar completamente todas las series hematopoyéticas (Krause DS-Blood 1996, Wognum AW, Eaves....)

▪ *Célula stem mesenquimal (CSM)*. Objetivo del presente trabajo, las CSM son las células stem del estroma medular. Contribuyen a la formación del nicho hematopoyético estando implicadas en los mecanismos que regulan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Sus particulares características: pluripotencialidad y facilidad para obtenerlas y aumentar su número *in vitro* ha supuesto que se hayan convertido en una fuente celular idónea para los programas de terapias avanzadas.(Minguell)<sup>4</sup>.

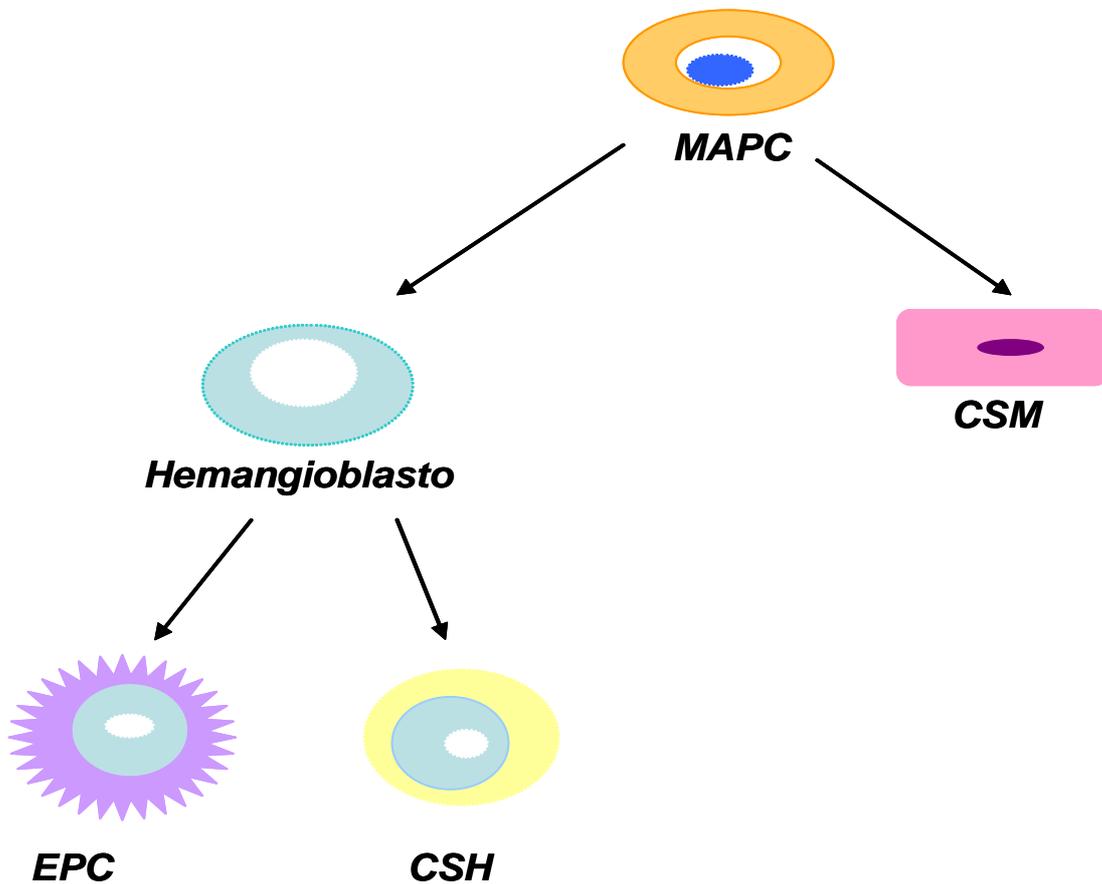


Figura 1: Organización células stem dentro de la médula ósea.

## 1.2. CÉLULA STEM MESENQUIMAL:

### 1.2.1.DEFINICIÓN:

En los últimos años ha habido un creciente interés por el estroma medular, el cual incluye las células que soportan la hematopoyesis, conocidas como células stem mesenquimales (CSM) y su progenie. Las CSM fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1980 como células que residen en el interior de la médula ósea, que no son células hematopoyéticas, con aspecto fibroblástico y características de célula stem: capacidad de auto-renovación, proliferación y con capacidad de diferenciarse a varias líneas de tejido mesodérmico. A partir de entonces el interés clínico y biológico que han despertado estas células ha ido en aumento siendo muchos los estudios sobre ellas en los que se han usando diferentes métodos de aislamiento, expansión y caracterización. Con el fin de consensuar una definición de CSM la Sociedad Internacional de Terapia Celular (I.S.C.T)(Dominici) propuso unos criterios mínimos necesarios para definir la CSM humana, usadas tanto para estudios experimentales como para los estudios clínicos. Dichos criterios son:

- Capacidad de adherencia al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar.
- Expresión de CD90, CD73, y CD105 y ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14, ó CD11b, CD79 $\alpha$  ó CD19 y HLA clase II
- Capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos, y condrocitos bajo condiciones estándar de diferenciación.

Estas células tienen capacidad clonogénica, de forma que cuando se cultivan a baja densidad tienen la propiedad de formar unidades formadoras de

colonias fibroblásticas (CFU-F).(Castro-Malaspina H Blood 1980 Aug;56(2):289-301)

Las CSM se han descrito como una población heterogénea y uno de los principales problemas para su caracterización inmunofenotípica es la falta de un marcador específico. Dentro de los marcadores expresados por las CSM están, además de los antes mencionados los siguientes: CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD 106, CD140b, CD166 y Stro1.(Rojeswski)(Jones Elena A,Arthritis&Rheumatism) (Stewart)(Jones Elena, Cytometry part B).

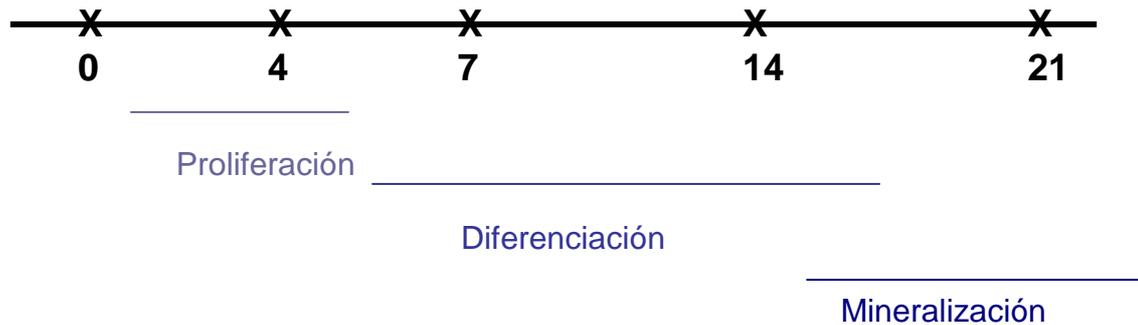
### **1.2.2. POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN**

Las CSM se consideran células capaces de diferenciarse hacia células de tejidos de estirpe mesenquimal e incluso a otras estirpes, pero por definición, como comentábamos previamente deben diferenciarse al menos a tejido óseo, cartilaginoso y adiposo.

#### **DIFERENCIACION A OSTEOLASTOS**

La diferenciación hacia osteoblastos de las CSM (Jaiswal N) ha sido ampliamente demostrada in vitro. Habitualmente se realiza mediante el cultivo de una capa adherente de CSM en un medio de inducción osteogénica, el cual suele incluir dexametasona, ácido Ascórbico y  $\beta$ -glicerol fosfato. Las CSM forman en un primer momento agregados o nódulos y aumenta la expresión de fosfatasa alcalina. A partir de la primera semana se puede observar la aparición de depósitos de calcio, pero no es hasta la tercera semana cuando se obtiene una diferenciación completa. Tanto la aparición de depósitos de calcio como el

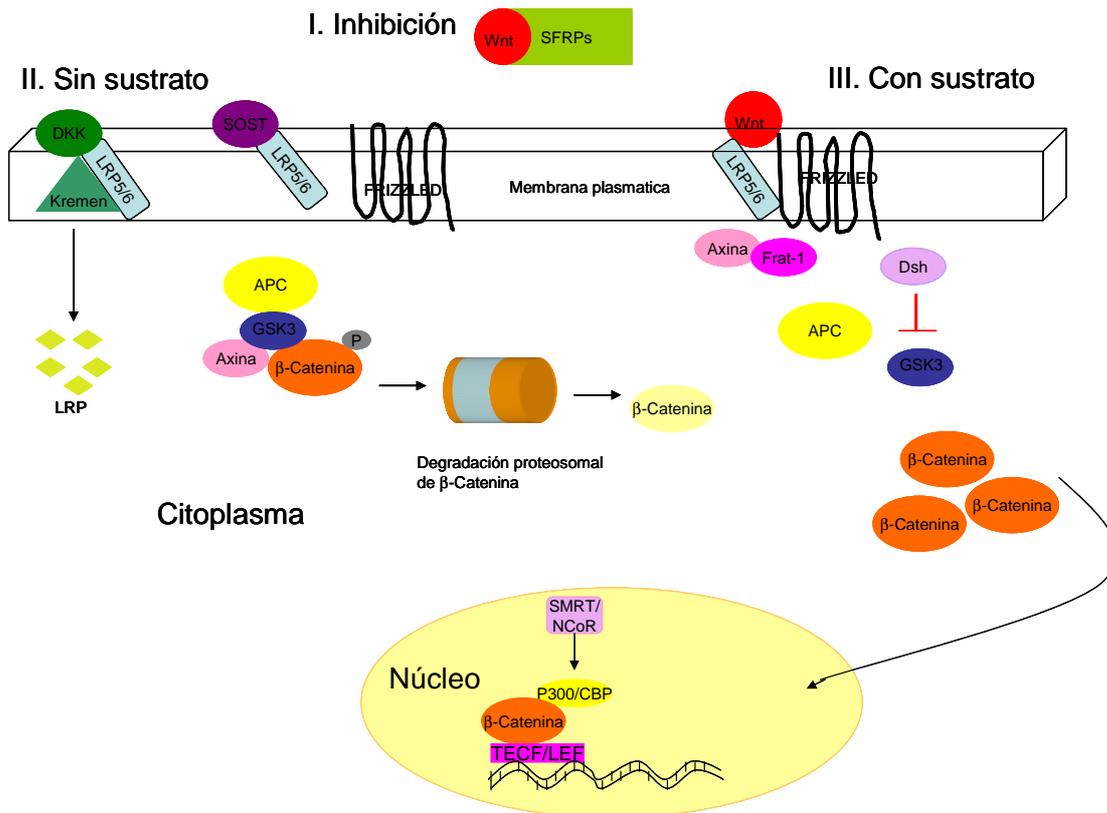
aumento de la actividad fosfatasa alcalina pueden valorarse por métodos histoquímicos o por técnicas de genética molecular como cuantificación de la expresión de genes como la osteopontina, osteocalcina, etc...(Pierre J Marie).



En situaciones normales existe un equilibrio entre la diferenciación osteoblástica y la diferenciación adipogénica<sup>5</sup>. De hecho existen vías de señalización opuestas implicadas en ambas diferenciaciones. Una de las vías más importante en la diferenciación celular de las CSM, es la vía de WNT.

Las proteínas WNT constituyen una de las familias más importantes de moléculas de señalización implicadas en el desarrollo celular y en otros procesos claves del tejido adulto como por ejemplo en la regulación de la proliferación y movilidad celular (Leah Etheridge). La vía de Wnt puede estimular al menos cuatro vías de señalización diferentes aunque la mejor conocida es la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, o también llamada ruta canónica, la cual es particularmente importante para la biología del hueso (Westendorf JJ)(Rawadi

2005).

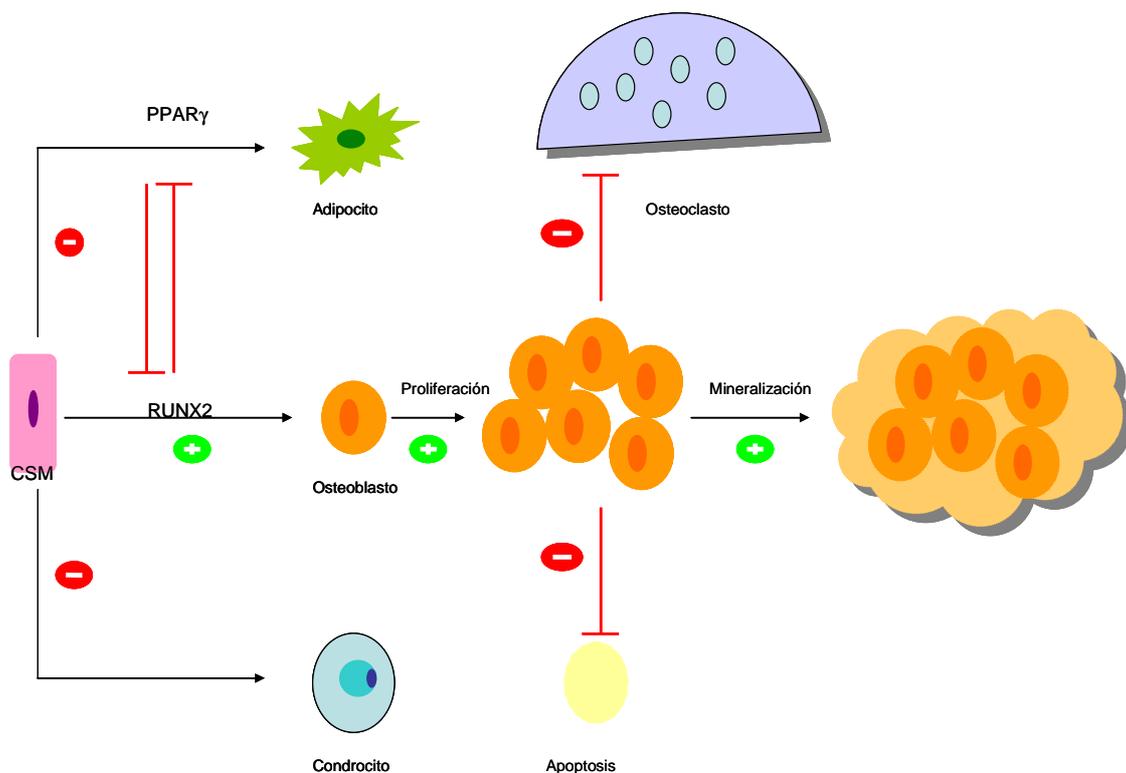


**Figura 1** Mecanismo de acción de la vía de señalización de Wnt/β catenina

La activación de esta vía provoca un aumento en la masa ósea a través de numerosos mecanismos incluyendo: renovación de células madre, estimulación de la replicación de preosteoblastos, inducción de osteoblastogénesis e inhibición de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (Krishnan). La activación de via Wnt/β-Catenina ocurre cuando las proteínas Wnt se unen a sus receptores, bien a los dedos de Zn (Frizzled) o a los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRPs). Las señales son generadas a través de proteínas citoplasmáticas Disheveled (Dvl), Axina y Frat-1, las cuales disocian el complejo proteico APC (Adenomatous Polyposis Coli), Axina y GSK-3 (glucógeno sintasa kinasa) e inhiben la actividad de la enzima GSK-3 causando hipofosforilación y estabilización de β-Catenina en el citosol.

Dicho sustrato se trasloca al núcleo donde interactúa con el factor de transcripción TCF/LEF desplazando a co-represores transcripcionales como ácido retinoico y reclutando co-activadores transcripcionales como AMPc.

Recientemente la vía de señalización WNT también se ha visto implicada en el control de diferenciación de la célula stem hematopoyética, de la célula stem de la piel y en procesos de regulación de miogénesis, condrogénesis y adipogénesis. Pero uno de los procesos más importantes es la regulación de la osteoblastogénesis. La inhibición de la GSK-3 estimula a las CSM a diferenciarse a osteoblastos, mientras que la presencia de DKK1 inhibe esta vía bloqueando la osteoblastogénesis. Además, como hemos comentado previamente, la activación de Wnt inhibe la adipogénesis de CSM.



**Figura 3:** Proceso por el cual se originan los distintos linajes de las células mesenquimales

Muchos son los estudios basados en mutaciones del co-receptor de Wnt, el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRPs), ya que dichas mutaciones están asociadas a una alteración (incremento o pérdida) de masa ósea por un aumento o disminución de la proliferación de los osteoblastos (Gong Y,)(Kato M). Como reguladores negativos de la vía WNT se han identificado una familia de péptidos relacionados con los dedos de Zn (sFRPs)(Leyns L)(Wang S) los cuales impiden que las proteínas Wnt se unan a sus receptores y como consecuencia  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma, donde es degradada mediante la vía Ubiquitina/proteosoma. Otros estudios muestran que la proteína morfogenética del hueso (BMP-2) induce la actividad de fosfatasa alcalina, la mineralización en las CSMs (Rawadi G) y la formación de cartílago (.Chen D 2004)

#### DIFERENCIACION A ADIPOCITO.

La diferenciación hacia adipocito, se consigue *in vitro* al incubar las CSM en presencia de un medio de diferenciación que suele incluir dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina e indometacina<sup>5</sup>(Post Bone 2008), y se dispone ya en la actualidad de preparados comerciales. Trascorridas tres semanas de cultivo se observan vacuolas lipídicas agrupadas en el citoplasma de las células que además expresan el receptor PPAR $\gamma$ 2, lipoproteinlipasa y la proteína acida P2, adipsina (pittenger MF)(Ulrico Noth)(Giaginis). Estos acúmulos de lípidos se ponen de manifiesto por técnicas citoquímicas, como la tinción con rojo al aceite O (oil-red-O).(Chamberlain G).

El PPAR $\gamma$ 2, es un activador de la diferenciación hacia adipocito, mientras que actúa negativamente sobre la diferenciación a osteoblasto (Lecka-Czernik

B). Esto hace pensar, que existe una relación recíproca entre la osteogénesis y la adipogénesis, tal como se ha mostrado en la figura 2, de forma que la diferenciación por un camino restringe la expresión de genes específicos del otro linaje<sup>5</sup>. La evidencia más real de la existencia de este hecho entre osteogénesis y adipogénesis la demostraron Bennett y colaboradores al demostrar la existencia de un inhibidor específico de la glucógeno sintasa quinasa 3, el cual estabiliza la  $\beta$ -catenina en el citosol celular e inhibiendo la adipogénesis al bloquear la proteínas de unión al activador CCAAT (C/EBPs) y el factor inductor de adipogénesis (PPAR $\gamma$ ).

Otra proteína inductora de adipogénesis e inhibidora de osteoblastogénesis es la proteína transportadora de retinol-RBP4 la cual se ha demostrado que mantiene una relación negativa con marcadores de actividad ósea como la osteocalcina (Hogstrom).

El tejido adiposo juega un papel importante en la homeostasis y en procesos patológicos como obesidad, inflamación, y diabetes, entre otros.

#### DIFERENCIACIÓN A CONDROCITO:

La diferenciación condrogénica de las CSM que se lleva a cabo *in vitro* pretende mimetizar el proceso de formación de cartílago *in vivo* y ha de realizarse en un cultivo en tres dimensiones. Para dicho proceso se utiliza un medio que contiene dexametasona, ácido linoleico, insulina bovina, transferrina o suplementos más específicos como TGF- $\beta$ 1, factor de crecimiento involucrado en su diferenciación *in vivo*<sup>6,7</sup>. La diferenciación se pone de manifiesto al demostrar en estas células la expresión de factores de transcripción como SOX-9 y componentes de la matriz extracelular como

colágenos tipo II, IX, X o agregano, siendo la expresión de estos cuatro últimos la forma más habitual de demostrar la diferenciación hacia condrocitos de las CSM mediante técnicas histoquímicas (Jackson L)(Mastrogiacomo M)(Johnstone B)

#### DIFERENCIACIÓN HACIA OTROS TIPOS CELULARES:

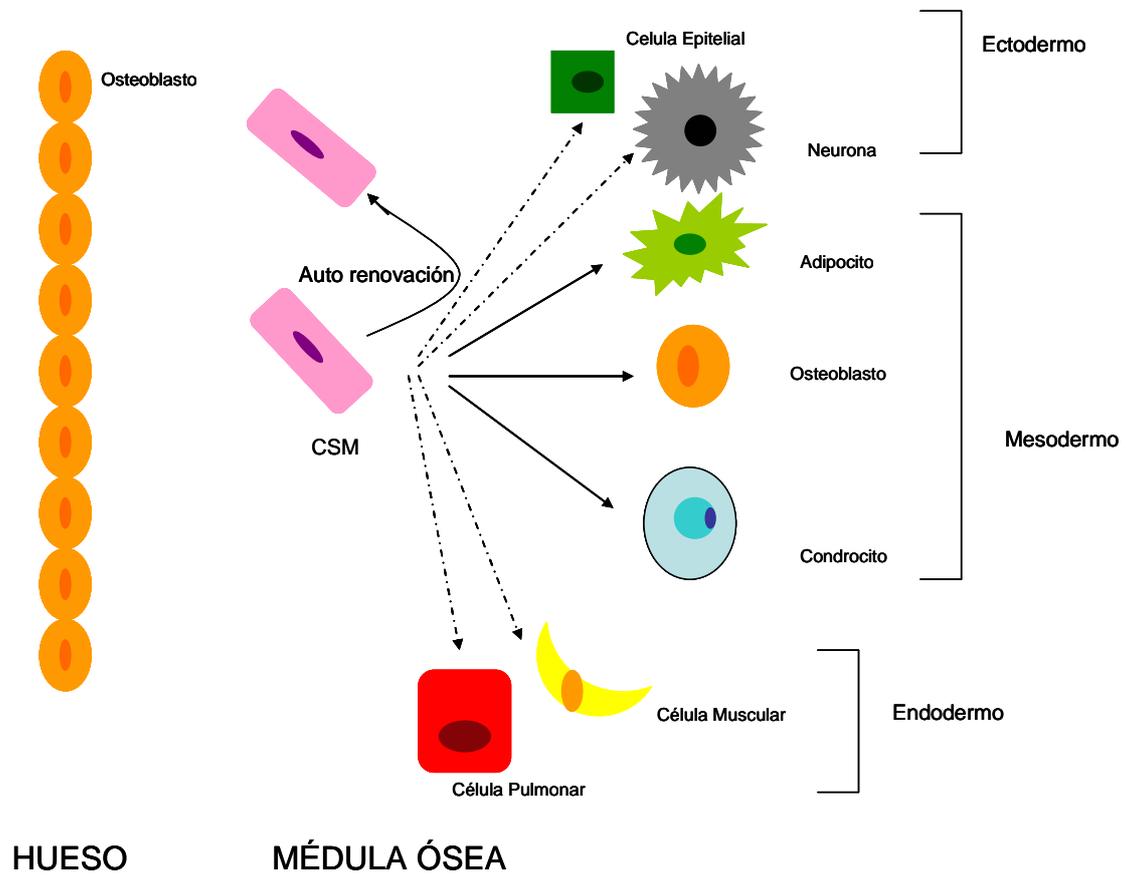
La diferenciación hacia otros tipos celulares no se ha estudiado tan profundamente como las anteriores.

