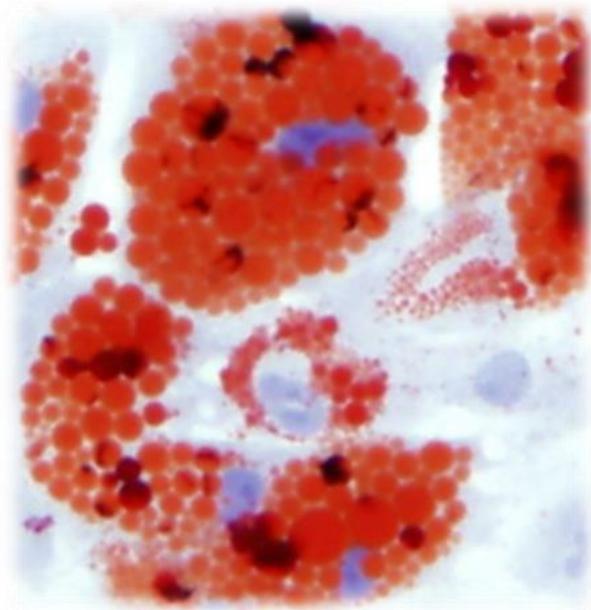




Aislamiento, caracterización y análisis de células estromales humanas obtenidas de médula ósea.

Illamento, caracterización e análise de células estromais humanas obtidas de medula ósea.

Isolation, characterization and analysis of human stromal cells obtained from bone marrow.



Alejandro Durán Sotuela

Xullo, 2017



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Instituto de investigación biomédica de A Coruña (INIBIC).

Facultade de ciencias.

Aislamiento, caracterización y análisis de células estromales humanas obtenidas de médula ósea.

Illamento, caracterización e análise de células estromais humanas obtidas de medula ósea.

Isolation, characterization and analysis of human stromal cells obtained from bone marrow.

Alejandro Durán Sotuela

A Coruña, Xullo 2017

Ángela Vela Anero autoriza a presentación do traballo de fin de máster “Aislamiento, caracterización y análisis de células estromales humanas obtenidas de médula ósea” realizado por Alejandro Durán Sotuela para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 3 de Xullo de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ángela Vela Anero', written in a cursive style.

Asdo: Ángela Vela Anero. (Directora do traballo)

Índice

Abreviaturas	<i>Página</i>
	2
Introducción.	<i>Página</i>
1. <i>Cartílago articular, estructura y función.</i>	3
2. <i>Mantenimiento y degradación del cartílago articular.</i>	4
3. <i>Artrosis.</i>	6
4. <i>Tratamiento de la artrosis.</i>	8
5. <i>Células madre.</i>	9
Objetivos.	<i>Página</i>
	11
Material y métodos.	<i>Página</i>
1. <i>Obtención de las muestras.</i>	12
2. <i>Procesado de las muestras.</i>	12
3. <i>Subcultivo celular.</i>	13
4. <i>Técnica del preplating.</i>	13
5. <i>Análisis de micoplasma.</i>	13
6. <i>Diferenciación de los cultivos.</i>	14
7. <i>Tinciones histológicas.</i>	15
8. <i>Inmunohistoquímica.</i>	19
9. <i>Caracterización fenotípica por citometría de flujo.</i>	20
10. <i>Análisis estadístico.</i>	20
Resultados.	<i>Página</i>
1. <i>Estudio de la proliferación celular.</i>	21
2. <i>Citometrías.</i>	22
3. <i>Tinciones histológicas de condrogénesis.</i>	24
4. <i>Tinciones histológicas de adipogénesis y osteogénesis.</i>	29
5. <i>Tinciones inmunohistoquímicas.</i>	30
Discusión.	<i>Página</i>
	32
Conclusiones.	<i>Página</i>
	36
Bibliografía.	<i>Página</i>
	37

Abreviaturas

CHUAC	Complejo hospitalario universitario de A Coruña
CMM	Células madre mesenquimales estromales
DE	Desviación estándar
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>FACS</i>	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
GAG	Glucosaminoglucanos
INIBIC	Instituto de investigación biomédica de A Coruña
MEC	Matriz extracelular
<i>MHC</i>	<i>Major histocompatibility complex</i> , Complejo mayor de histocompatibilidad
<i>MMPs</i>	<i>Matrix metalloproteinases</i> , Metaloproteasas de matriz
<i>NO</i>	<i>Nitrogen oxide</i> , óxido nítrico
<i>NSAID</i>	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i> . Antiinflamatorios no esteroideos
<i>OA</i>	<i>Osteoarthritis</i> , artrosis
<i>OARSI</i>	<i>Osteoarthritis Research Society International</i> , Sociedad Internacional de Investigación de Artrosis
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
PG	Proteoglicanos
S 0, 1, 2, 3	Subcultivo 0, 1, 2, 3.
SBF	Suero Bovino Fetal
<i>SYSADOA</i>	<i>Symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis</i> , antiartrósicos sintomáticos de acción retardada
<i>TGF</i>	<i>Transforming growth factor</i> , factor de crecimiento transformante
<i>TIMPs</i>	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> , inhibidores de metaloproteasas tisulares

Introducción

1. Cartílago articular, estructura y función.

El cartílago articular es un tejido de tipo hialino presente en las articulaciones diartrodiales. Está desprovisto de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Su superficie tiene una transparencia variable y un color blanquecino y su espesor varía entre micras y unos pocos milímetros. Las articulaciones que soportan las mayores cargas presentan cartílagos más gruesos, por ejemplo en humanos la cadera y la rodilla tienen un espesor medio relativo de entre 2 y 5 mm, y la rótula es la superficie articular con mayor grosor rondando los 6 o 7 mm (Espanha, 2010).

Es un tejido altamente diferenciado formado por un reducido número de células, los condrocitos (2-3% del cartílago) y una matriz extracelular (MEC) que los rodea (97-98% restante) (Benito, 2002; Espanha, 2010). Los condrocitos son el único elemento celular de este tejido y son los encargados de la síntesis del colágeno y otras macromoléculas, reparando y renovando la MEC. La unidad básica funcional del cartílago es el condrón, formado por el condrocito, el lugar que ocupa en la matriz (laguna), la matriz pericelular sintetizada por el propio condrocito, y una capa de fibras colágenas que otorgan protección mecánica.

La MEC consta de dos fases:

- Fase líquida: constituye el 80% del peso total del cartílago y está compuesta de agua. La distribución de este componente varía según la profundidad, presentando mayor concentración en la superficie. Su interacción con las macromoléculas de la fase sólida de la matriz proporciona al cartílago elasticidad, y además permite la nutrición de los condrocitos y mayor lubricación de la articulación.
- Fase sólida: representa aproximadamente el 20% del peso total del cartílago. Está formada por un armazón de fibras de colágeno y un gel formado principalmente por agregados de proteoglicanos (PG) y otras glucoproteínas y proteínas no colágenas. El colágeno más abundante es el tipo II, que es sintetizado por los condrocitos y forma un entramado en forma de malla que proporciona a la matriz resistencia a la tensión. El PG más importante es el agregano, que también es sintetizado por los condrocitos, estos compuestos son macromoléculas con un eje central proteico al que se conectan glucosaminoglucanos (GAG). Los PG confieren elasticidad al cartílago.

Este tejido presenta la siguiente estructura en capas, Fig. 2 (Benito, 2002; Espanha, 2010):

- Zona superficial o tangencial: zona con el mayor contenido de colágeno ya que está especializada en el deslizamiento. Las fibras de colágeno se orientan paralelamente con respecto a la superficie.
- Zona media o de transición: representa entre el 40 y 60% del grosor total. Las fibras de colágeno se orientan de forma oblicua con respecto a la superficie.
- Zona profunda: El contenido en PG es abundante. Las fibras de colágeno se orientan perpendicularmente con respecto a la superficie.
- *Tidemark*. Zona basófila que marca el límite entre zona profunda y zona calcificada.
- Zona calcificada: la matriz se encuentra mineralizada y el contenido en PG está muy reducido. Marca el límite entre el cartílago y el hueso subcondral.