En cuanto la diferenciación a miocitos diferentes autores han descrito que las CSM al ser tratadas como 5-azacitidina pueden dar lugar a células musculares (Taylor SM). Este potencial biogénico también se ha demostrado en modelos *in vivo* xenogénicos cuando se han co-cultivado las CSM procedentes de MO con células de músculo esquelético de ratón, lo que sugiere que la interacción célula-célula es fundamental para esta diferenciación (Lee JH 2007).

Otros autores muestran también la importancia del contacto célula-célula para la estimulación de cardiomiogénesis usando co-cultivos de CSM y cardiomiocitos, en un ratón con infarto intramiocardial<sup>7</sup>. Actualmente tanto en modelos animales como en ensayos clínicos se esta potenciando la investigación en regeneración de tejido cardíaco.

Además de la diferenciación a tejidos de origen mesodérmico, algunos grupos han descrito que las CSM son capaces de adquirir características morfológicas y/o funcionales de células renales, hepáticas e incluso neuronales cuando se utilizan determinadas condiciones de cultivo (Jackson L). Lo que significaría que estas células no son únicamente multipotentes sino

pluripotentes. Dicha cuestión, supone hoy en día un amplio debate, ya que hay autores que no han reproducido estos hallazgos iniciales.



**Figura 3:** Proceso por el cual se originan los distintos linajes de las células mesenquimales

### 1.2.3. FUENTES DE OBTENCIÓN DE CSM

La posibilidad de obtener CSM de distintas especies y localizaciones ha sido objeto de reciente interés.

Las CSM se pueden aislar de múltiples especies, siendo las más conocidas y estudiadas las de origen humano (Pittenger), rata (Santa ML) y ratón (Baddoo M). Pero también se han podido aislar de otras especies como babuinos (Devine SM), ovejas<sup>8</sup>, perros<sup>9</sup>, cerdos<sup>10</sup> o vacas (Bosnakovski D).

Referente a los distintos tejidos de los que pueden obtenerse CSM son muchos y variados<sup>6</sup>. Originalmente Friedenstein et al. aislaron CSM de médula ósea y estroma de bazo y timo<sup>11</sup> (Friedenstein). Desde entonces se han conseguido aislar a partir de células madres de sangre periférica movilizada, de muestras fetales sanguíneas, hígado o médula ósea (Campagnoli C), obtenidas durante el primer trimestre de embarazo, pulmón fetal (Int Anker PS), de vellosidades coriónicas de la placenta (Igura K) y del líquido amniótico<sup>6;12</sup>. Se ha demostrado la presencia de un porcentaje muy pequeño de CSM en sangre procedente de cordón umbilical<sup>6;13</sup> y en sangre periférica del individuo adulto (Zvaifler NJ). Otros autores han conseguido extraer CSM de folículos pilosos, tejido de cuero cabelludo<sup>14</sup>, ligamentos periodontales (Trubiani O), cartílago, periostio, tejido y líquido sinovial, músculo y tendones, lo que sugiere que las CSM están ampliamente distribuidas. Actualmente las fuentes mejor estudiadas son la médula ósea (Dominicci)(minguell)(Chamberlain) y el tejido adiposo (Lee RH).

El presente trabajo se ha centrado en el análisis y obtención de CSM obtenidas a partir de médula ósea de cresta ilíaca y CSM procedentes de hueso trabecular (Sottile V).

## CÉLULAS STEM MESENQUIMALES PROCEDENTES DE HUESO TRABECULAR

Las CSM procedentes de hueso trabecular se aislaron y expandieron por primera vez por R. Tuli a partir de cabezas femorales obtenidas de artroplastias totales y digeridas con colagenasa XI (Tuli R). Durante los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios que han puesto de manifiesto su fácil obtención y su similitud fenotípica y funcional de las CSM procedentes de MO (Noth U, Tuli R, Sottite V, Song L, Fermín M Sánchez-Guijo).

### 1.2.4. POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS CSM

Las CSM se presentan como una herramienta terapéutica que podría aplicarse a diversas enfermedades degenerativas e inmunes. Debido a su amplia capacidad de auto-renovación, proliferación, multipotencialidad, propiedades inmunomoduladoras y la capacidad para ser modificadas por técnicas de ingeniería molecular han demostrado que podrían ser una herramienta terapéutica útil en la reparación y regeneración de tejidos tanto en estudios preclínicos como clínicos, principalmente en el sistema cardiovascular, aparato locomotor, trasplante hematopoyético, tracto gastrointestinal, páncreas e incluso en el sistema nervioso central.

Su vía de administración puede ser mediante inyección intravenosa o por administración *in situ*. Otra aplicación potencial su uso en terapia génica.

Se han empleado CSM en medicina regenerativa cardiovascular, donde podrían aumentar la función miocárdica tras un infarto de miocardio<sup>15</sup>.

Se han empleado además por sus propiedades regenerativas e inmunomoduladores en enfermedades con un contexto autoinmune, como la enfermedad inflamatoria intestinal, donde existen datos preliminares de su capacidad para reparar úlceras y fístulas<sup>16;17</sup>, y en diabetes mellitus, donde podrían mejorar el perfil glucémico por un incremento en el número de islotes pancreáticos<sup>18</sup>.

Como es lógico, se han empleado en el contexto del trasplante hematopoyético, con una doble indicación. Por una parte, es conocido el hecho de que en pacientes sometidos a trasplante el estroma suele estar dañado, por ello se han llevado a cabo varios ensayos con el fin de facilitar el injerto hematopoyético tras el trasplante<sup>19</sup>. En el segundo lugar dada la capacidad inmunomoduladora se han llevado a cabo ensayos clínicos con el fin de controlar la complicación más grave y frecuente del mismo, la enfermedad injerto contra huésped<sup>20</sup>.

Finalmente comentaremos su potencial terapéutico en enfermedades del aparato locomotor, dado que, es el sistema en el que se ha demostrado más claramente la utilidad de estas células en el contexto de la medicina regenerativa.

Las CSM influyen directamente en la homeostasis del hueso. Cabe pensar, que esta pérdida de funcionalidad celular pueda ser tratada con el uso de CSM, dado que se ha demostrado que las CSM injertan en hueso<sup>21</sup>,(PereiraRF). En los últimos años, la Terapia Regenerativa se ha presentado como una nueva opción terapéutica, y es en este campo, así como

en otras variantes de la terapia celular y génica donde las CSM se perfilan como una herramienta muy útil para el tratamiento de diferentes enfermedades. Una muestra de ello es el gran número de ensayos clínicos que se están iniciando o desarrollando en los últimos años, entre los que podemos destacar el uso de CSM en osteogénesis imperfecta y otras enfermedades óseas<sup>22-25</sup> como osteopetrosis, osteogénesis imperfecta e hipofosfatasa infantil pero en la actualidad no existe ningún ensayo con pacientes diagnosticados de osteoporosis. La terapia con células stem mesenquimales, las cuales poseen capacidad autoregeneradora y son capaces de diferenciarse dentro de la población celular lo que han potenciado es una enorme mejora en la calidad de vida de los pacientes con enfermedades ósea. Esto tiene interés clínico, puesto que los fragmentos óseos de cabeza de fémur triturados del modo empleado en nuestro trabajo, en el mismo acto quirúrgico, pueden utilizarse como fuente de implante óseo para uso terapéutico<sup>26</sup>

En osteogénesis imperfecta, enfermedad caracterizada por la producción de poco colágeno o porque esta producción sea anormal, en 1999 Horwitz publicó el primer trasplante con médula ósea en un niño el cual mostraba evidencias de un mejor crecimiento, densidad ósea a los 6 meses del trasplante. La infusión de CSM en estos casos, después del trasplante de médula ósea alogénico, confirmó la mejora de tejidos mesenquimales.

En osteoporosis, se produce un desequilibrio en la reabsorción ósea debida a un descenso en el reclutamiento de osteoblastos. Con el tratamiento de bifosfonatos se ha visto que aumento en la mineralización ósea, pero esto realmente no cura la enfermedad. La terapia celular podrían potenciar el efecto de estos factores aumentando el turnover del hueso<sup>27</sup>. Como en otras

enfermedades se cree que el trasplante de médula ósea y en particular la infusión de CSM podrían permitir la formación del hueso. Se ha visto que la infusión intravenosa de estas CSM en ratones, a los cuales se les ha provocado la enfermedad, no resulta muy efectiva en cambio si las MSC se inyectan directamente en la cavidad los resultados son más satisfactorios.

Este trasplante podría permitir un aumento de densidad ósea y de la calidad del hueso por tanto una mejora en la calidad de vida del paciente con osteoporosis.

## 2. OSTEOPOROSIS

### 2.1. El hueso

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado constituyente principal de los huesos de los vertebrados. Formado por la matriz ósea (componentes extracelulares calcificados) y las células óseas.

**La matriz ósea** representa la sustancia intersticial intercelular que compone el tejido óseo. Se puede dividir en:

- Sustancia fundamental, compuesta por
  - glucosaminoglucanos (GAG) como ácido hialurónico, condroitín sulfato, queratán sulfato.
  - Proteoglucanos de pequeño tamaño.
  - Proteínas exclusivas del hueso: osteocalcina (*BGLAP*), osteopontina (*SPP1*) y sialoproteína ósea.
  
- Colágeno: forma el 90% de la matriz orgánica predomina el colágeno tipo I.
  
- Sustancia inorgánica representada por depósitos submicroscópicos de fosfato cálcico, citrato, bicarbonato, fluoruro, magnesio e ión sodio.

Dentro de las células óseas se pueden diferenciar cuatro tipos: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los tres primeros tipos son estadios funcionales de un único tipo celular., mientras los osteoclastos tiene origen hematopoyético.

Las células osteoprogenitoras se originan a partir de células mesenquimales, las cuales se comprometen hacia una diferenciación en células formadoras de hueso como condroblastos u osteoblastos.

Los osteoblastos tienen su origen en las anteriores que inducidas por factores de crecimiento principalmente la proteína morfogenética del hueso – **BMP-2**, se diferencian a osteoblastos. En los primeros estadios de diferenciación comienzan a expresar colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteonectina entre otros. La función de los osteoblastos es sintetizar la matriz ósea y su actividad está regulada por la hormona paratiroidea y vitamina D. Esta hormona incrementa la reabsorción ósea y en respuesta a ella, los osteoblastos secretan un factor estimulante de los osteoclastos..

Los osteocitos, se forman a partir de los osteoblastos por diferenciación de éstos. Son similares a los osteoblastos pero menos activos y su función es la de sintetizar los componentes necesarios para el mantenimiento de la matriz que los rodea.

Los osteoclastos son conocidos como los magigafos del hueso, su función es destruir la matriz ósea mineralizada para que los osteoblastos puedan generarla de nuevo. A este proceso se le denomina reabsorción ósea y sus alteraciones son fundamentales en el desarrollo de enfermedades relacionadas con los huesos teniendo un papel principal en la osteoporosis.

El hueso es un tejido en constante renovación, en el que en situación normal se mantiene un equilibrio entre la formación y la reabsorción, es decir, entre la actividad osteoblástica y osteoclástica.

Durante las primeras etapas de la vida, niñez y adolescencia, predomina la formación ósea, para ir decreciendo y dando paso a la reabsorción a medida que vamos envejeciendo. Se calcula que en el hombre el pico máximo de mineralización se sitúa en torno a los 20 años, decreciendo, a partir de entonces, un 4% por década. En las mujeres se mantiene el pico de mineralización hasta la menopausia, perdiendo a partir de entonces un 15% por década (Prevention and management of osteoporosis...). De esta forma, aunque el número de fracturas osteoporóticas es difícil de cuantificar con exactitud, sabemos que su incidencia aumenta notablemente a partir de los 65 años en el varón y de los 45 años en la mujer, coincidiendo con la menopausia.

## 2.2. Osteoporosis: Definición y tipos

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente, caracterizada por una disminución de la masa ósea y por presentar alteraciones en la estructura del hueso (pérdida de calidad ósea), lo que sitúa al paciente en un riesgo incrementado de sufrir fracturas, especialmente de cadera, columna y muñeca (Consensus development conference...). Esta definición publicada por la organización mundial de la Salud (OMS) en 1993 se completó en 1994 con criterios diagnósticos fácilmente objetivables basados en la determinación de la densidad mineral ósea (DMO). Puesto que la cifra de densidad mineral ósea es un valor continuo, hubo que establecer un punto de corte para determinar cuándo dicho índice debía considerarse patológico. Así, se estableció como población de referencia las mujeres de 30 años. Se define, pues, la osteoporosis como la densidad mineral ósea inferior a 2.5

desviaciones estándar del promedio observado en la población sana a los 30 años (Kanis JA).

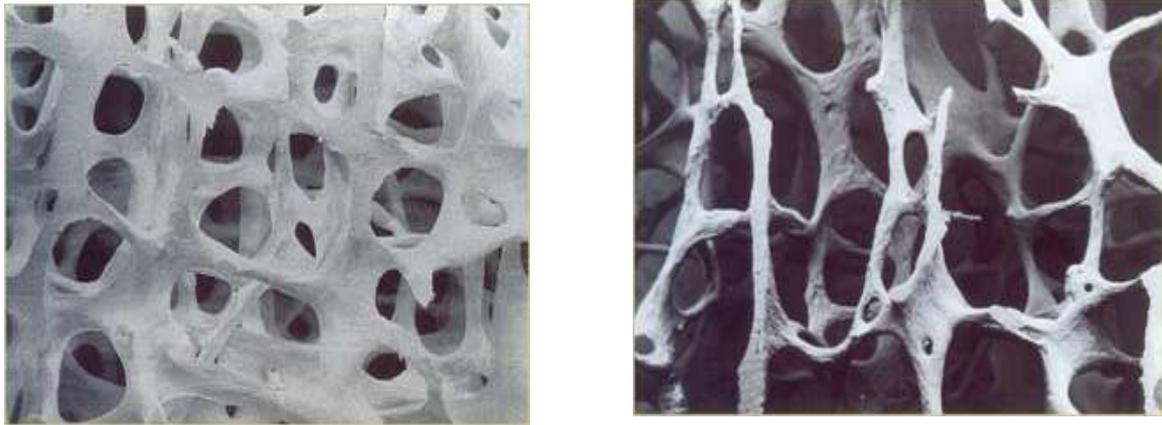
En la Tabla 1 podemos ver la clasificación actual.

**Tabla 1.** - Clasificación de la osteoporosis.

<b>Categoría</b>	<b>Criterios</b>
<i>Normal</i>	DMO +/- 1 DE del promedio de la población adulta joven.
<i>Osteopenia</i>	DMO entre -1 y -2.5 DE del promedio de la población adulta joven.
<i>Osteoporosis</i>	DMO > -2.5 DE del promedio de la población adulta joven.
<i>Osteoporosis establecida o grave</i>	Criterios de osteoporosis y una o más fracturas osteoporóticas.

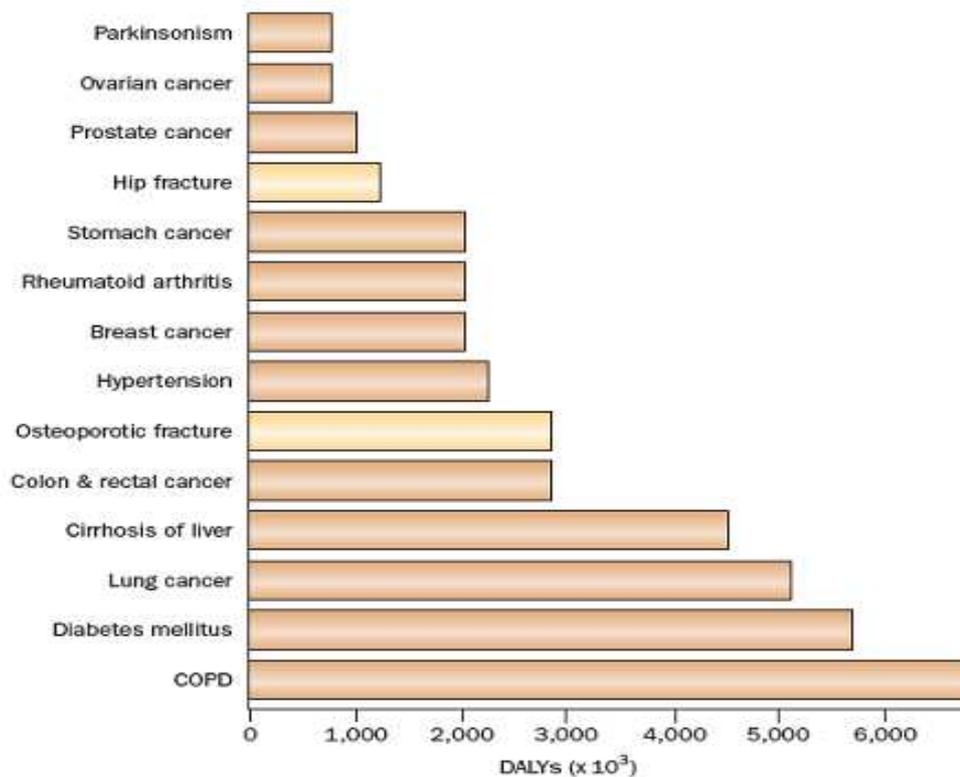
De Kanis y cols. en el informe de la OMS<sup>28</sup>. (DMO = densidad mineral ósea).

La osteoporosis es la enfermedad esquelética generalizada, una de la principales causas de morbilidad y el segundo problema en cuanto a importancia en el campo de la salud, tras las enfermedades cardiovasculares (Ferrandez L, Epidemiología de las fracturas osteoporóticas).



**Figura 1:** Comparación entre hueso normal y hueso osteoporótico.

En la Figura 2 podemos apreciar cómo las fracturas osteoporóticas suponen un problema sanitario de primer orden. En el informe de la Organización Mundial de la Salud del año 2004(The World Health report) que evalúa el estado de salud a nivel mundial, se pone de manifiesto cómo las fracturas osteoporóticas (y de forma singular las fracturas de cadera), producen una importante sobrecarga para los sistemas sanitarios al provocar una discapacidad que se va a prolongar a lo largo de la vida de los pacientes. Así, va a causar más años de discapacidad que la hipertensión o algunos tipos de cáncer.



**Figura 2.-** Carga de morbilidad expresada como años de vida ajustados en función de la discapacidad por causas (DALY). Tomado de: Informe Sobre la Salud en el Mundo en 2004, de la OMS<sup>29</sup>

La osteoporosis es una enfermedad que afecta a 3 millones de personas en España de las cuales 2.5 millones son mujeres( epidemiology Ferrandez), no obstante, sólo el 18% están diagnosticadas (Alvarez prevencion de la osteoporosis).

Esta patología, con tan graves repercusiones, se ha dividido clásicamente en dos grandes grupos en base a criterios etiológicos (Tabla 2):

**Tabla 2.-** Causas de la Osteoporosis.

---

***Osteoporosis primaria***

- *Involutiva*: posmenopáusica, senil.
- *Idiopática*: juvenil, del adulto.

***Osteoporosis secundarias***

- *Endocrinas*: hipogonadismos, S. de Cushing, hipertiroides, hiperparatiroides, diabetes tipo I.
  - *Digestiva*: malabsorción, hepatopatía crónica, postgastrectomía.
  - *Inflamatoria*: artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal.
  - *Enfermedades genéticas del tejido conectivo*: osteogénesis imperfecta, S. de Marfan, homocistinuria.
  - *Medicamentosas*: corticoides, hormonas tiroideas, anticoagulantes, anticonvulsivantes.
- 

Tomado de González Macías y cols..

Los principales determinantes del riesgo de fractura en una persona con osteoporosis son la cantidad de masa ósea y la alteración de la calidad del hueso. La cantidad de masa ósea en un preciso momento está determinada por dos factores; el pico de masa ósea alcanzado en la juventud y la pérdida de hueso que se haya sufrido posteriormente.

La Sociedad Española de Traumatología y Cirugía Ortopédica ha participado en varios estudios de osteoporosis y en la creación y publicación de guías y recomendaciones para el tratamiento de la enfermedad. Sus estudios revelan que únicamente el 18% de los pacientes con osteoporosis son tratados antes de producirse la fractura y de los pacientes que ya han padecido dicha fractura osteoporótica solo el 26 % continúa un tratamiento médico. Todo esto sugiere que actualmente no se siguen pautas adecuadas para el tratamiento de osteoporosis, ya que el tratamiento médico de estos pacientes puede ser un importante impacto en salud pública con el fin de reducir la cantidad de fracturas osteoporóticas.(Epidemiología de osteoporosis en fracturas en España Ferrandez portal).



## 2. Hipótesis



En la osteoporosis existe un desequilibrio en la remodelación del hueso puesto que la reabsorción ósea no está suficientemente compensada por la osteogénesis, lo que da como resultado un descenso en la masa ósea. Este descenso en la masa ósea es más acentuado en las áreas trabeculares, donde predominan los adipocitos sobre los osteoblastos. Dado que las células mesenquimales son los progenitores del estroma medular, y que tienen capacidad de diferenciación tanto hacia osteoblastos como de adipocitos, y que estos procesos están regulados estrechamente en el micromedioambiente medular, nuestra hipótesis de trabajo es que las células mesenquimales podrían presentar alguna alteración, tanto en su capacidad de expansión como en su fenotipo o en su capacidad de diferenciación, o incluso a nivel genómico, en pacientes con fracturas osteoporóticas. El estudio multiparamétrico de las células mesenquimales obtenidas a partir de hueso trabecular de pacientes con fracturas osteoporóticas de cadera, y su análisis comparativo con las células mesenquimales de MO de los mismos pacientes y de donantes sanos, podría ayudar a conocer mejor la fisiopatología de la enfermedad y podría también tener implicaciones terapéuticas.



### 3. Objetivos



**Objetivo global:**

Estudiar las características de las células mesenquimales obtenidas a partir de hueso trabecular de pacientes con fracturas osteoporóticas de cadera, analizándolas comparativamente con las células mesenquimales de MO, obtenidas mediante aspirado de cresta ilíaca postero-superior de los mismos pacientes y de donantes sanos.

**Objetivos específicos:**

- 1) Analizar si las CSM obtenidas de cabezas femorales de pacientes con osteoporosis presentan alteraciones en su capacidad de expansión in vitro (incluido el análisis del ciclo celular) o en sus características morfológicas o inmunofenotípicas con relación a las CSM de MO de los mismos sujetos y a las CSM de MO de donantes sanos.
- 2) Evaluar su capacidad de diferenciación multilineal, con especial énfasis en el estudio cuantitativo de la capacidad de diferenciación osteogénica y la capacidad de mineralización en los tres grupos experimentales estudiados.
- 3) Estudiar la presencia de alteraciones genómicas en las MSC de pacientes con fractura osteoporótica de cabeza femoral, en las CSM de cresta ilíaca de los mismos sujetos y en los donantes sanos.
- 4) Analizar el perfil de expresión génica de las CSM de cabezas femorales de pacientes con osteoporosis en relación con CSM control, con un especial interés en los genes y en las vías de señalización relacionadas con la osteogénesis..



## 4. Material y Métodos



## **4.1- MATERIAL**

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron las muestras que se indican a continuación procedentes de la cresta iliaca y de la cabeza femoral. En todos los casos se obtuvo previamente el correspondiente consentimiento informado de acuerdo a las normas éticas y de buena práctica clínica establecidas por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca.

### **4.1.1.PACIENTES:**

- De 26 pacientes diagnosticados de osteoporosis se obtuvo la cabeza femoral y en el mismo acto quirúrgico se les extrajo una muestra de médula ósea por aspirado de la cresta iliaca. La mediana de edad fue 84 años (rango: 74-97) y la relación hombres / mujeres (7/19).
- Como muestras control se usó médula ósea de cresta iliaca procedente de 30 donantes sanos voluntarios. La mediana de edad fue 46 años (rango: 27-85) y la relación hombres / mujeres (14/16)

La extracción de las cabezas femorales se realizó en el transcurso de intervenciones quirúrgicas de artroplastia parcial y total de la cadera en el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario “Virgen de la Vega” de Salamanca.

## 4.2-MÉTODOS

### 4.2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

#### 4.2.1.1 MÉDULA ÓSEA:

La extracción de médula ósea se realizó, dependiendo de la situación clínica, bajo anestesia general o bajo anestesia locoregional, por punción en la espina ilíaca postero-superior. Se utilizaron tubos estériles (Venoject; Terumo®) a los que se añadió heparina libre de aditivos (*Heparina 5000U/ml; Seromed Biochrom KG*), reconstituida con agua destilada Vitulia estéril (*Laboratorios ERN, SA*).

#### 4.2.1.2 CABEZA FEMORAL

Para la colocación de la prótesis la vía de abordaje utilizada fue la postero-lateral (Gibson A), por lo que el paciente fue colocado en posición decúbito lateral con flexión de la cadera y rodilla contra-lateral en contacto con el plano de la mesa y fijación del miembro con vendaje adhesivo. Se bloqueó la pelvis y el raquis lumbar mediante dos soportes. (Figura 1).



**Figura 1** : Posición del paciente en la mesa quirúrgica

Una vez extraídas, las cabezas femorales fueron troceadas en varios fragmentos con la ayuda de una sierra oscilante (*Striker Ibérica, Madrid, Spain*), la misma que se empleó para la realización de la osteotomía en el cuello femoral. En el mismo ambiente estéril, los fragmentos óseos fueron triturados en un molinillo para hueso con cuchilla de 5 mm, *Aesculap GB40 (Aesculap, Tuttlingen, Alemania)* (Fig 2), tal y como ha sido previamente descrito por nuestro grupo (Sanchez-Guijo F.M.et al).



**Figura 2:** Molinillo modelo Aesculap GB40 empleado en el estudio.

Los pequeños fragmentos de hueso trabecular ( $\leq 5$  mm de diámetro) se introdujeron en un contenedor estéril con solución salina y fueron procesadas inmediatamente en la Unidad de Terapia Celular y Cultivos Celulares en cámara de flujo laminar y bajo rigurosas condiciones de esterilidad.

#### 4.2.2. SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS

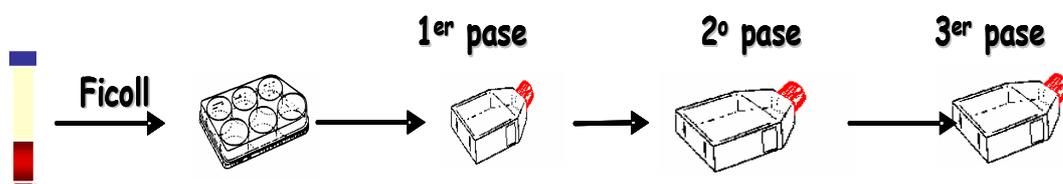
Tras comprobar la ausencia de coágulos en la muestra de aspirado de la médula ósea (MO), esta se diluyó en medio de Hanks en una proporción 2/3 del volumen total y posteriormente se centrifugo sobre Ficoll-Paque™ Plus (densidad:1.077k, GE Healthcare Bio-Sciences AB) durante 30 minutos a 500 g. siguiendo el método descrito previamente por Minguell y cols. Las células mononucleadas (CMN) recuperadas de la interfase se lavaron 2 veces con medio de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution with Phenol Red, BioWhittaker Lonza Verviers, Belgium*) durante 10 minutos a 300g. Finalmente el botón celular se resuspendió en 1ml del medio de expansión descrito para células stem mesenquimales (Villaron) consistente en: Dulbecco's Modified Eagle's médium-low glucosa (*DMEM, Gibco Invitrogen Paisely, UK*) suplementado con 10% Suero Bovino Fetal (*SBF, BioWhittaker® Lonza, Verviers, Belgium*) y 1% Penicilina $10^4$ U/ml/Estreptomicina $10^4$ µg/ml (*Gibco, Invitrogen, Paisely, UK*) y se procedió al recuento celular en cámara de Neubauer.

Para el procesamiento de las células procedentes de la cabeza femoral, se siguió el protocolo descrito por Sánchez-Guijo et al(cita). Una vez recibidas las muestras en la Unidad de Terapia Celular se diluyeron en Hanks (*Hanks Salt Solution, Seromed® Biochrom KG*) y se filtraron a través de filtros con un tamaño de poro de 40µm (*Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA*). Se colocó el contenido en tubos cónicos de 50 ml con 15 ml de Ficoll-Paque™ Plus y posteriormente se procesaron como se ha especificado en el parrafo previo.

### 4.2.3. AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CSM

Las CMN, tanto de médula ósea como de cabeza femoral, se plantaron a una concentración de  $10^6$  CMN/cm<sup>2</sup> con medio de expansión de células stem mesenquimales y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Dos veces por semana se recambió la totalidad del medio y las células no adheridas fueron desechadas. Este cultivo se mantuvo hasta que las células adheridas fueron desechadas. Este cultivo se mantuvo hasta que las células adherentes llegaron al 80-90% de confluencia. En este momento, se retiró todo el medio de cultivo del frasco, se lavó con PBS estéril (*GIBCO Invitrogen Corporation, Paisely, UK*) y se incubó con tripsina 0.05% 1X (*GIBCO Invitrogen Corporation, Paisely, UK*) durante 8 minutos a 37°C. Posteriormente, se neutralizó la tripsina añadiendo medio de expansión de células mesenquimales. Para aumentar el número de células, las células se plantaron de nuevo a concentración de 5.000 células/cm<sup>2</sup> en frascos de cultivo de mayor superficie.

Tras el 3<sup>er</sup> pase se obtuvieron las células stem mesenquimales que fueron caracterizadas, analizada su pureza y utilizadas para el resto de los estudios (figura 3).



**Figura 3:** Expansión hasta tercer pase de las MSC obtenidas de aspirado de espina ilíaca y cabeza femoral.

#### 4.2.4. CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA

La caracterización inmunofenotípica se realizó en CSM en fase 3 empleando el siguiente panel de anticuerpos monoclonales y en las siguientes combinaciones cuádruples de colores (FITC/PE/PerCPCy5.5/APC) mediante la técnica de inmunofluorescencia directa con los anticuerpos monoclonales indicados y marcados con el fluorocromo correspondiente, según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular.(Dominicci)

Tubo 1: **CD90/CD106/CD45/ \_**

Tubo 2: **CD34/CD166/anti-HLA-DR/CD105**

Tubo 3: **CD14/CD73/CD19/ \_**

En todos los casos se utilizaron como control, células de la misma muestra sin marcar con anticuerpos. En la tabla 1, se muestran las cantidades necesarias según el anticuerpo monoclonal utilizado. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA*), equipado con un láser de argón sintonizado a una longitud de onda de 488 nm que emite a una potencia constante de 15 mVatios. La calibración del instrumento se llevó a cabo utilizando los protocolos previamente establecidos por nuestro grupo (Villaron). El soporte informático empleado para la adquisición de muestras fue el programa CellQuest® (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA*) y para el análisis, el programa informático PAINT-A-GATE-PRO™ (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA*) . Se adquirieron un total de 50.000 células por cada tubo.

**Tabla 1:** Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio del inmunofenotipo de las CSM.

	<b>FLUOROCROMO</b>	<b>CLON</b>	<b>ISOTIPO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<b>CD14</b>	FITC	M□P9	MouseIgG <sub>2b</sub> K	Becton-Dickinson Bioscences, San Jose CA, USA
<b>CD19</b>	PerCP Cy5.5	SJ25C1	Mouse IgG <sub>1</sub> K	Becton-Dickinson Bioscences, San Jose CA, USA
<b>CD34</b>	FITC	8G12	Mouse IgG <sub>1</sub> K	Becton-Dickinson Bioscences, San Jose CA, USA
<b>CD45</b>	PerCP Cy5.5	2D1	Mouse IgG <sub>1</sub> K	Becton-Dickinson Bioscences, San Jose CA, USA
<b>CD73</b>	PE	AD2	Mouse IgG <sub>1</sub> K	Becton-Dickinson Pharmingen Bioscences, San Jose CA, USA
<b>CD90</b>	FITC	5E10	Mouse IgG <sub>1</sub> K	Becton-Dickinson Pharmingen Bioscences, San Jose CA, USA
<b>CD105</b>	FITC	2H6F11	Mouse IgG <sub>1</sub> K	R&D System Mineapolis, USA
<b>CD106</b>	PE	51-10C9	Mouse IgG <sub>1</sub> K	Becton-Dickinson PharmingenBioscences, San Jose CA, USA
<b>CD166</b>	PE	3A6	Mouse IgG <sub>1</sub> K	Becton-Dickinson Pharmingen Bioscences, San Jose CA, USA
<b>Anti- HLA-DR</b>	PerCP	L243	Mouse IgG <sub>1</sub> K	Becton-Dickinson Pharmingen Bioscences, San Jose CA, USA

**FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína; **PE:** Ficoeritrina; **PerCP Cy5.5:** proteína peridinin clorofílica cianina 5.5; **APC:** Alofococianina

#### 4.2.5. ENSAYOS DE CICLO CELULAR:

Para el análisis del ciclo celular de las CSM en fase 3, en primer lugar se procedió al marcaje de membrana utilizando los anticuerpos CD90 en FITC (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose CA USA*). Las células se incubaron durante 15 minutos en oscuridad, tras el lavado se incubaron con Ioduro de Propidio que se une de forma estequiométrica al ADN, utilizando el Cycle Test DNA Reagent Kit (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose CA USA*) tal y como se ha descrito por parte de nuestro grupo (San Miguel). Se adquirieron un total de 50.000 células, en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose CA USA*) utilizando el programa informático CellQuest® (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose CA USA*) Dichos eventos se analizaron mediante el programa PAINT-A-GATE-PRO™ (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose CA USA*) con el que se seleccionó la población de interés para posteriormente con el programa ModFit LT for Mac (*verity Software House, Inc, ME, USA*) analizar el ciclo celular.

#### 4.2.6. DIFERENCIACION MULTILINEAL DE LAS CSM:

Diferenciación Osteogénica: Se plantaron dos muestras en paralelo, una para diferenciación hacia osteoblastos y la otra se utilizó como control manteniéndose en las mismas condiciones (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, humedad >90%). El medio de diferenciación osteogénica (*NH Osteodiff Médium, Miltenyi, Bistec, Germany*) utilizado estaba compuesto por β-glicerol fosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona y suero bovino fetal. Estos cultivos se mantuvieron durante 10 días. El recambio de medio se realizó cada 3-4 días. Trascurrido este tiempo, se lavaron los cultivos con PBS, se fijaron con etanol frío al 70% (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) durante 10 minutos. Para comprobar la diferenciación se analizó la actividad fosfatasa alcalina mediante tinción con la solución NBT/BCIP (*Nitroblue tetrazolium chloride 5 bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche, Basel, Switzerland*) durante 20-30 minutos. y se contrastaron con 1 mL de hematoxilina (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) durante 2 minutos.

Diferenciación Adipogénica: Se realizó un procesamiento similar al anterior. Al alcanzar la confluencia uno de los frascos se incubó con medio de diferenciación a adipocitos (*NH Adipodiff Médium, Miltenyi Biotec, Alemania*) formado por DMEM suplementado con 1% de penicilina-estreptomina, 10% de suero fetal, 10% de suero de caballo e insulina (*Sigma-Aldrich Co*) a una concentración final de 100ng/ml y el otro frasco se incubó con medio de expansión de células mesenquimales y sirvió de control negativo, ambos en las mismas condiciones de humedad, temperatura y concentración de CO<sub>2</sub> durante 21 días. Para comprobar la existencia de acúmulos lipídicos citoplasmáticos se

utilizó la tinción con Rojo al aceite-O. (*Oil-Red\_O solution, Certistain® Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) Para ello se retiraron los medios de diferenciación y expansión y se fijaron las muestras con formaldehído al 3.7% (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) durante 2 minutos. Después se añadió 1ml de solución de Oil-red-O, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta.

Diferenciación Condrogénica: Se llevó a cabo en cultivo en tres dimensiones. Para ello, en dos tubos Falcon cónicos de polipropileno de 15 mL (*Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA*) se centrifugaron entre  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  de células por tubo. Los botones celulares obtenidos se cultivaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, uno de ellos con 500 microlitros de medio de diferenciación a condrocito (*NH Chondrodiff Medium, Miltenyi Biotec, Alemania*) y el otro, con medio de expansión de mesenquimales, que sirvió como control negativo. El medio para inducir la diferenciación a condrocito esta compuesto de DMEM, suero bovino fetal, L-Glutamina y TGFβ-1. Estos medios se cambiaron cada 3-4 días y tras 21 días de cultivo los botones celulares se incluyeron en parafina, para ser cortados en secciones de 5 mm de grosor con criostato (*MIKROM HM 505 N Criostat, San Marcos, Canada*) Para comprobar la diferenciación a cartílago se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica mediante fluorescencia indirecta. Los cortes se marcaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-agrecano humano (*Chemicon Internacional, Germany*) durante 48 horas a 4°C seguido de incubación con anticuerpos secundarios de cabra anti-Mouse IgG conjugados con Cy3 (*Vector, Burlingame, CA USA*) una hora y media a temperatura ambiente. Finalmente se tiñeron los núcleos con 4'-6-Diamidino-2-phenylinole (*Dapi, Sigma*,

Buena, NJ). El análisis de la muestra se realizó en un microscopio de fluorescencia (Leica DMI6000 B, Wetzlar, Germany) con los filtros correspondientes al fluorocromo utilizado.

#### 4.2.7. CUANTIFICACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA DE CSM

Para valorar mejor la capacidad de diferenciación a hueso, se cuantificaron los depósitos de calcio existentes tras la inducción con medio de diferenciación osteogénica según la técnica descrita por Gregory et al.

En la capacidad de diferenciación osteogénica se puede distinguir tres etapas:

- *Fase de proliferación celular* del día 0 al día 4-7 donde las células se están dividiendo y empiezan a aparecer los primeros osteoblastos.
- *Fase de maduración* del día 7 al 14 como el nombre indica se forman y maduran los osteoblastos.
- *Fase de mineralización*, ocurre en los últimos días del proceso, a partir del 14.

Se plantaron 70.000 CSM en fase 3 tanto de médula ósea de cresta iliaca y de cabeza femoral del mismo paciente con osteoporosis como de cresta iliaca de donantes sanos, en tres placas de Petri de 9,6 cm<sup>2</sup>. Una de las placas

sirvió de control negativo. Las otras dos placas se utilizaron para diferenciación osteogénica, tal y como se ha descrito previamente y se mantuvieron durante 14 y 21 días respectivamente. El medio se renovó cada 3-4 días. Una vez transcurrido ese tiempo se procedió a la tinción con Rojo de Alizarina 40mM pH 4,2 (*Sigma, Switzerland*). Tras eliminar el sobrenadante se fijaron las células con formaldehído al 4% (*Merck, Darmstadt, Germany*) durante 10 minutos, se lavaron y se tiñeron con 1ml de Rojo Alizarina durante 20 minutos. Finalmente se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

Para el ensayo cuantitativo, se despegó la capa adherente de células con ácido acético glacial al 10% y fue trasferida a un tubo Eppendorf al que se añadió aceite mineral (*Fluka, Biochemika*) y se calentó a 85°C durante 10 minutos para extraer todo el colorante del interior de las CSM. A continuación, se enfrió rápidamente en hielo para detener la reacción de extracción del colorante por calor. El sobrenadante se mezcló con Hidróxido amónico al 10% (*Panreac, Barcelona, España*) para conseguir un pH = 4, y se midió por colorimetría a una longitud de onda de 405 nm en el lector de placas Asys UVM 340 de fondo transparente y paredes opacas.

La mineralización a 14 y 21 días se determinó con el cociente entre la concentración de rojo de Alizarina en cada uno de estos tiempos respecto a la expresión basal en CSM sin diferenciar. Y para ver como variaba dicha concentración en la fase de mineralización se realizó la ratio entre ambos tiempos.

## 4.2.8 ESTUDIO GENÓMICO MEDIANTE CGH-ARRAY

Con el fin de valorar la existencia de alteraciones genómicas no balaceadas, se analizaron 4 pacientes diagnosticados de osteoporosis siendo dos de ellos varones y los otros dos mujeres. para lo cual se estudio el genoma de las CSM en tercer pase procedentes de cabezas femorales y médula ósea, del mismo paciente.

### 4.2.8.1. Diseño del microarray genómico

El microarray genómico sobre el que se realizaron las hibridaciones de las muestras se diseño a partir de la librería “1Mb clone set” cedida por el Dr Nigel Carter, Wellcome Trust Sanger Institute, Inglaterra. La librería consta de 3.523 BACs con un tamaño medio de inserto de 165 Kb) . Además de estos BACs, se incluyeron como controles negativos internos del microarray 5 clones de *Drosophila melanogaster* (23N02, 35P22, 39C21, 45L08 y 47P08; Genoteca CHORI221), 1 de *Schizosaccharomyces pombe* (cos 1782) y 99 de la solución DMSO al 50% (Dimetil sulfoxido, Merck). Como controles positivos se incluyeron 12 diluciones seriadas de mezclas de productos de la DOP-PCR. Los controles tanto negativos como positivos se *distribuyeron* aleatoriamente por el portaobjetos (Robledo C). El contenido de cada clon se encuentra disponible en la web “Cytoview” de Sanger Institute ([http:// www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Lo primero que se realizó fue la **réplica de la librería**. Para ello, se inoculó la colonia a crecer en cada pocillo de la placa de 96 pocillos con medio de cultivo LB (10gr/l Peptona, 5gr/l Extracto de levadura, NaCl 5gr/l) y el antibiótico apropiado, bien Cloramfenicol (*Sigma*) o Kanamicina (*Sigma*), dependiendo del clon que se vaya a crecer. Se inoculo durante 16h a 37°C. El **cultivo**

**bacteriano de *Escherichia Coli*** en medio de cultivo 2x YT (16gr/l Peptona, 10gr/l Extracto de levadura, 5gr/l NaCl) se realizó para la obtención de una gran cantidad de ADN de los clones insertos. Se inoculó una colonia bacteriana en cada pocillo de la placa y se incubó durante 16h a 37°C. La extracción del ADN bacteriano junto con el inserto se efectuó, utilizando el método de tiocianato-fenol-cloroformo.

Tras la comprobación cualitativa de los ADNs extraídos mediante electroforesis en gel de agarosa se realizaron para cada clon tres PCR con oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR). Se emplearon tres cebadores (*Termo, Electrón Corporation*), descritos a continuación, para la amplificación del ADN humano (Fiegler, 2003 462 /id).

**Cebadores:**

**DOP 1:** 5' –CCG ACT CGA GNN NNN NCT AGA A-3'

**DOP 2:** 5'-.CCG ACT CGA GNN NNN NTA GGA G-3'

**DOP 3:** 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NTT CTA G-3'

Donde N puede ser cualquiera de los cuatro ácidos nucleicos ( A,T,C,G).

La reacción de DOP-PCR se realizó en la siguiente solución de reacción TAPs (*"N-Tris[Hydroxymethyl]methyl-3-aminopropane-sulfonic acid"* Sigma), dNTPs 25 mM (*Roche*), Taq-Polimerasa 5U/μl (*Promega*).y W-1 al 1% (*Polioxietilen eter, Sigma*).

El programa de amplificación utilizado fue:

**94°C-4'30'' \_\_\_\_\_ 30°C 2'30'' \_\_\_\_\_ 10 ciclos**

**72°C-3' \_\_\_\_\_ 94°C 1' \_\_\_\_\_ 60°C 1'30'' \_\_\_\_\_ 72°C 10' \_\_\_\_\_ 30 ciclos**

**12°C ∞**

Una vez obtenidos los productos de DOP-PCR (dianas) resuspendidos en DMSO al 50%, se procedió al depósito robotizado, *robot Microgrid II* (*Biorobotics*). Finalmente se depositaron los ADN de los BACs sobre un soporte sólido (soporte de cristal con recubrimiento de amino-silano) por triplicado, y fueron fijadas a 80°C durante 2h. Para comprobar que el proceso de depósito había sido correcto, los portaobjetos se escanearon usando el "scanner GenePix 4000 B" (*Axon Instruments*) (Later NP)(Fieglerh).

#### 4.2.8.2. Preparación del ADN a hibridar (sonda)

Se extrajo el ADN de los cultivos de CSM utilizando, como se ha descrito en apartados anteriores, el método de tiocianato-fenol-clororformo (Chomczynski & Sacchi, 1987). Se determinó la concentración y pureza del ADN mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro, Nanodrop nd-1000.

La digestión del ADN de las muestras problema y de las muestras de referencia se llevó a cabo a través de la enzima *endonucleasa DpnII* (*Enzima DpnII 10.000 U/ml, Biolabs*) 37°C durante 2 horas. La reacción se detuvo aumentando la temperatura a 65°C 20 minutos. Obtuvimos fragmentos entre 50-800 pares de bases que fueron purificados y marcados mediante el empleo del kit Bio Prime DNA Labeling System<sup>®</sup> (*Invitrogen, Paisely, UK*), con marcadores fluorescentes Cy3 (colorante de Cyanina-3 color verde Dna control) y Cy5 (colorante fluorescente de Cyanina-5 color rojo DNA problema)(*CyDye<sup>TM</sup> 3,5-dCTP. Amersham Biosciences*). La incorporación del nucleótido marcado se cuantificó empleando el espectrofotómetro Nanodrop a las absorbancias de 260nm, 320nm, 550nm, 650nm y 750nm. (Tabla 2)

**Tabla 3:** Longitudes de onda ( $\lambda$ ) medidas mediante el espectrofotómetro de los fluorocromos (Cy3 y Cy5) empleados en el marcaje del ADN.

	<b>Fluorocromo</b>	
	<b>Cy3</b>	<b>Cy5</b>
<b>Línea basal</b>	650 nm	750 nm
<b>Absorbancia</b>	550 nm	650 nm
<b>Excitación</b>	550 nm	650 nm
<b>Emisión</b>	570 nm	670 nm

Así se calculó la cantidad de ADN obtenida; la cual debe de ser mayor de 2,8  $\mu\text{g}$ .