Los componentes y la estructura de este tejido son fundamentales para que el cartílago realice sus dos funciones principales: deformarse al sufrir una carga mecánica y actuar como una suave superficie de deslizamiento en las articulaciones. Esto permite a la articulación absorber el estrés mecánico y realizar su movimiento con bajos niveles de fricción (Creamer y Hochberg, 1997)

2. Mantenimiento y degradación del cartílago articular.

El mantenimiento y la reparación de este tejido es llevado a cabo por su componente celular: los condrocitos. Estas células mantienen un equilibrio entre procesos anabólicos y catabólicos de la MEC (síntesis y degradación respectivamente). Distintos elementos ambientales y/o bioquímicos pueden producir alteraciones en el equilibrio metabólico de los condrocitos (Fig.

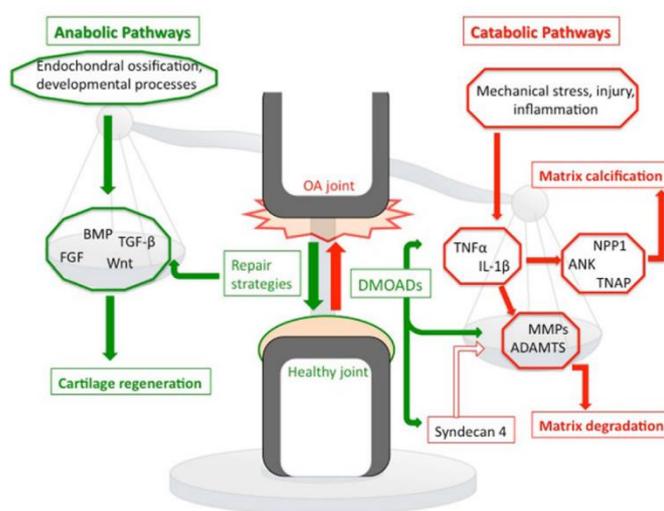


Fig. 1. El equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos es fundamental para el mantenimiento de un cartílago sano. Fuente Umlauf *et al.*, 2010.

1), favoreciendo los procesos catabólicos frente a los anabólicos y degradando así el cartílago (Umlauf *et al.*, 2010).

El aporte de nutrientes y oxígeno de los condrocitos se realiza mediante difusión del agua del cartílago desde los vasos hasta los condrocitos. Este proceso es favorecido gracias al propio movimiento de la articulación, permitiendo así la correcta nutrición de los condrocitos (Muñíos, 2010). En condiciones óptimas la energía necesaria para realizar la síntesis de matriz proviene de la metabolización de la glucosa en condiciones de anaerobiosis, pero cuando esta vía queda desbordada, los condrocitos realizan un metabolismo oxidativo mediante la degradación de la matriz por combustión (Trujillo, 2002). Por tanto, los factores que pueden promover la degradación de la MEC pueden ser de dos tipos: factores mecánicos y factores bioquímicos.

Los factores mecánicos son debidos a la sobrecarga que sufren las articulaciones. Dicho proceso puede generar desgaste por interacción de las superficies de la articulación, apareciendo abrasión y arañazos, o puede generar desgaste por fatiga, por deformación de las superficies en contacto y acumulación de daños microscópicos (Trujillo, 2002). A pesar de que la carga mecánica en la articulación puede producir daños en ésta, es un proceso fundamental para la generación de estímulos biomecánicos en los condrocitos y la nutrición de éstos, por tanto una inmovilización de la articulación supondría cambios en la composición del cartílago articular (Musumeci, 2016).

Los factores bioquímicos hacen referencia a elementos que alteran los factores liberados por los condrocitos. Para realizar tanto su función catabólica como la anabólica estas células pueden sintetizar y secretar una gran variedad de compuestos. Para favorecer el anabolismo secretan distintos factores de crecimiento (IGF, $TGF-\beta$, PDGF y bFGF) que aumentan la síntesis de colágeno II, síntesis de PG, síntesis de inhibidores de metaloproteasas tisulares (*TIMPs*) y la proliferación celular. En cambio, pueden favorecer el proceso catabólico sintetizando distintas citoquinas, prostaglandinas, óxido nítrico (NO), proteasas y glicosidasas (Trujillo, 2002).