Es muy interesante conocer la cantidad de nucleótidos marcados que se incorporaron en nuestras muestras de ADN para conocer la eficacia de la reacción de marcaje para cada fluorocromo:

$$[\text{Cy3}]_{\text{pmoles}} = (A_{550} - A_{650}) / 0,15 \times \text{volumen de sonda } (\mu\text{l})$$

$$[\text{Cy5}]_{\text{pmoles}} = (A_{650} - A_{750}) / 0,25 \times \text{volumen de sonda } (\mu\text{l})$$

#### 4.2.8.3. Hibridación de las sondas sobre el microarray genómico

Para que la hibridación se efectuara de forma adecuada, se mezcló la misma cantidad de cada sonda marcada, muestra y control, con 100 $\mu\text{g}$  de ADN Cot-1 humano, ADN enriquecido en secuencias altamente repetitivas, (*Cot Human ADN 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Roche,Penzberg, Germany*) ( Vermeesch, 2005 463/id) y se incubaron con acetato sódico 3M pH5 (*Winkler Gmb&Co,KG*) 30 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se añadió Yeast-t RNA 100µg/µl (*Ambion Applied Biosystem, Austin, USA*) junto con la solución de hibridación (50% formamida (*Merck, Darmstadt, Germany*), 10% dextransulfato (*Amersham Pharmacia Biotech AB*), 2x citrato salino estandar, 10mM tris pH 7,6, 2,7% de sodio dodecyl sulfato) que se calentó a 70°C. para desnaturalizar y preanillar la sonda.

El soporte del microarray se pretrato a 42°C con una solución de formamida (*Merck, Darmstadt, Germany*).

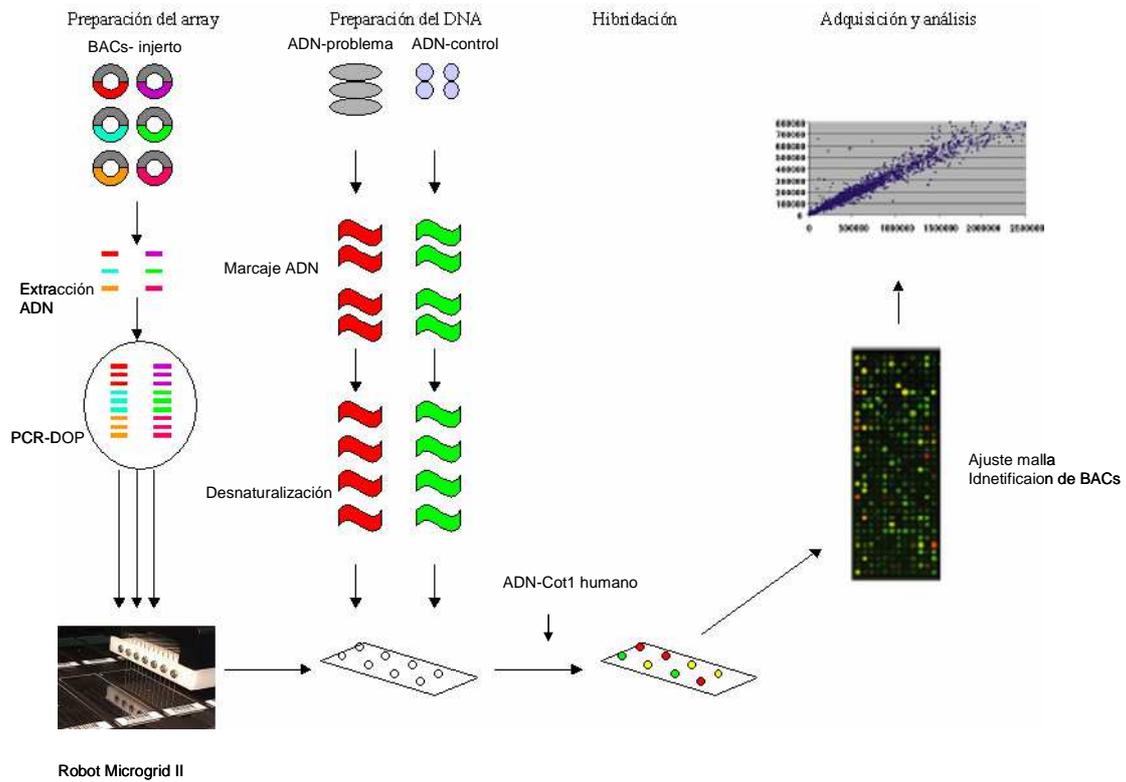
La hibridación del microarray junto con las sondas y los lavados post-hibridación, se realizaron en la estación de hibridación automatizada TECAN HS-4800 pro, siguiendo el protocolo del fabricante.

Finalmente el microarray fue secado al vacío.

#### **4.2.8.4. Adquisición de imágenes y análisis de los resultados**

Una vez realizada la hibridación del porta, el microarray se escaneó simultáneamente a 532 y 635 nm, longitudes de onda para el Cy3 y Cy5 respectivamente, usando el laser escáner dual GenePix4000B (*Axon Instruments, Toronto, Canada*). Para la identificación de los BACs se ajusto una malla sobre el array lo que permitió identificar cada punto con su clon correspondiente. Se eliminaron los clones que no estuvieran bien hibridados y se comprobó la falta de hibridación en los controles negativos

Los datos del GenePix se exportaron a Microsoft-Excel donde se analizaron los resultados.. El ratio de las intensidades de los dos fluorocromos se convirtió en el log2 de la relación, intensidad Cy3/intensidad Cy5 (Herrero J). Se calculó la mediana, de los análisis realizados por triplicado y se obtuvo un único valor para cada punto lo que permitió obtener la intensidad relativa de cada clon.



**Figura 2:** Representación esquemática de la metodología de los microarrays genómicos desde el diseño del microarrays hasta el análisis de los resultados.

#### 4.2.9. ESTUDIO GENÓMICO MEDIANTE MICROARRAYS DE EXPRESIÓN

Se analizó el patrón de expresión génica mediante microarrays, para ello se utilizó la plataforma de Affymetrix® de oligonucleótidos HU133A plus 2, que contiene 22.283 secuencias, que identifican aproximadamente 13.000 genes.

La extracción de ARN se realizó a partir de CSM en 3<sup>er</sup> pase utilizando el método de tiocianato-fenol-clororformo (Chomczynski & Sacchi, 1987). Para medir la

concentración y al mismo tiempo valorar la integridad de ARN, se utilizó el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent, Palo Alto, CA*) con el kit “RNA 6000 Nano LabChip”.

La transcripción reversa fue realizada según <sup>30</sup>. Un  $\mu\text{g}$  de ARN total se agregó a una mezcla de 20  $\mu\text{L}$  de volumen final conteniendo hexámeros random y 200 U de *Super Script Rnase H reverse transcriptase* (*Invitrogen, California, EEUU*). Se incubó a 42°C durante 45 minutos, 3 minutos a 99°C y 30 minutos a 25°C. Para comprobar que la síntesis del ADNc era correcta se realizó un gel de agarosa al 1,6% (0,8% Agarosa en 50 ml de Tris base 0,004M, ácido bórico 0,001M, EDTA 0,5M (TBE) pH 8).

Una vez sintetizado el ADNc de doble cadena, se realizó una transcripción *in vitro* (IVT), síntesis de ARNc, y un marcado fluorescente mediante el kit de Enzo®. Se mezcló ADNc con 10X HY Reaction Buffer, 10X Biotin Labeled ribonucleotides, 10X DTT, 10X RNase Inhibitor Mix, 20X T7 RNA Polymerase y se incubó durante 5h.

Posteriormente se procedió a la fragmentación de 25  $\mu\text{g}$  de ARNc a 95°C con  $\text{MgCl}_2$  10mM, y *Fragmentation Buffer* (200 mM Tris-acetate pH 8.1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) para obtener fragmentos de ARNc entre 35 y 200 pares de bases. Se hibridó 15  $\mu\text{g}$  del ARNc fragmentado de cada muestra sobre el GeneChip de Affymetrix® durante 16 horas a 45°C con rotación constante a 0,4 g. Después de la hibridación, se realizó la tinción con estreptavidina-ficoeritrina (*SAPF 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$* ) y anticuerpos anti-estreptavidina biotinilados (3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Tras las tinciones y lavados, estos chips fueron escaneados con un “GeneArray Scanner Versión G2.500A” de Agilent. y el resultado se comprobó con el programa Microarray Suite 5.0 (*MAS 5.0, Affymetrix*).107,108

Los datos proporcionados por la hibridación de los microarrays, se normalizaron mediante los algoritmos, RMA (Robust Multichip Average) y MAS5 (“micorarrays analysis suite”)

Con el fin de *filtrar* los datos se eliminó la información de todas aquellas sondas de baja intensidad (< 100.) y de las sondas que apenas presentaron variación entre los arrays, es decir, que la diferencia entre la sonda que presenta mayor intensidad y la que presenta menor intensidad es muy pequeña. Finalmente los niveles de expresión se transformaron en logaritmos en base 2.

El algoritmo usado en los *análisis no supervisados* (Eisen MB, Spellman PT) fue el agrupamiento jerárquico (“Hierarchical clustering”). Para aplicarlo se partió del fichero generado tras la normalización y el filtrado. Los resultados de estos análisis se representan en forma de dendrogramas y mapas de colores (heatmaps).

Para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas (*análisis supervisado*) (Tusher UG, Tibshirani) se usó el programa del algoritmo SAM (significant analysis of microarrays) y también el SPOTFIRE 9.1 de datos apareados o no apareados según el tipo de estudio. Para realizar el análisis SAM se generó un archivo-tabla de salida que contenía la siguiente información: **identificador del gen, d-value** (o score) o marcador del cambio del gen para la comparación realizada, **p value** (significación estadística del d-value), **fold change**” o medida del cambio del gen entre los grupos.

Para el *análisis de rutas metabólicas* se utilizó el programa comercial “Ingenuity Pathways Análisis” (IPA). A partir del archivo generado con el programa SAM. Este programa permite agrupar los genes con expresión

diferente en rutas biológicas, asignando un color diferente (rojo o verde) en relación con el nivel de expresión.

#### 4.2.10. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RQ-PCR)

Para la PCR cuantitativa se utilizó el equipo Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) con ensayos comerciales TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los genes analizados son los que se muestran en las tablas 3 y 4, así como el número de identificación de cada ensayo.

Se utilizaron 2 µL (40 ng) de ADNc que se agregaron a una mezcla con 5µL de TaqMan® Fast Master Mix, 0.5 µL del ensayo de expresión comercial en un volumen final de 10 µL. Las condiciones de termociclador fueron:

**50°C-2min, 50 ciclos x (95°C-15seg; 60°C-1min).**

El ciclo en el cual la reacción superaba un umbral determinado (**Ct**) sirvió para cuantificar la expresión del gen en estudio respecto a un gen control (ABL1), por medio de fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ <sup>31</sup> donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen en estudio}} - Ct_{\text{ABL1}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Paciente}} - \Delta Ct_{\text{MO sana (mediana)}}$$

**Tabla 3:** Genes estudiados para confirmar la diferenciación osteogénica

<b>NÚMERO DE CATÁLOGO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>NOMBRE</b>
Hs03046558_s1	ALP	Fosfatasa Alcalina
Hs01587814_g1	BGLAP	Proteína Carboxiglutamato $\gamma$ ósea
Hs01055564_m1	BMP 2	Proteína morfogenética ósea
Hs01076777_m1	COL1A	Colágeno tipo I
Hs00183740_m1	DKK 1	Dickkopf related protein 1
Hs00541729_m1	SP7	Osterix
Hs02621719_u1	IL 6	Interleucina 6
Hs00231692_m1	RUNX2	Factor de transcripción de Run
Hs00277762_m1	SPARC	Osteonectina

**Tabla 4:** Genes estudiados para confirmar los resultados de microarrays de expresión

NÚMERO DE CATÁLOGO	DESCRIPCIÓN	NOMBRE
Hs00180066_m1	SFRP4	Secreted frizzled related protein 4
Hs00198830_m1	RBP4	Proteína transportadora de Retinol
Hs00270931_s1	CEBPD	CCAAT enhancer binding protein delta
Hs00371239_m1	AEBP1	Adipocyte enhancer binding protein 1
Hs00897273_m1	PDE1A	Fosfodiesterasa 1 <sup>a</sup>
Hs01547870_m1	HSD11B1	11 beta 1 hydroxysteroid dehydrogenase 1
Hs00610060_m1	SFRP1	Secreted frizzled related protein 1
Hs00231692_m1	RUNX2	Factor de transcripción de Run
Hs00947539_m1	PPAR	Peroxisome proliferative activated receptor

#### 4.2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto para la realización de la estadística descriptiva general como para el análisis comparativo de los datos obtenidos en este trabajo se utilizó el programa informático SPSS 15.0 para Windows (*Chicago, IL, EEUU*).

Se calcularon los valores de la mediana y el rango para cada una de las variables. La comparación de variables cuantitativas se realizó mediante la T de Student o el test no paramétrico correspondiente (*U de Mann-Whitney para variables independientes*).

Las diferencias observadas se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de “p” fue inferior a 0.05.



## 5. Resultados



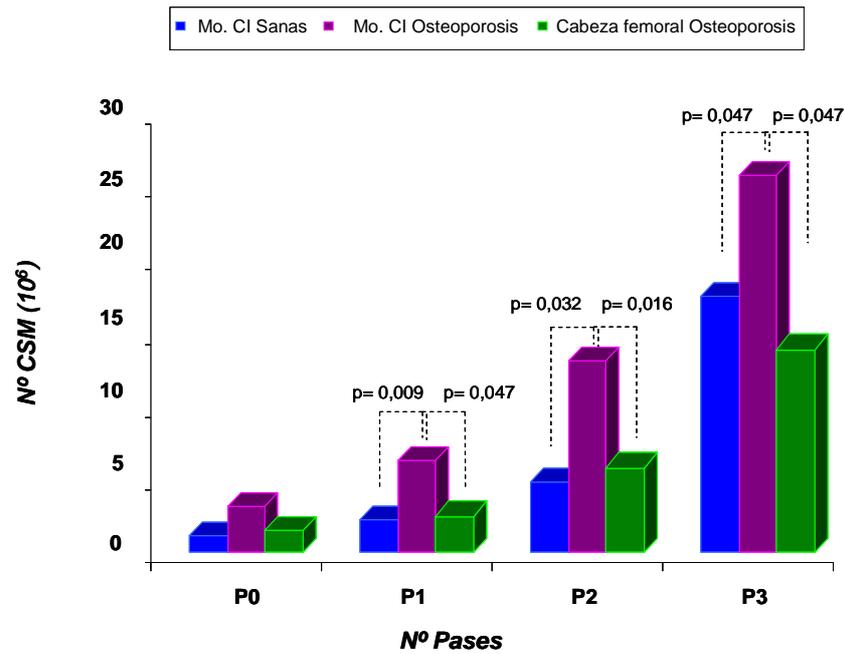
## **5.1 ESTUDIOS DE EXPANSIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CSM.**

### **5.1.1 Cultivo y expansión celular**

Se expandieron CSM de las todas las muestras, procedentes de cabeza femoral y cresta iliaca de los pacientes con osteoporosis así como de cresta iliaca de individuos sanos y se mantuvieron en cultivo hasta el cuarto pase. La morfología de las CSM fue muy similar en todos los grupos, observándose en todos los casos células con un característico aspecto fibroblástico con largas prolongaciones.

La mediana del tiempo necesario hasta alcanzar cuarto pase, fue de 47 días (rango:28-74 días), siendo las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis las primeras en alcanzar cuarto pase no existiendo diferencias significativas entre ninguna de las muestras del estudio y en ningún pase.

El número de CSM obtenidas a partir de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis fue similar al número de CSM obtenidas a partir de médula ósea de cresta iliaca de donantes sanos en pases iniciales. Sin embargo el número de células expandidas a partir de aspirado de cresta iliaca de pacientes con osteoporosis fue significativamente superior a las de los dos grupos anteriores, como puede observarse en la figura.1.



**Figura 1:** Número de CSM obtenidas tras los diversos pases en cultivo.

*Mo.CI Sana:* Médula ósea de cresta iliaca de donantes sanos.

*Mo CI OP:* Médula ósea de cresta iliaca de pacientes con osteoporosis.

*CF OP:* Cabeza femoral de pacientes con osteoporosis.

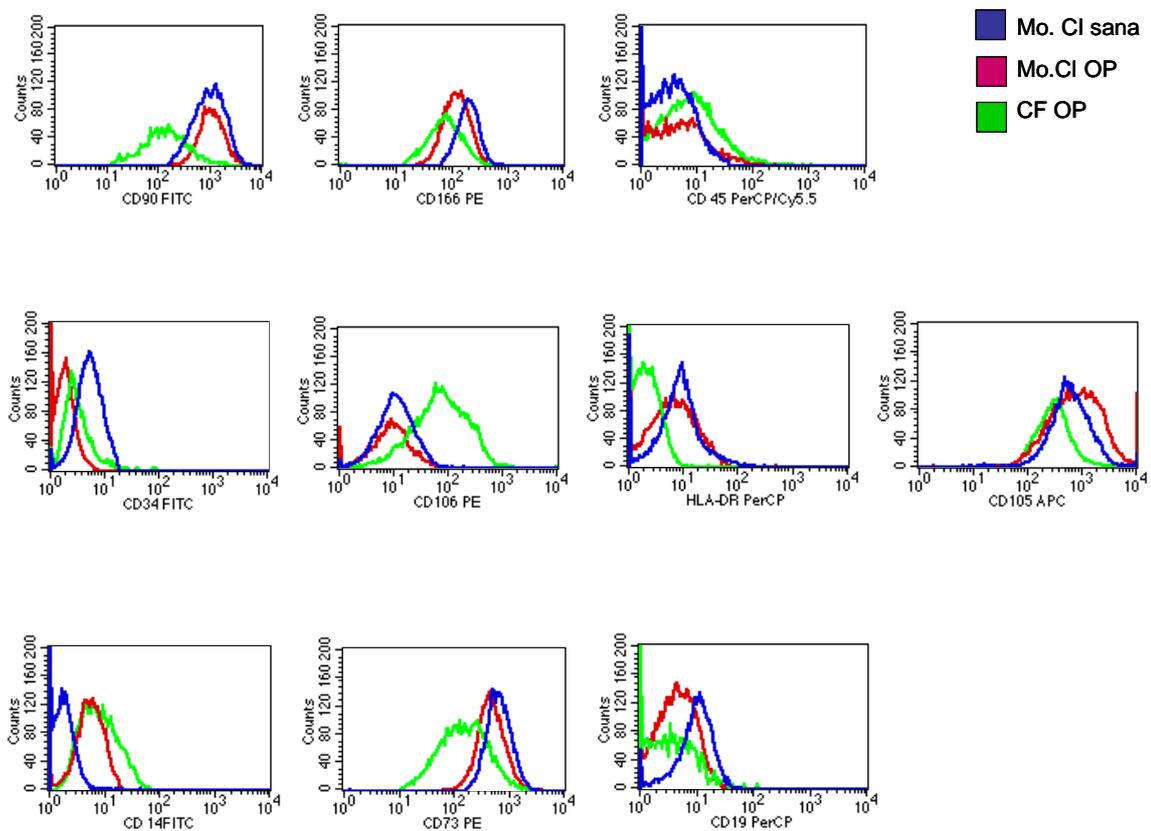
### 5.1.2 Análisis Inmunofenotípico.

Con el fin de comprobar si todas las células obtenidas cumplían los criterios mínimos que indica la ISCT para definir una célula como CSM, realizamos su estudio inmunofenotípico en tercer pase.

En todos los casos se alcanzó una pureza de CSM superior al 95%.

Todas las CSM presentaron el mismo patrón inmunofenotípico (figura 2), fueron positivas para CD90, CD73, CD105, CD166, CD106 y negativas para los marcadores de célula hematopoyética CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR, sin diferencias significativas entre las distintas muestras para ningún marcador. Sin embargo, aunque como indicamos las diferencias no fueron significativas,

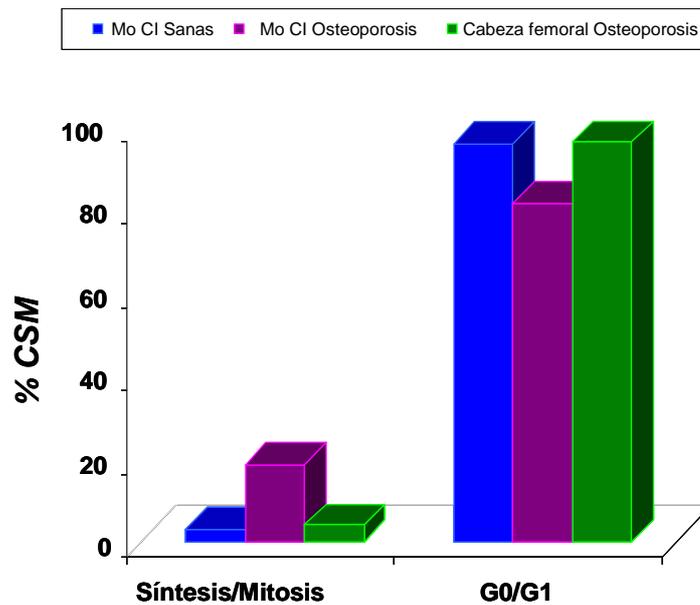
la intensidad de la expresión de CD106 (molécula de adhesión VCAM-1), fue mayor en las muestras de CSM procedentes de cabezas femorales osteoporóticas, mientras que la intensidad de expresión de expresión de CD90 (marcador de inmadurez), CD73 (5' ribonucleótido fosfohidrolasa), CD166 (molécula de adhesión ALCAM), y CD105 (endoglina) fue menor con respecto a la MO de los mismos pacientes y con respecto a las MO sanas.



**Figura 2:** Comparación del estudio inmunofenotípico de CSM de un paciente. En rojo se representa la muestra de médula ósea de cresta iliaca de paciente con osteoporosis, en verde CSM de cabeza femoral del mismo paciente y en azul CSM de médula ósea de donantes sanos.

### 5.1.3 Análisis de ciclo celular

Cuando se analizó el ciclo celular mediante marcaje con Ioduro de Propidio y análisis por citometría de flujo, se observó que las CSM que procedían de la cabeza femoral de pacientes con osteoporosis mostraban un porcentaje de células en fase síntesis / mitosis de hasta tres veces inferior respecto a las que procedían de cresta iliaca del mismo sujeto, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.036$ ). Lo mismo ocurrió con las CSM de cresta iliaca de pacientes con osteoporosis, en las que la fase síntesis/mitosis fue significativamente mayor ( $p=0.002$ ) a la que presentaban las CSM procedentes de donantes sanos.

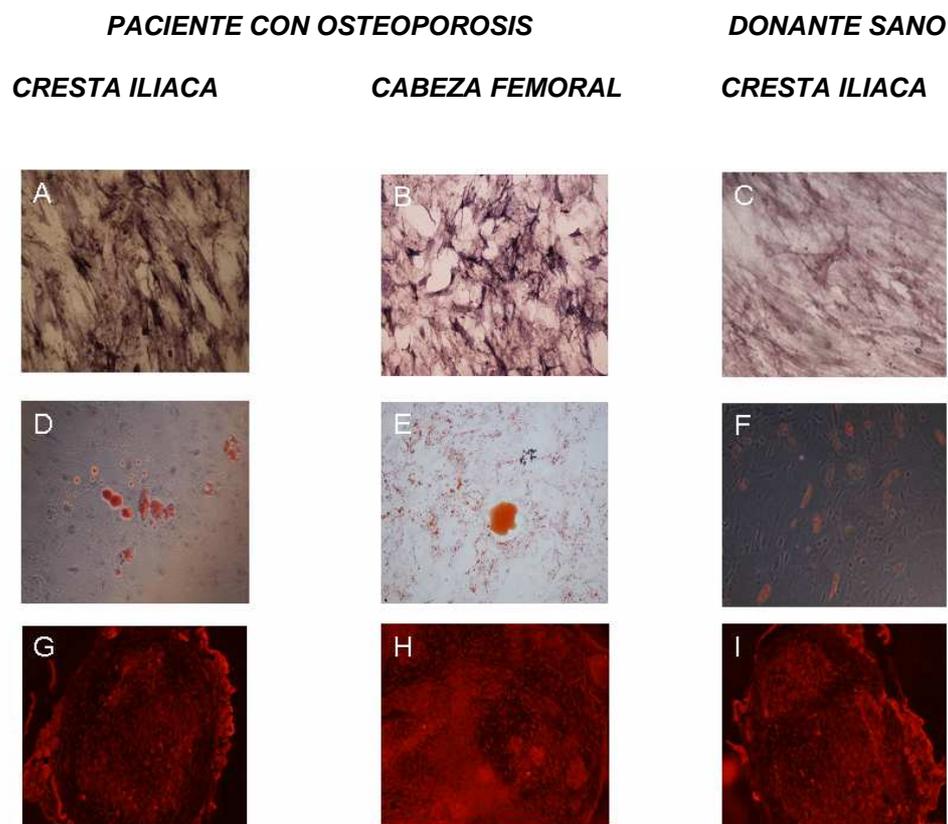


**Figura 3:** Comparación del ciclo celular. Los resultados se expresan en porcentaje de CSM en fase  $G0-G1$  de ciclo.  $S+M$ : Células en fase de síntesis más mitosis

### 5.1.4 Capacidad de diferenciación

Para demostrar la capacidad de diferenciación multilineal de las CSM de distinto origen, se indujo su diferenciación hacia osteoblasto, adipocito y condrocito, de acuerdo con lo descrito en Material y Métodos.

En todos los casos se obtuvo diferenciación hacia los tres tipos celulares mencionados.(Figura 4).



**Figura 4:** Diferenciación de CSM de un paciente con osteoporosis y un donante sano.

A,B,C: Diferenciación a hueso. Imágenes a 10X

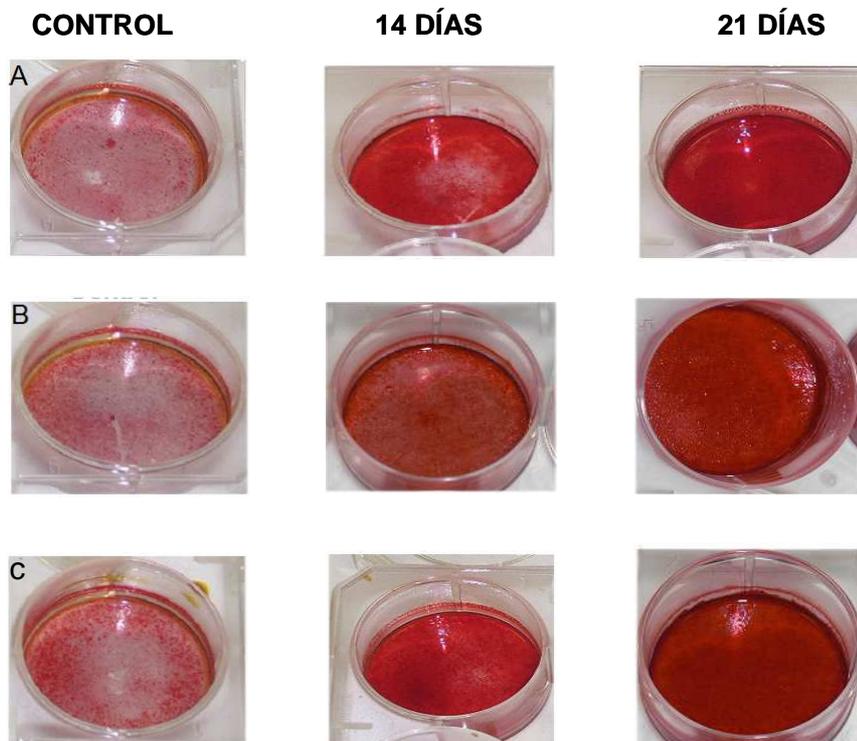
D,E,F: Diferenciación a grasa. Imágenes a 20X

G,H,I: Diferenciación a cartílago. Imágenes a 10 y 20X

## 5.2 CUANTIFICACIÓN DE DIFERENCIACIÓN ÓSEA

### 5.2.1. Mineralización ósea con tinción Rojo de Alizarina

Esta metodología se llevo a cabo con el fin de cuantificar la capacidad de diferenciación ósea. Para ello se utilizaron CSM de pacientes con osteoporosis tanto de cresta iliaca como de cabeza femoral y CSM de cresta iliaca de donantes sanos. La intensidad del colorante se evaluó por colorimetría en CSM basales / control (sin medio de diferenciación) y en células cultivadas con medio de diferenciación osteogénico durante 14 y 21 días.



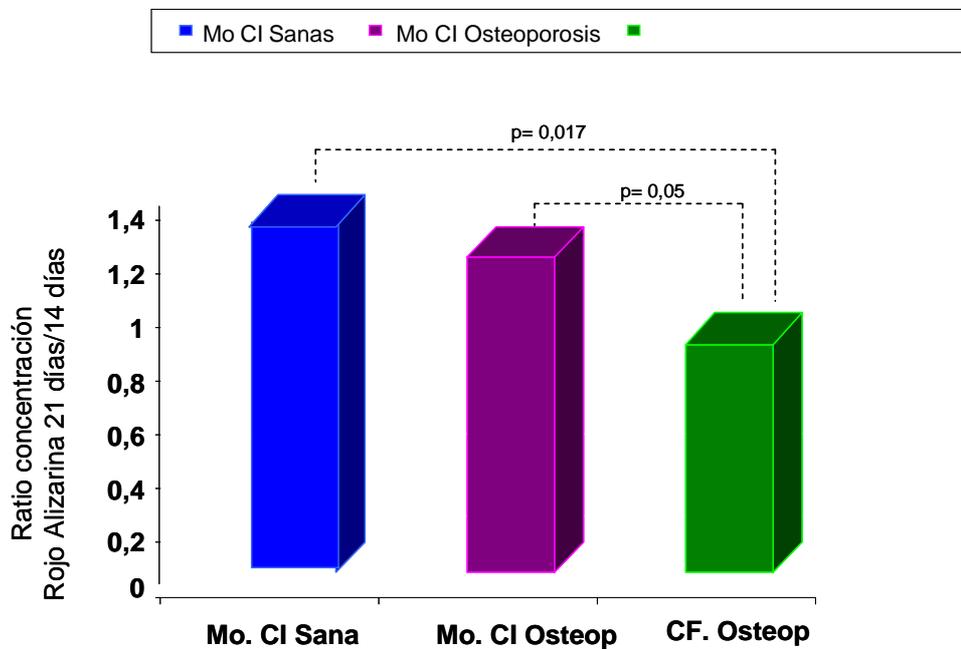
**Figura 5:** Tinción con Rojo Alizarina a 0,14 y 21 días.

A: CSM de médula ósea de cresta iliaca de pacientes con osteoporosis.

B: CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis.

C: CSM de médula ósea de cresta iliaca de donantes sanos.

Al comparar si existía un aumento de la capacidad de mineralización entre los 14 y 21 días de cultivo ( determinado como el cociente entre ambos valores), observamos que en las cabezas femorales de pacientes con osteoporosis este valor era inferior a 1, lo que indica que la capacidad de mineralización disminuye, a diferencia de lo que ocurre con las CSM de cresta iliaca de donantes sanos y las procedentes de la medula ósea de cresta iliaca del paciente con osteoporosis, como se observa en la figura siguiente:



**Figura 6:** Ratio de la concentración a 21 días dividido entre la concentración a 14 días. Resultados expresados en medianas.

### 5.2.2 Cuantificación de la diferenciación ósea mediante PCR.

Debido a que en el estudio anterior se observó una menor mineralización de las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis, analizamos la expresión de una serie de genes implicados en la regulación de la mineralización y diferenciación ósea. Se analizaron mediante PCR cuantitativa los siguientes genes marcadores claves en la diferenciación osteoblástica específicos de osteoblastos: **ALP** (*fosfatasa alcalina*) importante en la fase de proliferación, **COL1A1** (*colágeno 1A1*), **BMP2** (*proteína morfológica del hueso*) y **RUNX2** (*factor de transcripción*). Estos marcadores alcanzan la mayor expresión durante la fase de diferenciación o maduración de la matriz. Además, se analizaron otros marcadores de osteogénesis tardía, con moléculas cuyo pico máximo de expresión ocurre en la fase de mineralización: **SPARC** (*osteonectina*), **SPP1** (*osteopontina*) y **BGLAP** (*osteocalcina*).

Para comprobar si la inducción a la diferenciación modificaba la expresión de algunos de estos genes se analizaron tanto de forma basal como a los 14 días de iniciar su cultivo in vitro en medio osteogénico.

Cuando realizamos el análisis de la expresión de estos genes comparando las CSM de las distintas fuentes basalmente, previo a iniciarse el proceso de diferenciación, pudimos observar que el gen **BMP2** estaba sobreexpresado significativamente ( $p=0,010$ ) en las CSM de cabeza femoral de los pacientes con osteoporosis al compararlas con las procedentes M.O. de donantes sanos como se observa en la Figura 9.

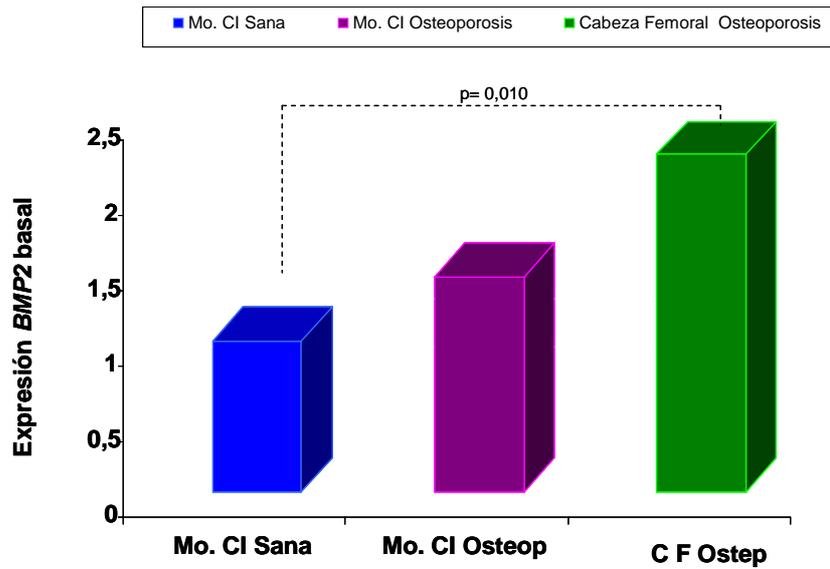


Figura 7: Expresión basal del gen *BMP2* en las distintas muestras de CSM.

Cuando se analizó la expresión basal de fosfatasa alcalina (*ALP*) está fue menor en las cabezas femorales de pacientes con osteoporosis al compararlas con las crestas iliacas del mismo paciente ( $p=0,025$ ), y con las CSM de MO de donante sano

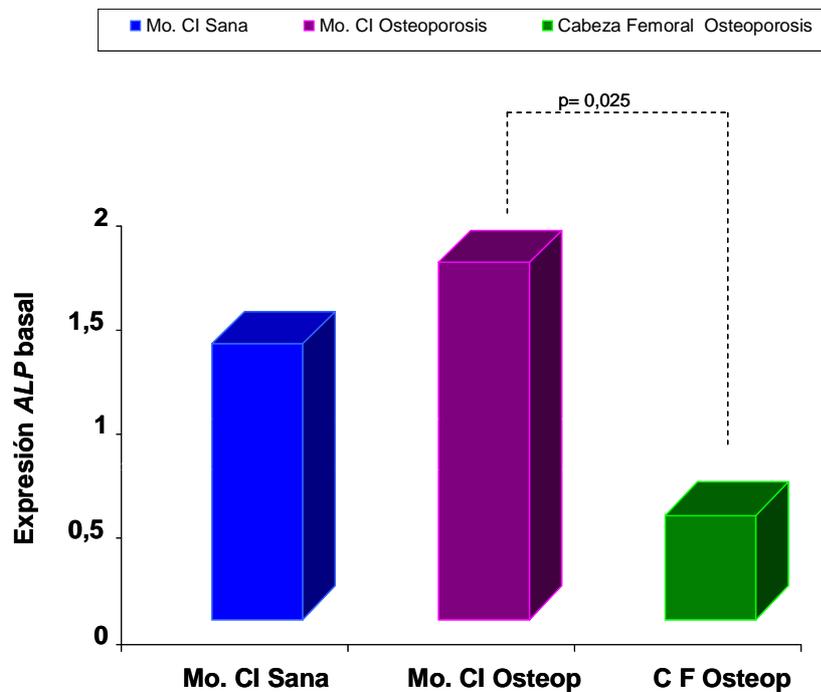
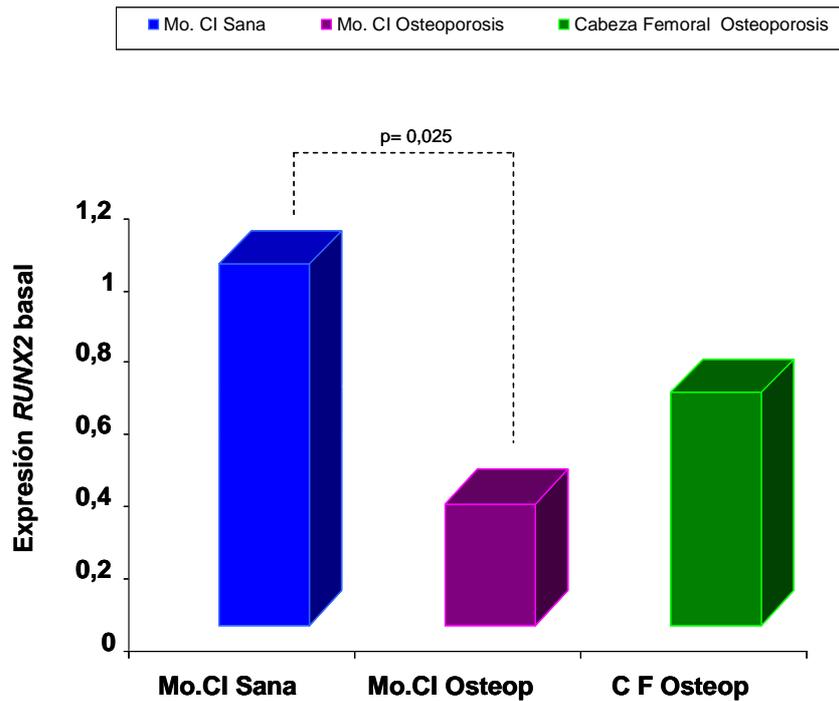


Figura 8: Expresión basal del gen *ALP* en las distintas muestras de CSM.

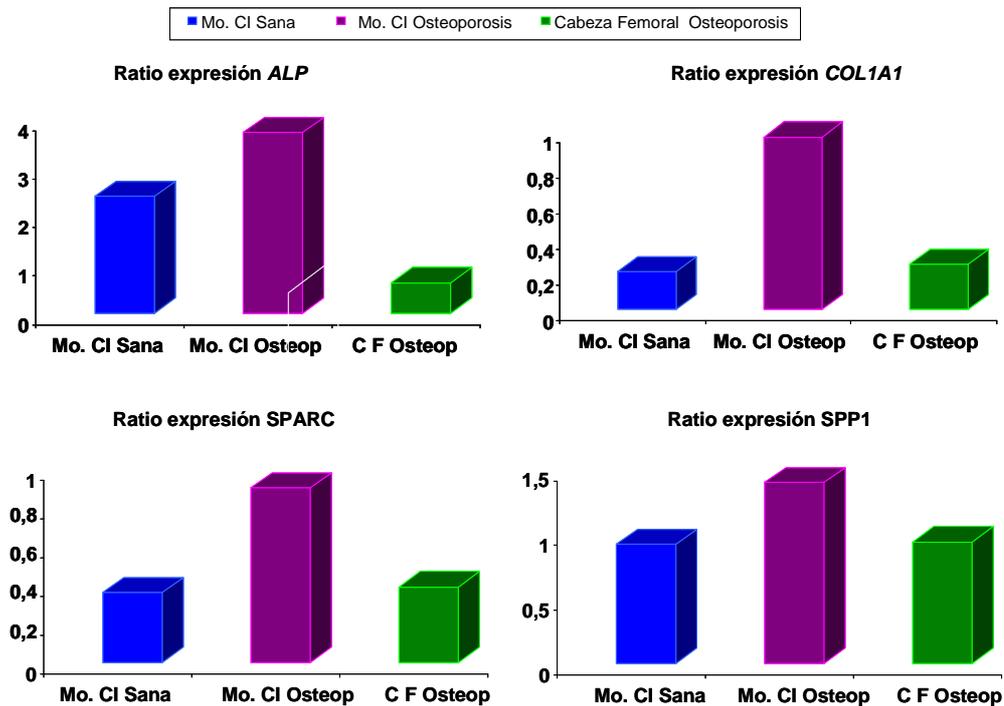
Como se observa en la Figura 9, la expresión basal de **RUNX2** inferior en las muestras procedentes de pacientes con osteoporosis, especialmente en las muestras de cresta iliaca, donde las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p=0,020$ ).

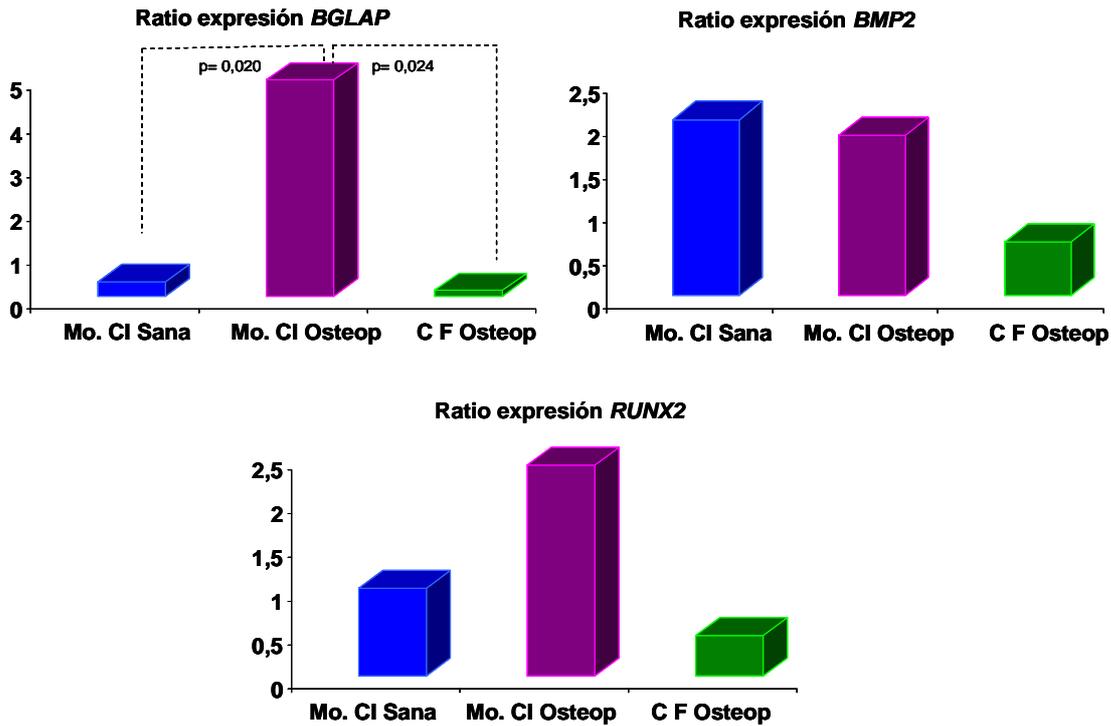


**Figura 9:** Expresión basal del gen **RUNX2** en las distintas muestras de CSM.

Finalmente, cuando se analizó comparativamente la expresión basal del resto de genes implicados en osteogénesis, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales.

Con el fin de valorar la variación que había sufrido la expresión de los genes relacionados con la diferenciación osteoblástica tras inducir a las CSM a dicha diferenciación, comparamos la expresión basal en las CSM con la expresión tras cultivo con medio de diferenciación osteogénico durante 14 días, expresando los resultados como la ratio o cociente entre ambos valores. Pudimos comprobar que el incremento en la expresión génica era claramente menor en las CSM de cabezas femorales frente a las CSM de crestas iliacas de donantes sanos y de pacientes con osteoporosis para los siguientes genes: Fosfatasa alcalina, BMP2, BGLAP, Colágeno 1A1, RUNX2, SPARC, SPP1, (figura10).



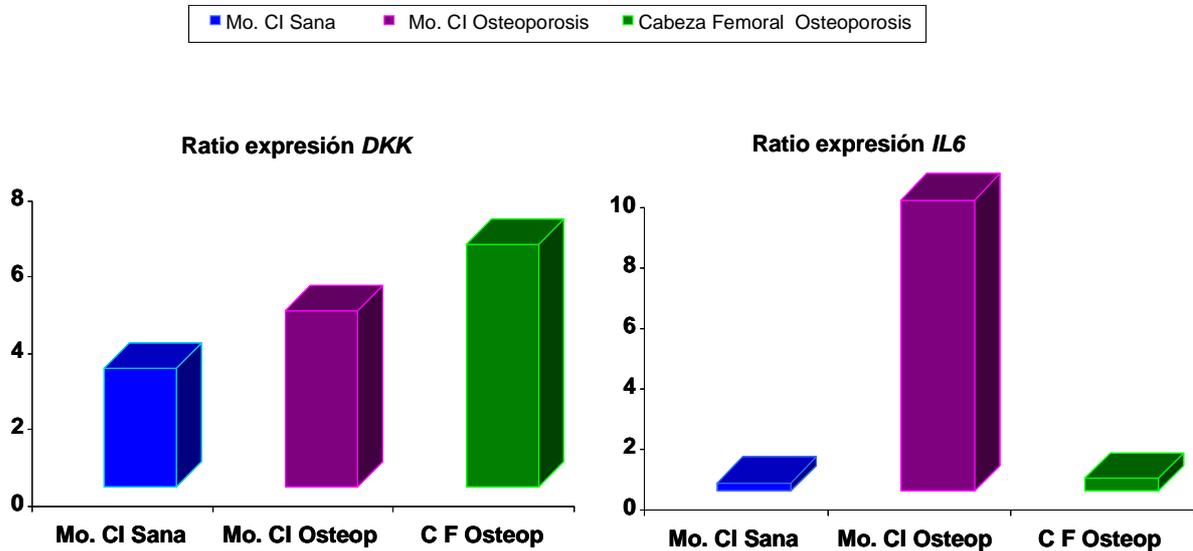


**Figura 10:** Incremento de la expresión de 0 a 14 días de diferenciación, de los diferentes genes en las distintas muestras de CSM.

Solamente para **BGLAP** aparecían diferencias significativas al comparar las cabezas femorales de pacientes con osteoporosis con las crestas iliacas del mismo paciente y también con las CSM de cresta iliaca de donantes sanos.