Enfermedades del cartílago articular como la artrosis (*OA*) pueden dar lugar a un proceso inflamatorio favoreciendo la expresión de factores pro-inflamatorios que desequilibran el metabolismo de los condrocitos hacia la vía catabólica. Los elementos predominantes son la citoquina IL-1 y TNF- α , éstas son sintetizadas por los condrocitos y estimulan su producción de forma autocrina o paracrina. Ambas citoquinas favorecen la vía catabólica ya que inducen la síntesis de metaloproteasas de matriz (*MMPs*), agreganasas, NO, prostaglandinas, otras citoquinas como la IL-8 y la IL-6, y también son capaces de reducir la síntesis de los *TIMP* (Umlauf *et al.*, 2010; Vela, 2015). Como

resultado de este proceso inflamatorio, la degradación del cartílago articular se ve favorecida frente a la síntesis, dando lugar a daños en el cartílago y pérdida de calidad de vida.

3. Artrosis.

La *OA* es una enfermedad degenerativa del cartílago articular que supone la alteración de éste y del hueso subcondral. Como resultado, el paciente sufre dolor, pérdida de movimiento y funcionalidad articular a medida que la enfermedad progresa, reduciéndose notablemente su calidad de vida. La *OA* puede ser idiopática y considerarse una enfermedad definida en sí misma, o puede ser una causa secundaria a otra enfermedad como por ejemplo la artritis reumatoide (Alonso, 2002).

Es una patología presente tanto en humanos como en animales y la enfermedad articular más frecuente del mundo desarrollado. Afecta a aproximadamente 8,5 millones de personas en Reino Unido (Roberts *et al.*, 2011) y 26,9 millones de personas en Estados Unidos (EEUU) (Umlauf *et al.*, 2010). En España es una de las enfermedades reumáticas más importantes, lo cual supone un elevado consumo de recursos sanitarios (Carmona, *et al.*, 2001). En el estudio de Loza *et al.*, 2009 se realizó una estimación del coste nacional de la población española con *OA*, basándose en que la población española mayor de 20 años en 2007 era de 36.389.028 personas, la prevalencia de la *OA* de rodilla 10,2% y de cadera 4%, y el coste medio anual por paciente de 1.502 euros, determinando así un coste nacional anual de 4.738 millones de euros.

De entre todas las especies animales, donde más se diagnostica esta enfermedad es en los perros debido a que actualmente son las mascotas más habituales y en las que más se invierte en salud. Uno de cada cuatro de los 77,2 millones de perros domésticos en EEUU presenta algún tipo de *OA*. Esta enfermedad tiende a ser más común en razas grandes que en las pequeñas, y sobre el 20% de los perros mayores de un año la padecen, aumentando su prevalencia con la edad. Los perros afectados muestran la misma sintomatología y las mismas limitaciones en su vida diaria que las personas que la padecen, dolor, rigidez articular, así como dificultad para para sentarse, tumbarse y caminar (Bland, 2015).

La *OA* es una enfermedad multifactorial, dichos factores se pueden clasificar en tres grandes grupos:

- Factores genéticos: sexo, defectos hereditarios en el colágeno II, mutaciones en el gen COL2A1, raza y defectos hereditarios en huesos y articulaciones.
- Factores no genéticos del individuo: edad, sobrepeso, hormonas y otras enfermedades que desencadenen OA secundaria.
- Factores ambientales: trabajo, lesiones físicas, ocio y deporte.

Entre todos estos factores, el más relevante es la edad, la cual altera el metabolismo del cartílago haciéndolo más susceptible al daño y a la degradación (Creamer y Hochberg, 1997). Y es de esperar que debido a este factor, su prevalencia aumente en los países desarrollados ya que también aumenta la esperanza de vida (Loza *et al.*, 2009).

La OA es una enfermedad que va degradando el cartílago poco a poco, pudiéndose distinguir distintos “grados de artrosis” (Fig. 2). Según la Sociedad Internacional de Investigación de Artrosis (OARSI) existen 6 grados (Pritzker *et al.*, 2006):

- Grado 0: estado sano, superficie suave, matriz y condrocitos distribuidos adecuadamente en las tres zonas.
- Grado 1: superficie continua, pero con desigualdades. La zona media y la profunda no están afectadas.
- Grado 2: superficie discontinua. Las desigualdades superficiales se extienden hasta la zona media. Zona profunda no afectada.
- Grado 3: las fisuras verticales se extienden a la zona media, y se pueden prolongar hasta la zona profunda.
- Grado 4: erosión, se pierde matriz cartilaginosa.
- Grado 5: denudación, erosión completa del cartílago, pueden formarse microfracturas en la superficie del hueso.
- Grado 6: deformación. Debido a las microfracturas y a la reparación, se remodela el hueso y cambia el contorno de éste.

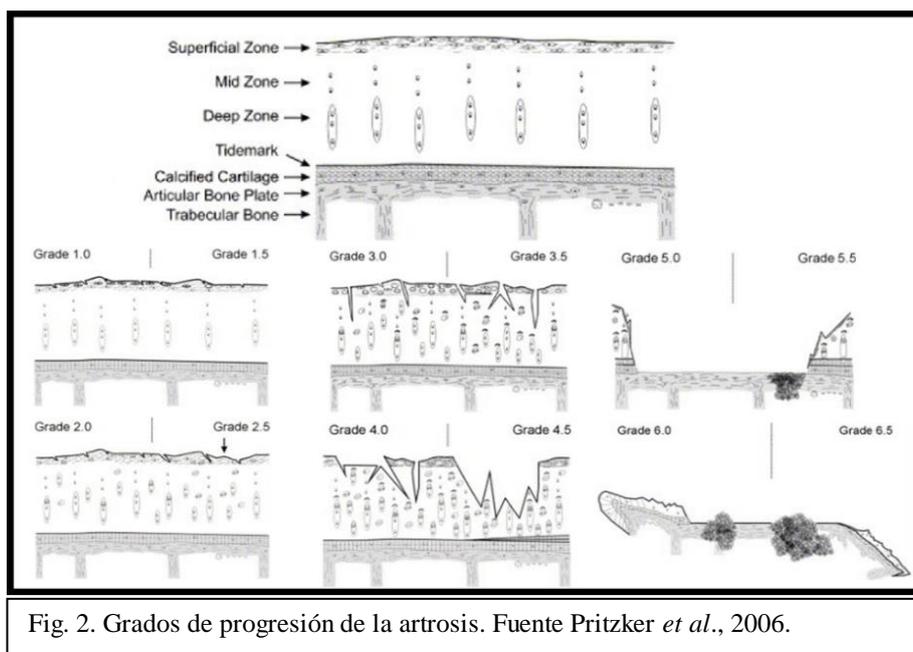


Fig. 2. Grados de progresión de la artrosis. Fuente Pritzker *et al.*, 2006.

4. Tratamiento de la artrosis.

Debido a la limitada capacidad de regeneración del cartílago ya comentada, se han tratado de desarrollar técnicas que sirviesen como una solución a largo plazo. Todas ellas tienen como objetivo: eliminar o aliviar el dolor, optimizar y mantener la función para minimizar la discapacidad, y prevenir o retardar la progresión del daño estructural de las articulaciones y los tejidos yuxtaarticulares (Vicente, 2002). El problema más común con estas técnicas es la formación de un tejido regenerativo débil que carece de integración con el tejido osteocondral (Gugjoo *et al.*, 2016).