Dado que la osteogénesis estaba disminuida en las cabezas femorales de pacientes con osteoporosis se incluyó en este apartado el análisis de la expresión de genes reguladores de la osteogénesis. Así, se comprobó como la expresión de **DKK**, inhibidor de la diferenciación ósea en CSM, fue mayor en las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis al compararlas con el resto de CSM del estudio, aunque sin diferencias significativas. Así mismo, la expresión de la citosina **IL6**, esencial en la regulación de la resorción ósea se

ve aumentada en pacientes con osteoporosis al compararla con las CSM de donantes sanos.



**Figura 11:** Incremento de la expresión de 0 a 14 días de diferenciación, de los diferentes genes en las distintas muestras de CSM.

### 5.3. ANÁLISIS GENÓMICO MEDIANTE CGH ARRAYS

Con el fin de analizar si las CSM de cabezas femorales de pacientes con osteoporosis presentaban alteraciones genómicas o si estas pudieran estar presentes en las CSM de cualquier localización del paciente con osteoporosis se llevaron a cabo estudios mediante CGH Arrays en estas poblaciones y se compararon con las resultantes de las CSM de controles sanos.

Se estableció como ganancia o pérdida genómica cuando al menos existía más de un clon consecutivo alterado.

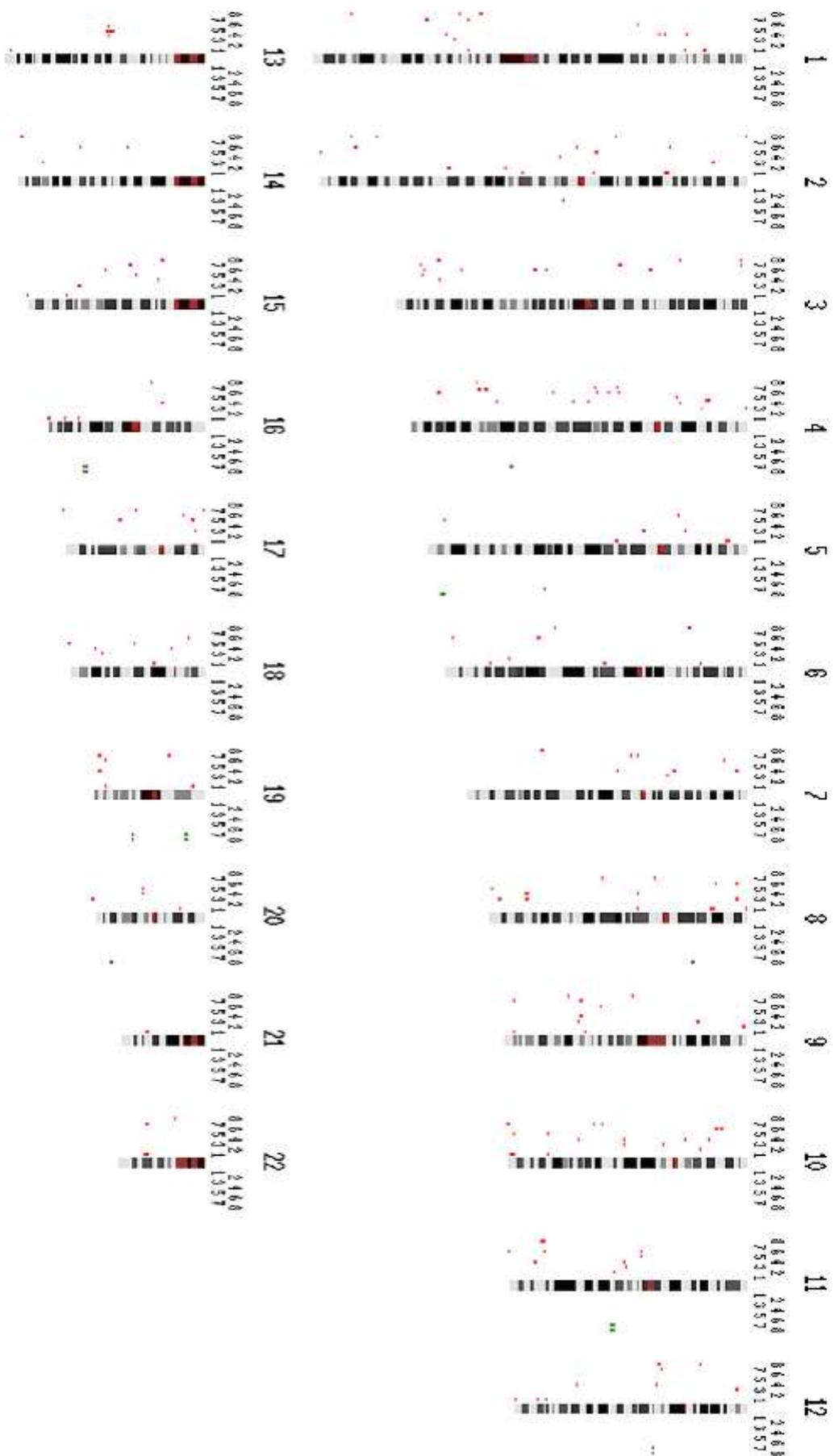
Únicamente se observaron pérdidas con más de un clon consecutivo en tres cabezas femorales, localizándose dichas alteraciones en los cromosomas 4,13 y 19, nunca estas alteraciones genómicas fueron recurrentes. Analizando estas alteraciones se descartó la presencia de polimorfismos a esos niveles.

Estas alteraciones genómicas correspondían a:

Paciente	localización	Bac	Gen
1	4p15.31	bA441O12-bA3J1	
	13q14.11	bA407E23-bA125A7	
	19p13.11	bA4134M18-bK3149D2	<a href="#">UNCI3A</a>
	19p13.2	bK2547N9-bK1444D3	<a href="#">ZNF317</a>
	19q13.33	bK2571L23-bA3N16	
2	4q22.1	bA11N6-bA9B6	<a href="#">GRID2</a>
4	13q13.3	bA131F1-bA131P10	<a href="#">UFM1</a>

Ninguno de los genes presentes en estas localizaciones están relacionados directamente con la diferenciación ósea.

En ninguno de los casos en los que se analizaron CSM procedentes de crestas iliacas tanto de donantes sanos como de pacientes con osteoporosis se observó ninguna alteración que incluyera más de un BAC consecutivo alterado, tal como se observa en la figura 12.



## 5.4. ANALISIS MEDIANTE MICROARRAYS DE EXPRESIÓN

Con el fin de valorar si existían diferencias en el perfil de expresión génica entre las cabezas femorales y las células de la médula ósea de cresta iliaca del mismo paciente con osteoporosis se utilizaron microarrays de expresión.

### 5.4.1. Análisis no supervisado

El análisis no supervisado de agrupación jerárquica realizado mostró un dendrograma con dos grandes ramas: una que incluía las muestras de CSM de cresta iliaca y otra en la que se agrupaban las muestras de CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis (Figura 13).

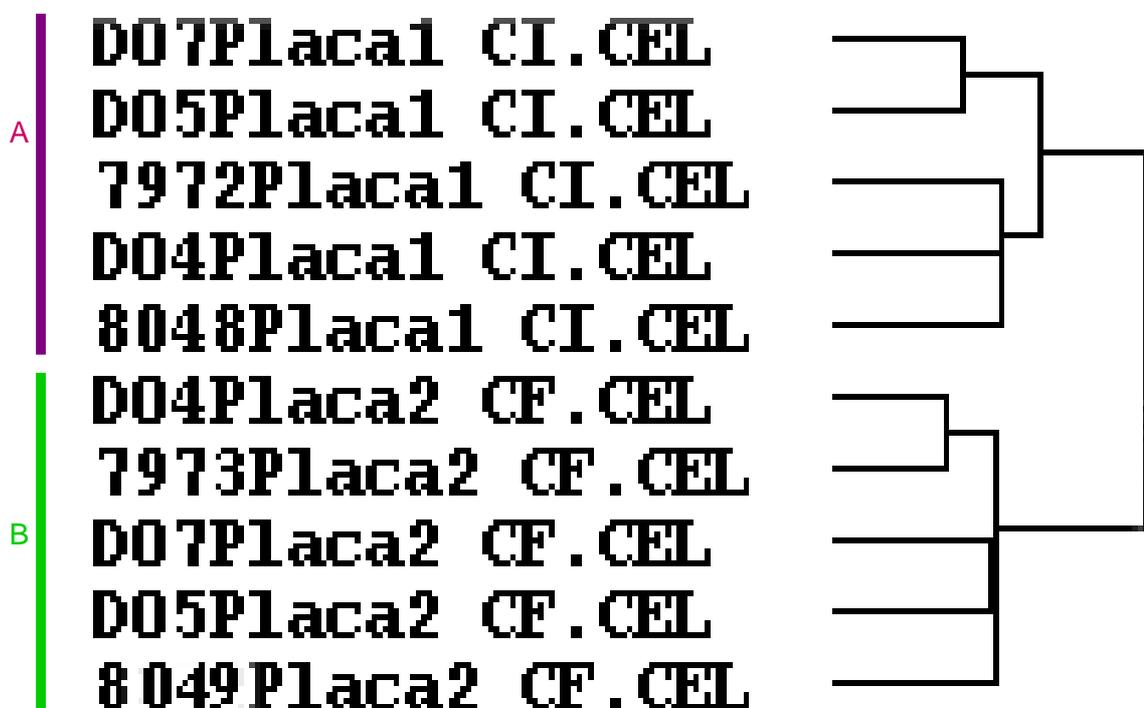
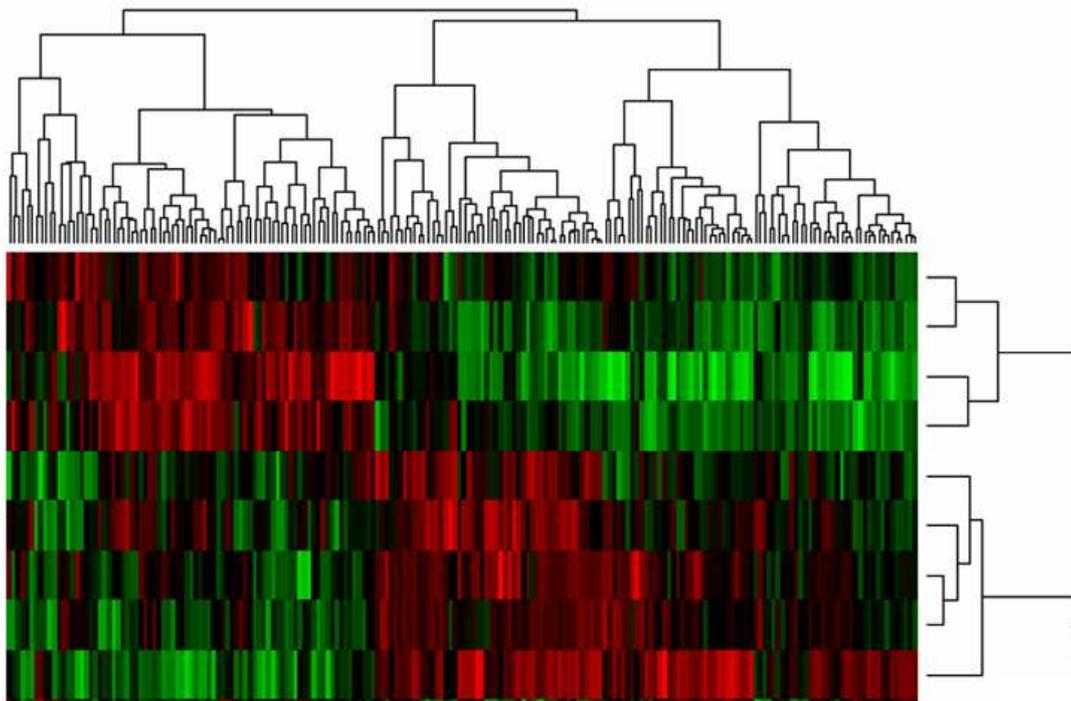


Figura 13: Dendrograma del análisis jerárquico de 5 pacientes con osteoporosis.

Las barras horizontales a lo largo del árbol distinguen las muestras de cresta ilíaca en morado(A), y de cabeza femoral en verde (B) ambas del mismo paciente con osteoporosis.

### 5.4.2. Análisis supervisado

Mediante la aplicación del algoritmo SAM se identificaron un total de 643 genes diferencialmente expresados de los cuales 573 están implicados en rutas celulares. De todos estos genes 161 presentaban cambios significativos en su expresión (Fold Change  $\geq 2$ ,  $\leq -2$ ). Todos estos genes excepto dos, estaban sobreexpresados de forma significativa en las CSM de las cabezas femorales frente a las CSM de las crestas ilíacas del mismo paciente con osteoporosis



**Figura 14:** Diagrama en colores, que muestra la expresión de los genes más significativos al comparar los perfiles de expresión de la cabeza femoral frente a la cresta iliaca del mismo paciente. Los genes están representados en columnas y las muestras en filas. El color rojo indica sobreexpresión de un gen, mientras que el color verde refleja represión génica. La intensidad de los colores es proporcional al grado de expresión génica.

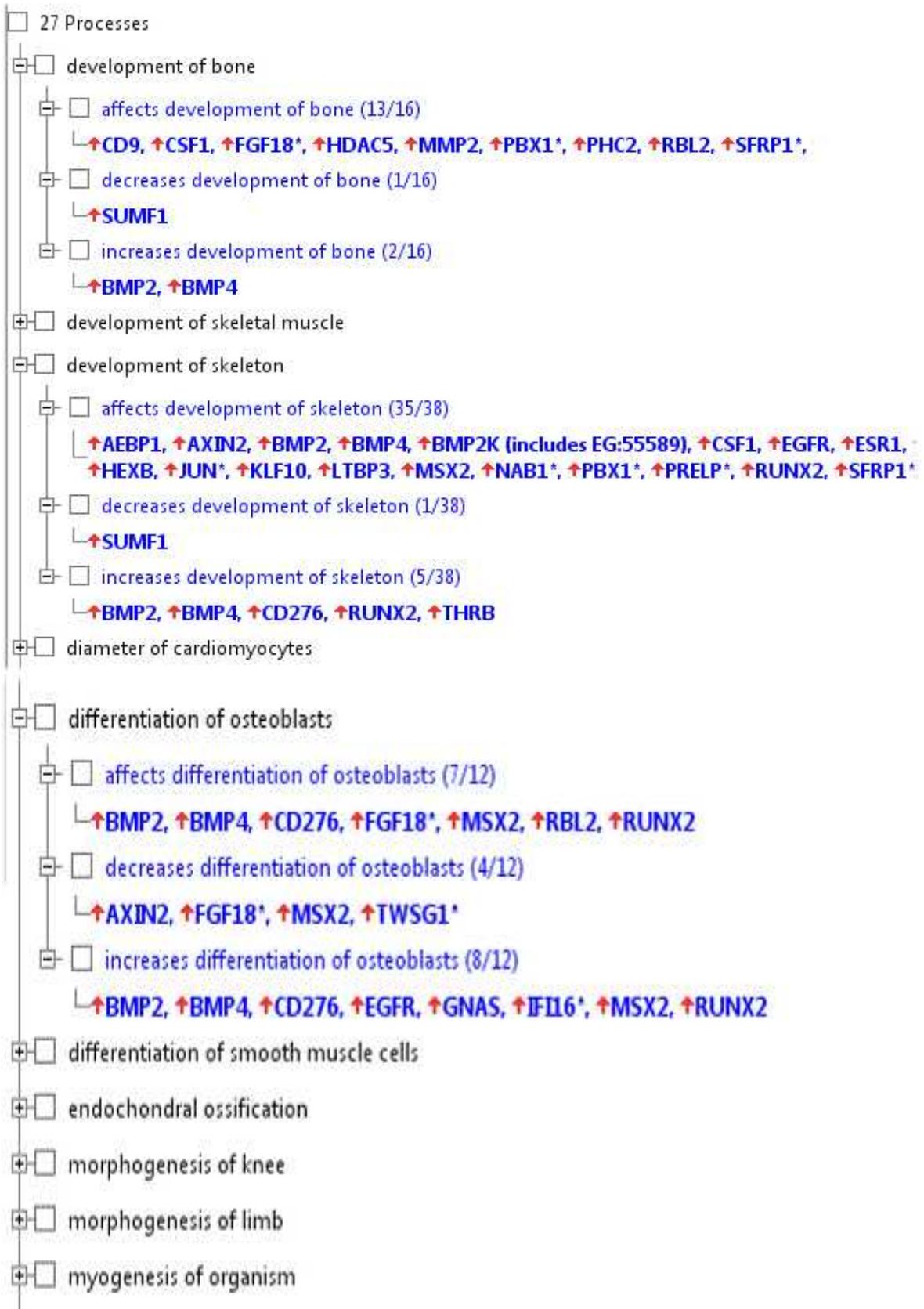
Posteriormente cuando analizamos en que funciones estaban implicados estos genes disregulados y las más relevantes fueron:

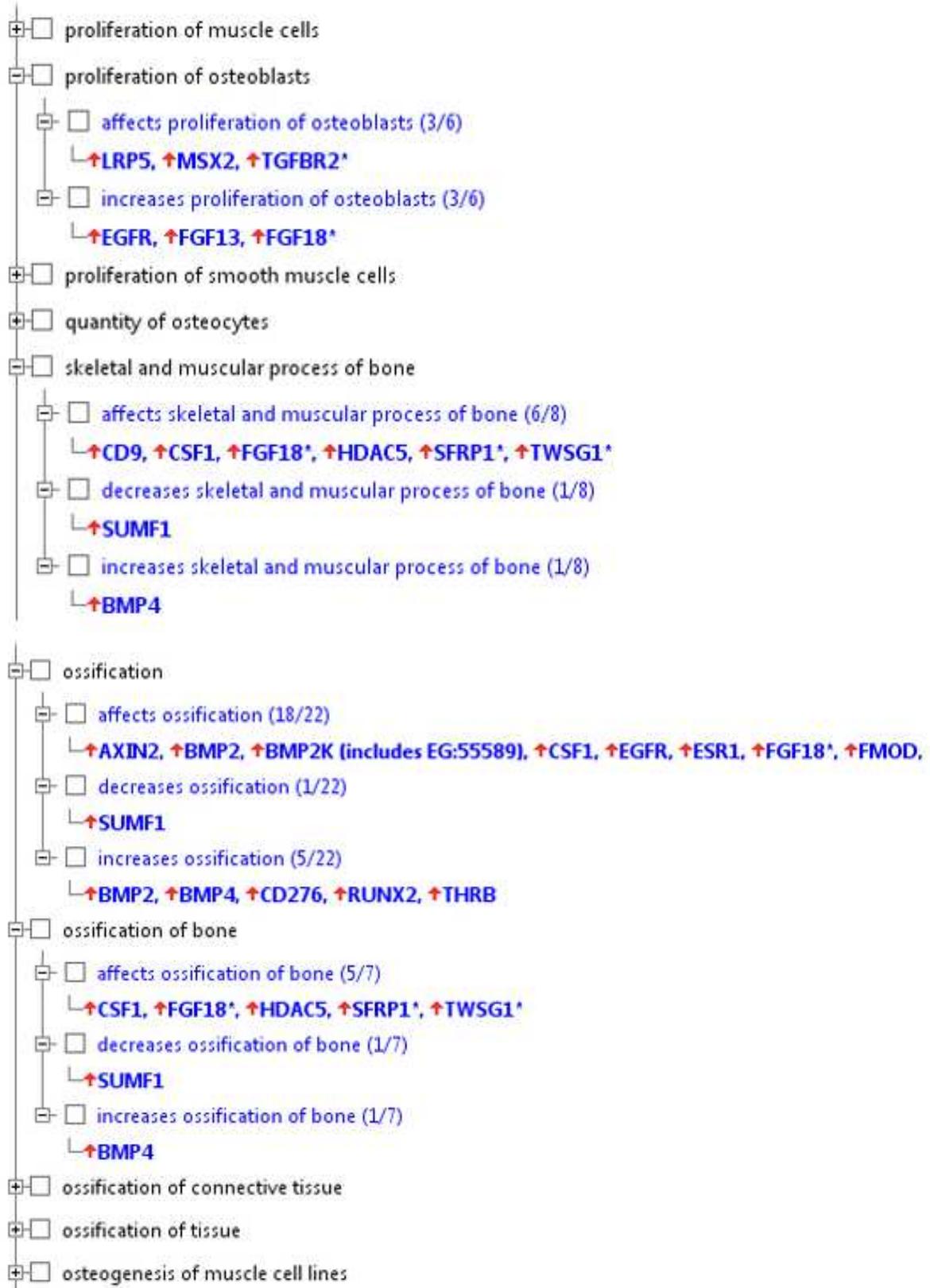
1. Desarrollo, función del tejido conectivo y del sistema músculo esquelético.
2. Desarrollo, crecimiento, proliferación celular y muerte celular
3. Desarrollo y función del sistema hematopoyético.
4. Cáncer, enfermedades gastrointestinales
5. Enfermedades del tejido conectivo, reparación de DNA...

Dadas las características del presente trabajo nos centramos en desarrollo y función del sistema músculo-esquelético en cuya función están implicados 27 procesos entre los que destacamos:

1. Desarrollo del hueso
2. Desarrollo del esqueleto
3. Diferenciación de osteoblastos
4. Osificación
5. Proliferación de osteoblasto

En la siguiente Figura 15 se pueden observar los procesos y los genes que se encuentran alterados en nuestro estudio.





**Figura 15:** Procesos y los genes que se encuentran alterados en las CSM procedentes de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis.

Estos genes están implicados en diversas vías de señalización entre los que destacamos los siguientes, por su relación con la osteogénesis:

Vía **PPAR**

Vía de **TGF- $\beta$** ,

Vía de **Wnt/ $\beta$ -Catenina**

Vía de **IL-6**,

En la tabla 1 se muestran los principales genes implicados en las vías de señalización seleccionadas cuya expresión esta alterada de forma significativa

**Tabla 1.** Principales genes con cambio significativo de expresión en las CSM de cabeza femoral.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Fold. Change
<b>Diferenciación adipocítica</b>		
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	2,2
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	2,4
PDGFD	platelet derived growth factor D	2,6
STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B	2,1
<b>Vía Wnt/<math>\beta</math>-Catenina</b>		
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	2,7
SFRP1	secreted frizzled-related protein 4	10,7
SFRP4	secreted frizzled-related protein 4	3,7
TGF $\beta$ R2	transforming growth factor, beta receptor II	2,2
<b>Vía señalización TGF<math>\beta</math></b>		
RUNX2	runt-related transcription factor 2	3,8
TGF $\beta$ R2	transforming growth factor, receptor II Beta	2,2
<b>Otros genes</b>		
AEBP1	AE binding protein 1	6,7
HSD11B1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	2,7
PDE1A	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	2,9
RBP4	retinol binding protein 4, plasma	3,1
CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	5,6

#### **5.4.2. Confirmación mediante PCR de los genes sobreexpresados**

Para confirmar el cambio en la expresión de ciertos genes implicados en las vías de señalización anteriores, realizamos PCR cuantitativas en CSM de cabeza femoral y médula ósea de cresta iliaca de 10 pacientes con osteoporosis y CSM de médula ósea de cresta iliaca 10 donantes sanos.

Se estudiaron los siguientes genes: ***AEBP1***, ***HSD11 $\beta$ 1***, ***PDE1A***, ***PPAR***, ***RBP4***, ***FRZB***, ***SFRP1***, ***SFRP4***, (figuras 1-9).