Los tratamientos presentes a día de hoy en humanos para combatir esta enfermedad se podrían clasificar en los siguientes grupos:

- Tratamientos no farmacológicos: educación del paciente y familiares, servicios sociales, terapia ocupacional, pérdida de peso, terapia física y programas de ejercicio aeróbico. Todos estos tratamientos tienen como objetivo informar al paciente y a los familiares sobre la enfermedad y los beneficios de mantener un estilo de vida saludable (Vicente, 2002).
- Tratamientos farmacológicos: analgésicos, antiinflamatorios, antiartrósicos sintomáticos de acción retardada (*SYSADOA*) y terapias intraarticulares. Estos tratamientos tienden a ir asociados a los no farmacológicos. Los fármacos tienen como objetivo el alivio sintomático del dolor y reducir el deterioro funcional sin actuar en el proceso degenerativo articular (Vicente, 2002).

- Tratamientos quirúrgicos: microfractura, condrogénesis inducida, implante de matriz autóloga inducida, injertos osteocondrales, implantación de condrocitos autólogos, osteotomía, artroplastia y mosaicoplastia entre otros. Este tipo de tratamientos se reservan para aquellos pacientes con *OA* muy avanzadas que, aun habiendo realizado los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos, no presentan mejoría y muestran además una incapacidad grave y progresiva en sus actividades diarias. Su objetivo es aliviar el dolor, corregir la deformidad y mejorar o restaurar la función articular (Vicente, 2002; Chahla *et al.*, 2016; Richter *et al.*, 2016).

Además de estos, un nuevo tipo de tratamientos han entrado en auge en las últimas décadas, los tratamientos biológicos: uso de plasma rico en plaquetas, células madre, concentrado de médula ósea, ácido hialurónico, losartán y aceite de pescado. Estas técnicas tienden a mediar señales que pueden regular el proceso inflamatorio de la *OA* (Chahla *et al.*, 2016).

En perros destacan los siguientes tratamientos a día de hoy:

- Tratamientos no farmacológicos: uso de nutracéuticos, uso de productos naturales, control de peso, ejercicio y rehabilitación física.
- Tratamientos farmacológicos convencionales: antiinflamatorios esteroideos, antiinflamatorios no esteroideos (*NSAID*) y corticosteroides.

Además, también se está haciendo hincapié en tratamientos experimentales usando el factor de crecimiento 1 de la insulina (IGF-1), doxiciclinas, polisulfatos, GAG y la terapia con células madre (Bland, 2015).

5. Células madre.

La terapia con células madre muestra un gran potencial como terapia contra la *OA*. Estas células presentan capacidad de auto-renovación y de diferenciarse en un amplio rango de tipos celulares. El potencial de diferenciación depende de la etapa de desarrollo en la que se obtengan, por ejemplo, las células madre embrionarias son pluripotentes y son capaces de diferenciarse hacia cualquier tipo celular, mientras que las células obtenidas de los tejidos adultos son multipotentes y solo se diferencian a varios linajes celulares (Roberts *et al.*, 2011). Debido a la polémica en torno a los principios éticos del uso de células madre embrionarias, la mayoría de los estudios se centran en el uso de las

células madre mesenquimales estromales (CMM) obtenidas de tejidos adultos como tratamiento para la OA.

El uso de la terapia con células madre comenzó en pacientes animales. Existen casos clínicos de aplicación de esta terapia frente a varias patologías articulares en perros (Marx *et al.*, 2015). Además, en España ya se están utilizando como aplicación clínica para perros, gatos y caballos. En humanos existen casos clínicos de aplicación de células madre frente a lesiones en el cartílago (Kuroda *et al.*, 2007), donde aplicando CMM autólogas de médula ósea fueron capaces de reparar el daño en el cartílago. También se han hecho estudios en humanos frente a patologías en el cartílago como la OA (Davatchi *et al.*, 2011; Davatchi *et al.*, 2016), este proceso permitió a los pacientes con OA soportar más tiempo realizando actividades físicas, pero este tratamiento está en un estadio inicial y necesita ser perfeccionado.