Con relación a la expresión de ***AEBP1***, gen inductor de adipogénesis, comprobamos que estaba significativamente sobre expresado en las CSM de cabeza femoral al compararlo con la expresión en las CSM obtenidas de cresta iliaca tanto de sujetos sanos como de pacientes con osteoporosis.

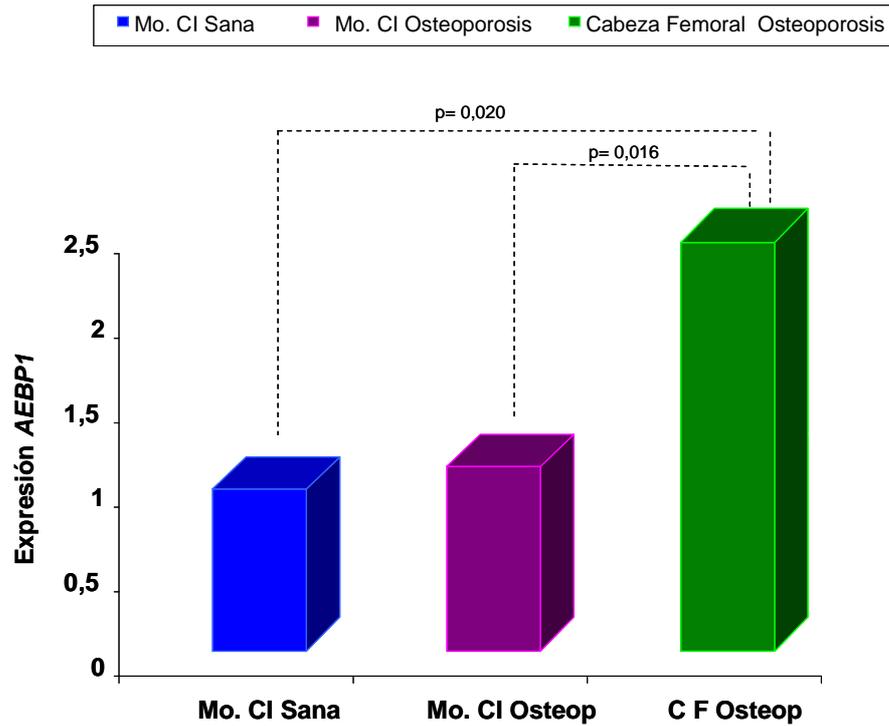


Figura 16: Representación de la expresión de *AEBP1*

De forma similar *PPAR $\gamma$*  otro gen implicado en promover diferenciación adipogénica a la vez que bloquea diferenciación osteogénica, esta expresado más intensamente en las CSM de cabezas femorales osteoporóticas al compararlas con la CSM de cresta iliaca del mismo paciente y de los controles (Figura 17), y un comportamiento parecido presenta el gen *HSD11 $\beta$ 1* (Figura 18).

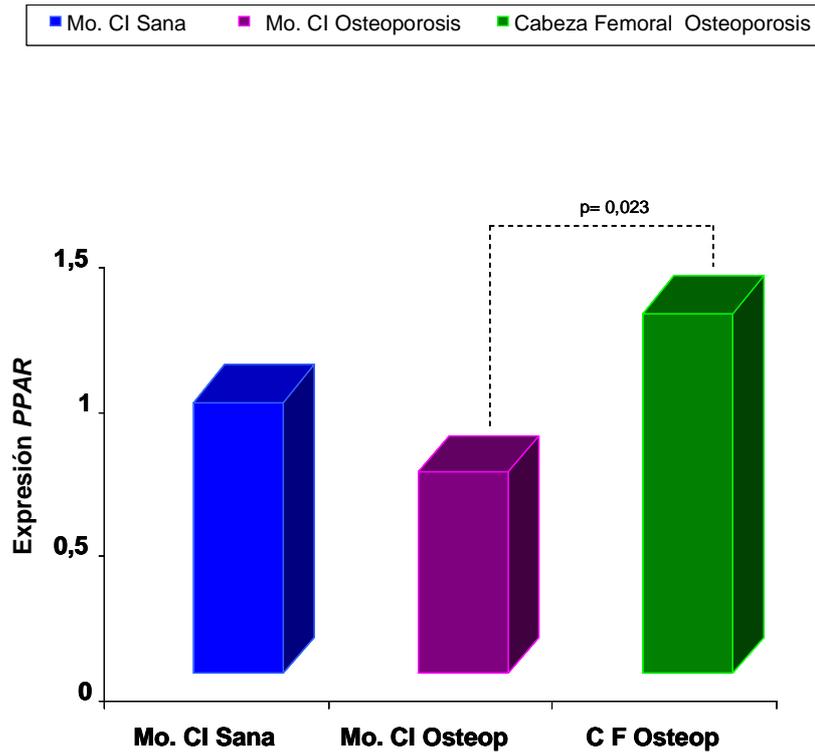


Figura 17: Representación de la expresión de *PPAR $\gamma$* .

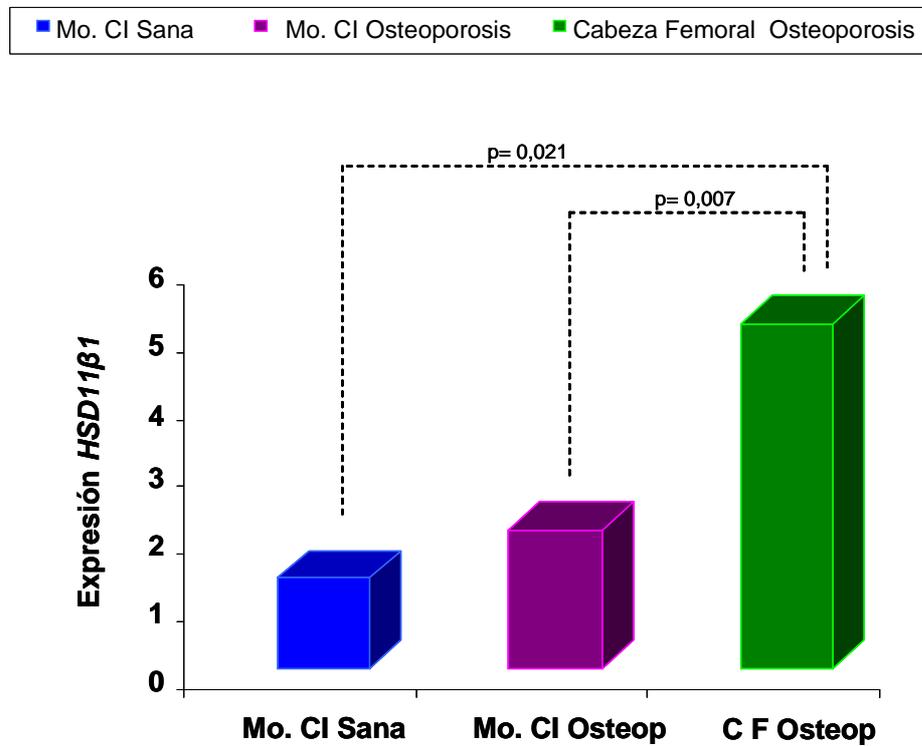


Figura 18: Representación de la expresión de *HSD11 $\beta$ 1*.

Otros genes que aparecían sobre-expresados en el estudio supervisado eran genes que indirectamente bloquean la osteogénesis como **PDE1A** y la proteína transportadora de retinol, **RBP4**. Esta sobre-expresión fue significativa en las cabezas femorales al compáralas con los otros dos grupos de estudio.

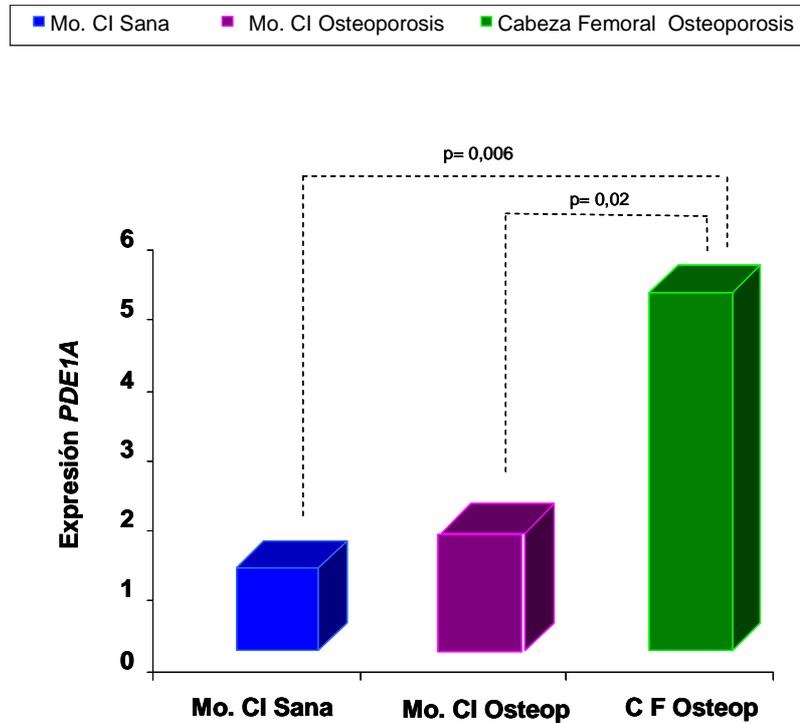


Figura 19: Representación de la expresión de **PDE1A**.

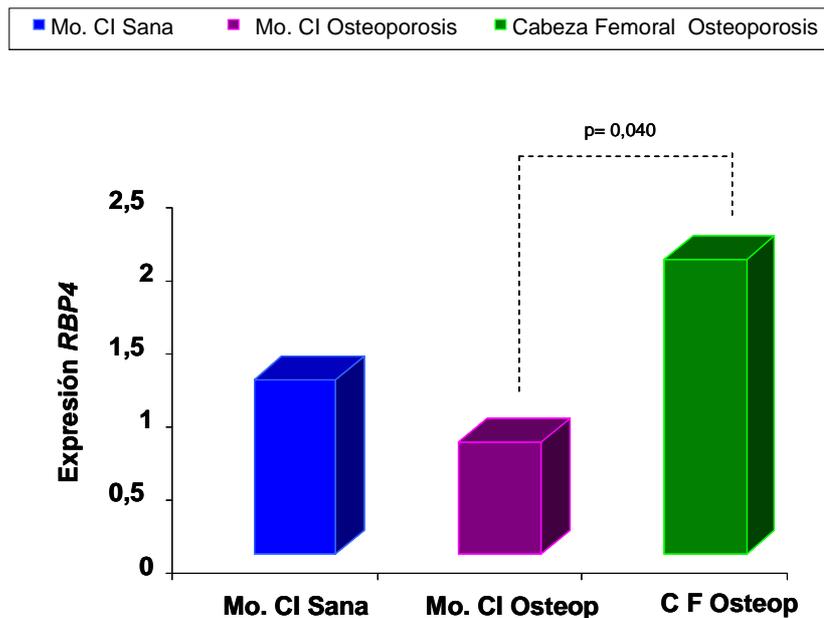


Figura 20: Representación de la expresión de **RBP4**.

Además, cuándo analizamos se observó una sobre-expresión de dos genes inhibidores de la vía canónica de *Wnt/β-catenina*. *SFRP1* y *SFRP4* confirmamos que, al igual que sucedía con los arrays de expresión estaban sobre expresados cuando se analizaron mediante PCR en tiempo real (Figura 21-22) confirma su sobre expresión en las CSM procedente de cabeza femoral frente a las CSM de cresta iliaca del mismo individuo o de un donante sano, tal como se muestran en la figura.

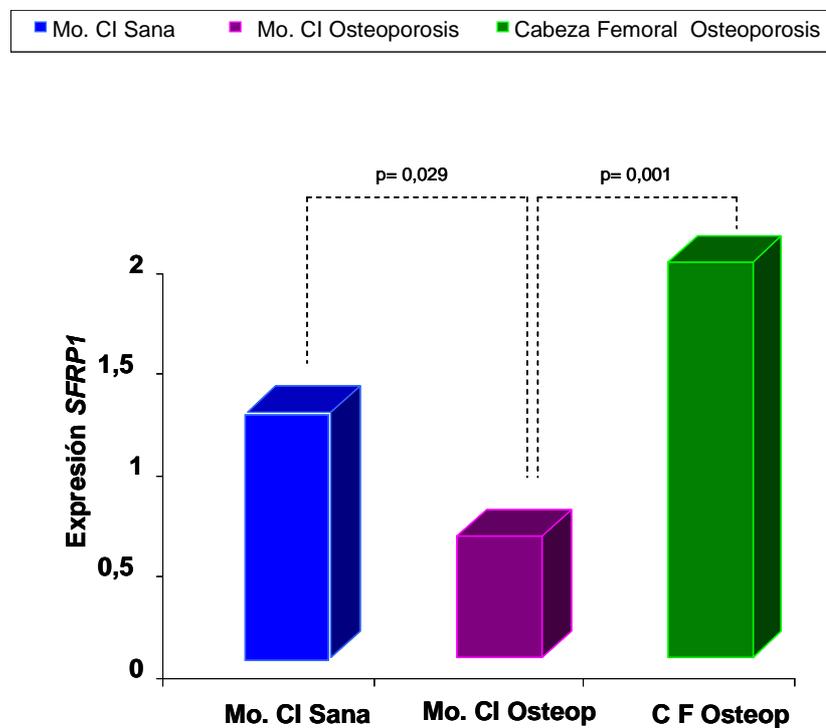


Figura 21: Representación de la expresión de *SFRP1*

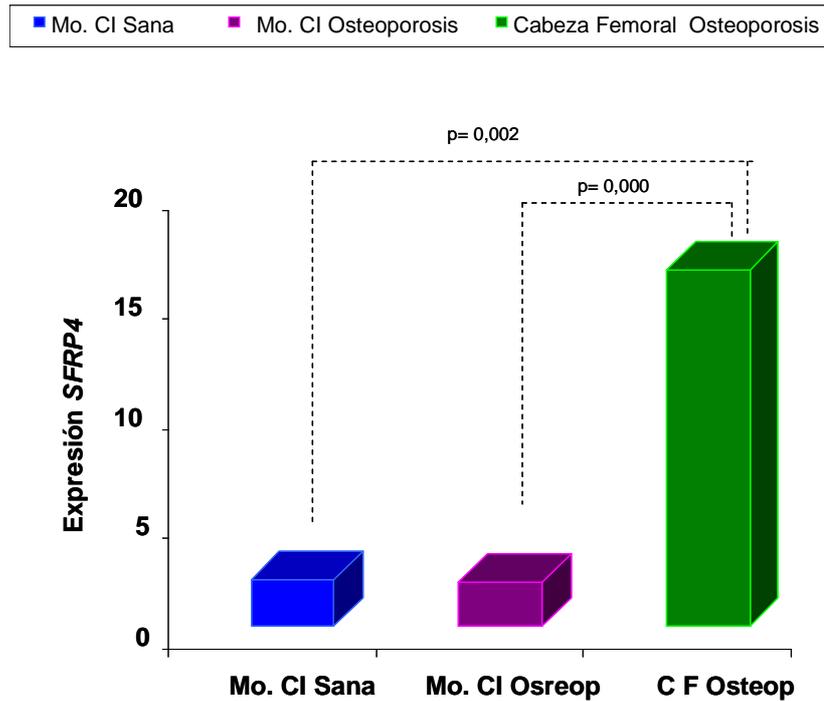


Figura 22: Representación de la expresión de **SFRP4**.

**FRZB**, receptor de la proteínas *Wnt*, se encuentra infraexpresado en las CSM de pacientes con osteoporosis tal como se indica en la siguiente gráfica: La expresión de **FRZB** fue significativamente menor en las CSM de paciente con osteoporosis frente a las CSM. procedentes de cresta iliaca de donante sano.

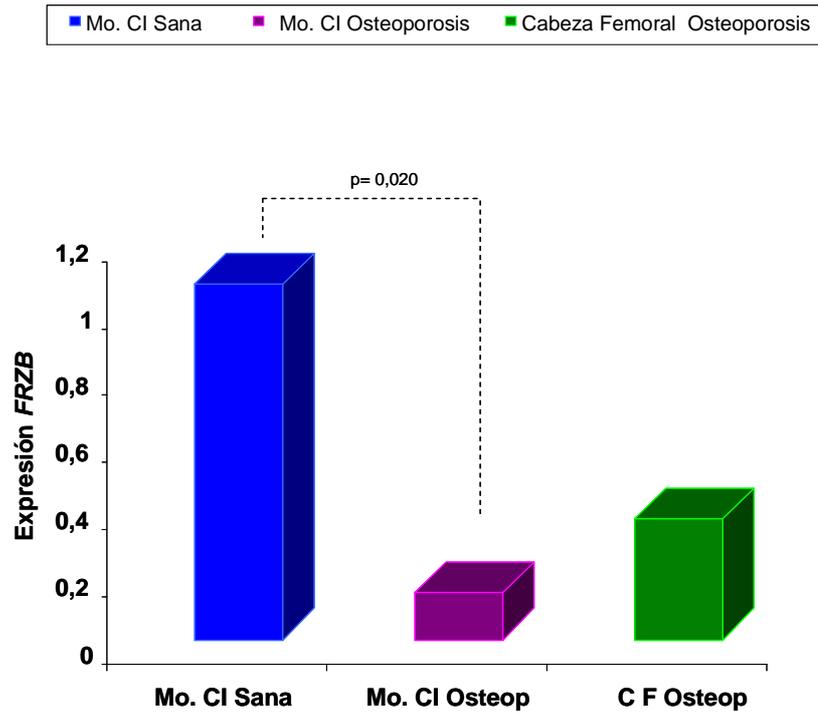


Figura 23: Representación de la expresión de *FRZB*.



## 6. Discusión



La osteoporosis es una enfermedad sistémica del esqueleto relacionada directamente con la edad. En su desarrollo interviene un importante componente genético. Se caracteriza por la pérdida de masa ósea y la alteración de la calidad del hueso, lo que hace que el paciente tenga mayor riesgo de sufrir fracturas. Aunque se han producido discretos avances en el conocimiento de la fisiopatología y por tanto del tratamiento de esta enfermedad, en el momento actual la mayoría de los autores consideran que las pautas de tratamiento no son las óptimas.

El descubrimiento, en los últimos años, de las CSM con sus especiales características ha abierto nuevas expectativas en el tratamiento de enfermedades del sistema osteo-muscular dentro del contexto de la medicina regenerativa. Una muestra de ello es el gran número de ensayos clínicos que se están iniciando o desarrollando en los últimos años, entre los que podemos destacar el uso de CSM en osteogénesis imperfecta<sup>32;33</sup> y otras enfermedades óseas como osteopetrosis, e hipofosfatasa infantil<sup>24;34</sup>. La terapia con células stem mesenquimales, las cuales poseen capacidad de regeneración tisular y son capaces de diferenciarse a diferentes líneas, están permitiendo obtener una mejora en la calidad de vida de los pacientes con enfermedades ósea.

El uso clínico en otros contextos lleva también varios años de experiencia. La primera infusión intravenosa en humanos de células stem mesenquimales autólogas se realizó en 1995 demostrando así la viabilidad de estas células “ex vivo” (Lazarus HM, Bone Marrow trasplant1995;16). En 2002 se realizó la primera infusión de CSM alogénicas, en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea para tratar la enfermedad injerto contra huesped con resultados esperanzadores (Horwitz EM. Proc Natl Acad Sci USA 2002 ;99).

La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por un déficit de masa ósea que hace que los pacientes que la padecen tengan mayor riesgo de fracturas óseas. El objetivo general del presente trabajo fue analizar si las CSM de estos pacientes presentaban alteraciones funcionales ó de expresión génica que nos permitan valorar la utilidad de CSM sanas en el contexto de la terapia regenerativa.

Nuestro primer objetivo fue analizar si las CSM de cabeza femoral presentaban las mismas características de proliferación y fenotipo que las de MO del mismo paciente y de sujetos sanos. Se utilizaron cabezas femorales de pacientes con fracturas osteoporóticas porque en ellos es donde realmente se encuentra la alteración ósea más marcada que conduce a la fractura. Hemos utilizado el método descrito por nuestro grupo Sánchez-Guijo por el cual se obtuvo CSM de cabeza femoral sin tratamiento enzimático echo que permite utilizar la obtención de estas células en salas con la normativa GMP ya que cumplen todos los criterios de definición propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular.

Estas CSM obtenidas de hueso trabecular, en otros contextos, son similares a las derivadas de médula ósea con capacidad de de adhesión al plástico, apariencia fibroblástica, muestran un amplio potencial de proliferación y son capaces de diferenciarse a varios tipos celulares de origen mesodérmico.(Song 2005, Sottle2002) (Tuli,Sakaguchi,Sottile). Hasta la actualidad y en lo que alcanza nuestro conocimiento, ningún autor que ha trabajado con los ambos tipos celulares, CF y MO, ha detectado diferencias significativas entre ellas. Los trabajos de Jones (Arthritis reumatoide feb 2010) y Sanchez-Guijo confirman que las CSM son más abundantes en las cavidades

de hueso trabecular de pacientes sanos o con osteoartritis que en la MO. Caterson EJ et al compararon la capacidad de producción de células mesenquimales a partir de un volumen similar de médula ósea y de hueso trabecular observando que la cantidad de células obtenidas es mayor en el hueso trabecular. En nuestro estudio, las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis son discretamente inferiores a las CSM de sujetos sanos, y sorprendentemente, las CSM de MO de pacientes con osteoporosis, presentan la proliferación aumentada. Lo que nos puede sugerir que el reducido número de células que presentan nuestras cabezas femorales se pueda deber a la patología de la enfermedad ya que en estos pacientes donde se ha producido la rotura sufre mayor estrés.

Otros estudios previos, realizados por varios grupos (Quarto et al) han cuantificado el número de células en modelos animales viejos demuestran que varía tanto el número celular como su actividad osteogénica. Egrise et al encuentran que el número de CSM si disminuye pero no la actividad de la Fosfatasa alcalina, Marie et al. también afirma una disminución potencial en el crecimiento.

Trabajos previos de otros autores han analizado el comportamiento de las CSM provenientes de pacientes de edad avanzada y/o con osteoporosis. Algunos de estos trabajos sugieren que la disminución en la capacidad proliferativa de las CSM estaba directamente relacionada con la edad (Rodriguez 1999), mientras que otros autores no confirman estos hallazgos (Bellantuono 2009, MA Baxter, Stenderup). Así Stenderup et al consideran que el defecto de la formación ósea y de la mineralización es debido a la alteración del micro medio ambiente secundario a la edad. teoría no compartida por

Puesto que, como acabamos de decir, a partir de las cabezas femorales osteoporóticas obteníamos menor número de CSM, quisimos confirmar con otros métodos si realmente existía una disminución en la proliferación. Para ello, se realizaron estudios de ciclo celular y comprobamos que la proporción de células en fases S-M de las CSM procedentes de la cabeza femoral de los pacientes era menor que las CSM procedentes de MO del mismo paciente.

Dentro de los criterios necesarios para la caracterización de las MSC exigida por la ISCT se necesita demostrar su potencial de diferenciación a tres líneas celulares: adipocito, osteoblasto y condrocito. En cuanto a este potencial de diferenciación nuestros resultados discrepan de los estudios de Jones y colaboradores los cuales trabajaron con CSM nativas o sometidas a una mínima expansión celular, ya que aseguran que en la expansión estas células pierden potencialidad, echo que en nuestro caso dicha potencialidad no se ha visto afectada ni tampoco en otros trabajos (LEE de osteonecrosis, Tuli, Marie-review)<sup>36</sup>.

El estudio fenotípico de las CSM constituye uno de los criterios necesarios establecidos por la ISCT para su caracterización. Pese a los múltiples intentos que se han llevado a cabo con el fin de buscar marcadores específicos que identifiquen estas células en varios tejidos, pero hoy por hoy todavía no se ha definido un único panel que permita su caracterización. Esto condiciona que sea necesario realizar al menos el panel recomendado por ISCT para definir estas células. La mayoría de los autores coinciden en que las MSC de estos pacientes tienen idénticos marcadores que las CSM de sujetos

sanos.<sup>76,77</sup> Datos de nuestro grupo (Sánchez-Guijo,) demuestran que las CSM procedentes de cabeza femoral cumplen los criterios mínimos de definición de CSM propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). Aunque al comparar la intensidad de fluorescencia del marcador CD90 observamos que era significativamente mayor en las muestras procedentes de cabeza femoral con respecto a las CSM de aspirado medular. Curiosamente, cuando en el presente trabajo hemos comparado este marcador, CD90, en nuestros pacientes hemos comprobado que su expresión es menor sobre todo en las cabezas femorales. Estos resultados coinciden con los publicados previamente, en los que observaron que la expresión de CD90 es menor en las MSC de estos pacientes. Hay que resaltar que dicho marcador es considerado de inmadurez. Su menor expresión podría suponer en estas células un mayor grado de diferenciación lo que iría unido a su menor capacidad proliferativa.

De hecho se ha publicado previamente que la expresión de CD90 es menor en las MSC de estos pacientes, dato confirmado en el presente trabajo. Esta menor expresión podría estar implicada en la relación alterada entre el estroma medular y las células hematopoyéticas.

El diagnóstico de los pacientes con osteoporosis se hace en base a un descenso en la masa ósea, Teóricamente este descenso en la formación ósea puede deberse a un descenso en la capacidad de diferenciación y posterior reclutamiento de osteoblastos o bien a una disminución en la actividad de los osteoblastos maduros. El segundo objetivo que nos planteamos fue analizar si estas CSM procedentes de cabezas femorales osteoporóticas tenían una

capacidad de diferenciación normal. Cuando realizamos el análisis cualitativo observamos que tal y como exige la ISCT, las CSM se diferenciaban a osteoblasto, adipocito y condrocito. Sin embargo cuando medimos la capacidad de mineralización con una tinción semicuantitativa mediante Rojo de Alizarina comprobamos que existe una disminución significativa en las CSM de la cabeza femoral de pacientes con osteoporosis, mientras esta conservada en las CSM provenientes de MO, datos coincidentes estos últimos con los estudios de otros autores( Stenderup, Mari et al). Esto sugiere que el descenso de masa ósea y déficit de mineralización se produce en las CSM de cabezas femorales de pacientes con osteoporosis. Una vez comprobado que estas CSM procedentes de cabezas femorales eran funcionalmente anómalas quisimos comprobar si genes implicados en la diferenciación osteogénica podrían estar diferencialmente expresadas en estas células y de este modo justificar su diferenciación ósea deficitaria. Para ello, analizamos por PCR cuantitativa genes claves en la diferenciación osteoblástica: fosfatasa alcalina (**ALP**) importante en la fase de proliferación , colágeno 1A1 (**COL1A1**), proteína morfológica del hueso (**BMP2**) y factor de transcripción **RUNX2** genes cuya mayor expresión se alcanza durante la fase de diferenciación o maduración de la matriz, y finalmente el resto de marcadores analizados presentan su pico máximo de expresión en la fase de mineralización: **SPARC** (*osteonectina*), **SPP1** (*osteopontina*) y **BGLAP** (*osteocalcina*). (Kulterén)

Existen datos en la literatura sobre la expresión de diferentes genes implicados en la diferenciación ósea en pacientes con osteoporosis. Sin embargo, estos estudios se han llevado a cabo en muestras obtenidas de hueso. Nosotros hemos preferido analizar estos genes en las CSM, las progenitoras de las

osteoblastos, para comprobar si ya, a ese nivel de diferenciación dichos genes se encuentran alterados.

La fosfatasa alcalina esta implicada en la diferenciación ósea ya que va aumentando progresivamente desde el principio de la diferenciación hasta el día 4 y decrece a partir del día 14 hasta el 21 durante la fase de mineralización. El gen que codifica para esta proteína, se ha visto en estudios desarrollados por Balla et al 2008, estaba infraexpresado en el hueso osteoporótico comparado con el hueso normal. Los datos presentados en el estudio muestran que, a nivel de CSM este gen está infraexpresado, pero únicamente cuando las CSM se obtienen de la cabeza femoral con osteoporosis. Por el contrario, las CSM obtenidas de la MO de estos pacientes tiene una expresión aumentada con respecto a las obtenidas de MO de sujetos sanos, pareciendo que están, de alguna manera, compensando con un incremento en su expresión, el defecto de diferenciación a hueso.

Proteína formadora del hueso 2 (**BMP2**), como su propio nombre indica es fundamental para formar el hueso. El gen, **BMP2**, que codifica para esta proteína tiene mayor expresión basal en las CSM de cabeza femoral que en los otros tipos de CSM de estudio. Ha sido estudiada en el contexto de la osteoporosis y se ha asociado con la patofisiología de la enfermedad. Se han descrito ventajas que suponen que el tratamiento local o sistémico de fracturas osteoporóticas con BMPs inducen un rápido aumento de la fortaleza ósea en el área de la fractura.(Kanakaris 2009).

Posteriormente quisimos comprobar la diferente expresión de los genes una vez inducidas las CSM a diferenciación. Para comprobar su incremento

calculamos el ratio de incremento de cada gen dividiendo la expresión en el día + 14 entre la expresión basal.

El único gen que presentaba diferencias significativas en el ratio de incremento fue el gen de la osteocalcina, **BGLAP**. Es un gen tardío en la diferenciación ósea ya que alcanza su pico máximo de expresión a partir del día 14(Kulteren). Cuando hemos analizado su expresión en este momento hemos comprobado que su incremento era muy superior en las CSM de MO con osteoporosis comparandolas con los otros dos grupos de células por lo que nuestros resultados muestran una mayor expresión basal en las CSM de cabeza femoral ya que cabe pensar que la población en este tipo de muestra sean CSM ya maduras.

El Colágeno tipo I, , es el componente principal de la matriz ósea y es sintetizado por los osteoblastos para finalizar la etapa de resorción ósea, **COL1A1**, es el gen que codifica para esta molécula. Hasta donde alcanza nuestro estudio, no hay ningún estudio que cuantifique la expresión de este gen en MSC de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis. Estudios previos indican que las CSM de médula ósea de pacientes con osteoporosis producen menos cantidad de colágeno tipo I que las CSM de donantes sanos(Pablo Rodriguez. Journal of Cellular Biochemistry 2000). Nosotros no hemos analizado la capacidad de síntesis, únicamente hemos analizado la capacidad de estas células de incrementar la expresión del gen que la codifica. Curiosamente, su incremento es similar en las CSM de MO sanas que en las procedentes de cabeza femoral, pero se incrementa mucho en las CSM procedentes de MO de estos pacientes. Resultados similares se reflejan en el

análisis de otros genes como: **SPARC**, gen que codifica para la osteonectina y **SPP1**, que codifica para osteopontina.

Dos genes que también hemos considerado interesantes han sido, el gen **DKK1** y el gen que codifica la interleucina 6, **IL6**. Estos genes no están directamente implicados en la diferenciación ósea. **DKK1** es un inhibidor de la vía canónica de *Wnt* (Kawano 2003, Park 2008), este gen está aumentado en las CSM de cabezas femorales al inducir su diferenciación, lo que sugiere que no solo está bloqueada sino que están aumentados sus inhibidores.

En resumen todos estos resultados sugieren que las CSM de pacientes con osteoporosis presentan una capacidad de diferenciación osteogénica deficitaria desde el punto de vista de la mineralización así como de expresión génica.

En resumen el estudio de cuantificación de la mineralización ósea confirma que las CSM de la fractura osteoporótica tienen menor capacidad de diferenciación ósea y como es lógico al tener menor osteoblastos presentan menor potencial de mineralización tal como ocurre en los estudios sobre células de hueso trabecular de Balla-07 y Hopwood.-09

Hemos querido estudiar si estas células presentan otras alteraciones genómicas para poder dar respuesta al interrogante de la presencia o no de alteraciones genómicas en estas células. Para ello hemos llevado a cabo el estudio mediante técnica de CGH arrays, técnica más sensible que permite estudiar las pérdidas o ganancias de material genómico. En todos los casos analizados de pacientes con osteoporosis se encontraron anomalías, al igual

que las MSC de los donantes sanos que tampoco presentaban cambios recurrentes. En las MSC de cabeza osteoporóticas aparecieron pérdidas de más de un clon consecutivos en tres cabezas femorales pero como ya hemos comentado en la sección de resultados estas pérdidas no eran recurrentes y además no estaban relacionados directamente con genes implicados en osteogénesis. Hasta el momento no se han descrito resultados que presenten alteraciones genómicas que puedan justificar la patología de la enfermedad, por lo cual esto constituye la primera descripción de CGH arrays en CSM procedentes de pacientes con osteoporosis. Si hemos visto estos mismos estudios y con resultados no recurrentes también, en CSM de pacientes con mieloma múltiple que como ya es conocido es una enfermedad que puede cursar con lesiones osteolíticas.

Como hemos referido previamente en el capítulo de resultados, en el estudio de arrays de expresión se llevó a cabo un análisis no supervisado donde encontramos que las MSC de hueso trabecular de los pacientes con osteoporosis se agrupaban en un cluster bien diferenciado, cluster A, y en el cluster B se incluía las CSM de medula ósea de cresta iliaca del mismo paciente con osteoporosis. Estos hallazgos sugieren que algo sucede en las CSM del paciente con osteoporosis que las clasifica por fuente de obtención.

Con el fin de profundizar sobre las diferencias halladas entre ambos cluster en el estudio del perfil de expresión, decidimos analizar qué genes y vías de señalización, que pudieran estar implicados en el desarrollo de la osteoporosis, podrían estar expresados de forma diferente en ambos cluster. Varios genes aparecían sobreexpresados en el cluster B, las CSM de cabeza femoral, los

cuales podrían desempeñar un importante papel en la patogénesis y en las características clínicas de la enfermedad.

Recientemente se ha comenzado a plantear la hipótesis de que en osteoporosis se presentan un desequilibrio entre la diferenciación osteogénica y la diferenciación adipocítica, favoreciéndose la adipogénesis en el hueso osteoporótico a la vez que se bloquea la osteogénesis (Takada). Como se parte de la idea de que tanto los adipocitos como los osteoblastos provienen de un precursor común, la célula stem mesenquimal, pues se cree que este desequilibrio lo deben presentar dichas CSM.

Estudios previos (Hopwood) han visto implicados un número de vías de señalización y genes en la patogénesis de la osteoporosis, estas incluyen la vía de Wnt, entre otras, y moléculas relacionadas con la diferenciación adipocítica.

Elegimos los siguientes genes, ya que presentaban un valor significativamente mayor en las cabeza femorales, para su estudio más detallado: genes implicados en la regulación de la diferenciación adipocítica (***AEBP1***, ***PPAR $\gamma$*** , ***HSD11 $\beta$ 1***), genes implicados indirectamente en la diferenciación osteogénica (***PDE1A***, ***RBP4***), genes implicados en la diferenciación ósea (***RUNX2***) y también genes implicados en la vía de señalización *Wnt* (***SFRP1***,***SFRP4***).

Analizamos la expresión de estos genes mediante PCR cuantitativa en una serie de 15 pacientes con osteoporosis, con sus respectivas muestras de cabeza femoral y cresta ilíaca, y 8 individuos sanos.

El gen ***AEBP1*** es un factor transcripcional pro-adipogénico a la vez que actúa como represor de la diferenciación osteogénica.(Ohno 1996)(Pacenti 2006)

***HSD11 $\beta$ 1***, *hidroxiesteroide 11 beta deshidrogenada 1*, juega un importante papel en la formación de adipocitos (Justesen2004). Existiendo una relación

inversa entre la expresión de este gen y la diferenciación osteoblástica (Eijken 2005). Además se sabe también que un incremento de la expresión de este gen en el tejido adiposo va asociada a obesidad y resistencia a insulina (Makkonen J 2007).

**PPAR $\gamma$**  es el factor de transcripción imprescindible para la diferenciación adipogénica.

El análisis estadístico de los resultados muestra que la sobreexpresión de los genes que favorecen la adipogénesis fue significativa en las Células Stem Mesenquimales de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis frente a las CSM de médula ósea de cresta iliaca del mismo grupo de pacientes. Lo que confirma junto con otros estudios que estos genes juegan un papel importante en el desequilibrio existente en cuanto a diferenciación en la osteoporosis pero existiendo únicamente este desequilibrio en las mesenquimales procedentes de la cabeza femoral y no en las CSM de médula ósea de la cresta iliaca del mismo paciente. Referente al gen **PPAR $\gamma$**  este gen no se presentó sobreexpresado en los trabajos de Hopwood mientras que nuestros resultados sí muestran un Fold. Change próximo a 2. Además comentar que Hopwood trabajó con células obtenidas directamente de hueso y médula ósea a las cuales extrajo ARN y realizó arrays de expresión en ningún momento habla de CSM ni seleccionadas directamente ni expandidas *in vitro*.

Otros genes que se aparecían sobre expresados eran genes que se encuentran indirectamente bloqueando la osteogénesis como **PDEA1**, fosfodiesterasa 1, proteína perteneciente a una superfamilia de enzimas conocidas como nucleótidos fosfodiesteras que actúan inactivando al AMPc, adenosina monofosfato cíclico, un importante mensajero secundario en

la regulación hormonal del metabolismo óseo como puede ser la hormona paratifoidea (PTH).

Nuestros estudios sugieren al igual que los realizados con líneas celulares de osteosarcoma (AHLStröm2005) una sobre expresión de esta enzima lo que hace que el AMPc quede inactivo y la regulación hormonal del hueso quede bloqueada.

Otro gen que también se presenta sobreexpresado en las CSM de cabeza femoral de los pacientes con osteoporosis fue **RBP4**, la proteína transportadora de retinol 4. Es una proteína sintetizada por adipocitos y se ha demostrado que mantiene una relación negativa con la osteocalcina proteína indicadora de la actividad osteoblástica en suero sanguíneo (Högström 2008), aunque no se conoce si esta proteína esta relacionada con la densidad de masa ósea. Estos datos corroboran nuestros resultados ya que hemos visto sobreexpresión del gen RBP4 mientras, como hemos comentado anteriormente, las CSM procedentes cabeza femoral de pacientes con osteoporosis presentan mineralización disminuida.

Para finalizar nos intereso mucho la sobre expresión, muy elevada, de dos antagonistas de la vía de *Wnt*, **SFRP1 y SFRP4**. Proteínas relacionadas con los dedos de Zinc, las cuales contienen un dominio rico en cisternas por las cuales interacciona con las proteínas WNT. Se a comprobado que provocando una mutación de SFRP1 en ratones resultaba una aumento en la masa ósea entre los 7 y 9 meses, lo que sugiere que esta proteína mantiene la masa ósea del esqueleto adulto y cuándo ella esta mutada aparece una sobre expresión de **RUNX2**,(Gaur 2005) lo que se encuentra en concordancia con nuestros

resultados ya que su elevada expresión provoca una pérdida de masa ósea en pacientes con osteoporosis al compararlos con individuos sanos, pero además la expresión es mayor en las CSM de cabeza femoral donde se ha producido la fractura osteoporótica, que es como hemos explicado anteriormente el microambiente donde se desarrolla la enfermedad.

Existe una hipótesis alternativa sobre cuál es el mecanismo antagónico de estas proteínas. Así se ha demostrado que **SFRPs**, se unen a receptor Znc formando un complejo inactivo (Kawano), efectivamente Bafico et al demostraron este hecho en el que **SFRP1** se une a HFz6. Por todo esto se sugiere que las proteínas **SFRPs** lo cual sugiere que a altas concentraciones de receptores ellas actuarían como ligandos activos, en este contexto actuarían como antagonistas cuando hubiera poca concentración de receptores, lo cual concuerdan con los resultados presentes en CSM de cabeza femoral en las cuales la expresión de **FRZB**, receptor de proteínas *Wnt*, se encuentra infraexpresada mientras que como hemos comentado anteriormente las proteínas de nuestro estudio de **SFRP1 y 4** se encuentran sobreexpresadas.

Previamente se ha visto que ante entre los procesos que se aceleran para curar una rotura aparece un aumento de la vía de Wnt debido a un aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina, el trabajo de Gaur et al 2009 demuestra que el aumento en la vía de Wnt también se puede deber a una pérdida de función de **SFRP1** en los estadios primeros de reparación ósea, lo cual está sugiriendo que si se ha producido una fractura osteoporótica donde la expresión de **SFRP1** es elevadísima como ocurre en nuestros estudios cuando se desencadenan los procesos para la reparación de esa fractura lo primero que

pierde actividad esta proteína. Otros estudios se refieren a SFRPs como proapoptóticas en otras enfermedades (Melkonyan et al 1997).

Todo lo dicho anteriormente se puede aplicar a otra proteína de la misma familia, **SFRP4**, cuya expresión como hemos comentado en este capítulo también es muy elevada. Estudios previos han demostrado que estos niveles aumentan gradualmente durante la adipogénesis vía inhibición de *Wnt*. Por lo que todos estos resultados muestran que los antagonistas de la vía de *Wnt*, **SFRPs y DKK1**, presentan una importante función en la adipogénesis de MSC de tejido adiposo (Park 2008). Quizás estos resultados podamos extrapolarlos a nuestras CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis.

En definitiva, nuestros resultados ilustran que las MSC procedentes de cabeza femoral no sólo presentan un crecimiento alterado, con una mineralización disminuida confirmada con la expresión de los genes implicados en el proceso de diferenciación ósea, sino también un perfil de expresión característico de pacientes con osteoporosis. Es lo que no se ha observado en los otros dos tipos de CSM a estudio.



## 7. Conclusiones



De lo expuesto en el presente trabajo podemos concluir:

**1. En relación a las características de las CSM procedentes de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis**

1.A. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis tienen menor capacidad de crecimiento in vitro menor al compararlas con las CSM de médula ósea del mismo paciente y de las CSM de MO de sujetos sanos.

1.B. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis presentan el patrón de expresión fenotípico característico de las CSM pero con infraexpresión de algunos marcadores como CD90, CD73, CD105, CD166 y con sobreexpresión de CD106.

1.C. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis se encuentran la mayoría en fase G0-G1, es decir quiescentes.

**2. En relación con su capacidad de diferenciación**

2.A. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis son capaces de diferenciarse a adipocito, osteoblasto y condrocito.

2.A. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis presentan la diferenciación ósea mantenida, pero al cuantificar la capacidad de mineralización está esta alterada.

### 3. En relación con la presencia de alteraciones genómicas:

3.A. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis no presentan alteraciones genómicas recurrentes cuando se analizan mediante CGH-Array.

### 4. En relación a la expresión de genes relacionados con la diferenciación osteogénica y adipogénica:

4.A. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis tienen un patrón de expresión genica definido que las agrupa en un cluster diferenciado del cluster de las CSM de médula ósea de cresta iliaca del mismo paciente.

4.B. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis presentan sobreexpresión de genes, como **AEBP1**, **PPAR $\gamma$**  y **HSD11 $\beta$ 1**, relacionadas con la diferenciación adipocítica.

4.C. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis presentan sobreexpresión de genes antagonistas de la vía *Wnt* como **SFRP1** y **SFRP4**, implicados en el bloqueo de diferenciación osteogénica

4.D. Las CSM de cabeza femoral de pacientes con osteoporosis presentan sobreexpresión de genes, como **PDEA1** y **RBP4**, implicados indirectamente en la inhibición de la diferenciación ósea.

4.E. >Todos estos datos sugieren la existencia de un desequilibrio entre la diferenciación osteogénica / diferenciación adipogénica en las cabezas de fémures de pacientes con osteoporosis.



## 8. Bibliografía



Reference List

1. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002;12:502-508.
2. TILL JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat.Res.* 1961;14:213-222.
3. Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin.Reprod.Med.* 2006;24:379-388.
4. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp.Hematol.* 2000;28:875-884.
5. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2004;4:290-294.
6. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2004;36:568-584.
7. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res.Ther.* 2007;9:204.

8. Airey JA, Meida-Porada G, Colletti EJ et al. Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation* 2004;109:1401-1407.
9. Silva GV, Litovsky S, Assad JA et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111:150-156.
10. Moscoso I, Barallobre J, de Ilarduya OM et al. Analysis of different routes of administration of heterologous 5-azacytidine-treated mesenchymal stem cells in a porcine model of myocardial infarction. *Transplant.Proc.* 2009;41:2273-2275.
11. Ferrari M, Corradi A, Lazzaretti M et al. Adult stem cells: perspectives for therapeutic applications. *Vet.Res.Commun.* 2007;31 Suppl 1:1-8.
12. Tsai PC, Fu TW, Chen YM et al. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. *Liver Transpl.* 2009;15:484-495.
13. Erices AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, Minguell JJ. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant.* 2003;12:555-561.
14. Shih DT, Lee DC, Chen SC et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005;23:1012-1020.

15. Hare JM, Chaparro SV. Cardiac regeneration and stem cell therapy. *Curr.Opin.Organ Transplant.* 2008;13:536-542.
16. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis.Colon Rectum* 2005;48:1416-1423.
17. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis.Colon Rectum* 2009;52:79-86.
18. Lee RH, Seo MJ, Reger RL et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006;103:17438-17443.
19. Le BK, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2005;11:321-334.
20. Le BK. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003;5:485-489.
21. Brooke G, Cook M, Blair C et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2007;18:846-858.
22. Caplan AI. Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine, fundamental research and mesenchymal stem cells. *Connect.Tissue Res.* 1995;31:S9-14.

23. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J et al. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 2008;11:343-353.
24. Caplan AI. Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine, fundamental research and mesenchymal stem cells. *Connect.Tissue Res.* 1995;31:S9-14.
25. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J et al. Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Pain Physician* 2008;11:343-353.
26. Farrell CM, Berry DJ, Cabanela ME. Autogenous femoral head bone grafts for acetabular deficiency in total-hip arthroplasty for developmental dysplasia of the hip: long-term effect on pelvic bone stock. *J.Arthroplasty* 2005;20:698-702.
27. Jethva RF, Otsuru S FAU - Dominici M, Dominici MF, Horwitz EM. Cell therapy for disorders of bone.
28. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos.Int.* 1994;4:368-381.
29. The World Health Report: changing history. 2004. Geneva.  
Ref Type: Generic
30. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in

- acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901-1928.
31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
  32. Chen SL, Fang WW, Ye F et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am.J.Cardiol.* 2004;94:92-95.
  33. Chen SL, Fang WW, Qian J et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med.J.(Engl.)* 2004;117:1443-1448.
  34. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J et al. Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Pain Physician* 2008;11:343-353.