Estas células son capaces de diferenciarse hacia distintos tipos celulares como osteocitos, condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos, hepatocitos y neuronas (Chen y Tuan, 2008). Aparte de su capacidad de diferenciación, las CMM presentan otras tres propiedades:

- Son capaces de migrar a un tejido que sufre un proceso de inflamación del mismo modo que haría un leucocito (Roberts *et al.*, 2011).
- Presentan propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias mediante la interacción célula-célula o mediante la secreción de distintos factores, lo cual las hace candidatas ideales para tratamientos de enfermedades con características inflamatorias como la OA. (Chen y Tuan, 2008).
- Son hipoinmunogénicas, expresan el antígeno mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I pero no el de clase II en la superficie celular, y tampoco presentan moléculas coestimuladoras, por lo que no activan al sistema inmune. Esta propiedad se mantiene tras la diferenciación a adipocitos, osteoblastos y condrocitos, por lo que son idóneas para la realización de trasplantes a otros pacientes (trasplante heterólogo) (Chen y Tuan, 2008).

Además, pueden obtenerse de distintos tejidos como médula ósea, tejido conectivo, membrana sinovial, periostio, discos intervertebrales y tejido adiposo (Chen y Tuan, 2008). Para identificar las células obtenidas de una extracción como CMM estas

tienen que cumplir tres condiciones según la Sociedad Internacional de Citoterapia (Dominici *et al.*, 2006):

- Deben ser capaces de adherirse a superficies plásticas durante el cultivo
- Deben expresar CD105, CD73, CD90 y se recomienda que carezcan de expresión de marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45
- Deben tener capacidad de diferenciación a osteocitos, condrocitos y adipocitos

La aplicación de esta terapia tanto en humanos como en perros pasa por un punto crucial, la obtención de células madre de un tejido. Al realizar dicho proceso no solo obtenemos células madre adultas de este tejido, sino también un conjunto de tipos celulares como pueden ser fibroblastos o células sanguíneas. Por tanto, es de vital importancia caracterizar y aislar correctamente estas CMM antes de proceder al tratamiento.

Las CMM más utilizadas son las de médula ósea y tejido adiposo (Ryu *et al.*, 2012), presentando la médula ósea mayor capacidad de condrogénesis (Chen y Tuan, 2008). Estudios como el de Davatchi *et al.*, 2011, Orozco *et al.*, 2013 y Davatchi *et al.*, 2016 coinciden en que el uso de CMM en OA es beneficioso para las articulaciones. Pero el uso de CMM de forma autóloga en pacientes con OA puede resultar en menor regeneración que el uso de células de pacientes sanos (Murphy *et al.*, 2002; Centeno *et al.*, 2010). Esto lleva a la hipótesis de que el tratamiento heterólogo podría ser la clave para combatir esta patología. Por tanto, los objetivos planteados en este estudio son los siguientes:

Objetivos del trabajo

1. Caracterizar las CMM obtenidas mediante citometría de flujo.
2. Estudiar la presencia del antígeno mayor de histocompatibilidad (*MHC* clase II) en las CMM.
3. Realizar la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de las CMM y comparar los resultados mediante tinciones histológicas e inmunohistoquímicas.
4. Comparar el potencial proliferativo y de diferenciación de los cultivos de médula ósea humanos obtenidos de donantes sanos con los cultivos de donantes que sufren patología artrósica.

Material y métodos

1. Obtención de las muestras.

Las muestras utilizadas para la extracción celular humana se obtuvieron, tras la adquisición del correspondiente consentimiento informado (Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica) de donantes del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). Dichos donantes fueron sometidos a operación de sustitución articular de la cabeza femoral por fractura u *OA* avanzada. En todos los casos se garantizó la confidencialidad de los datos identificativos de dichos donantes de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Se obtuvieron un total de 14 muestras, 7 pertenecientes a donantes con *OA* de cadera y 7 donantes sin historial de patología artrósica. La edad de los donantes estaba comprendida entre los 66 y los 92 años, siendo la edad media de 79,93 años.

2. Procesado de las muestras.

Todo el procesado de la muestra se realiza de forma estéril en una cabina de flujo laminar (*Euroaire CSB120*, España). La cabeza femoral se procesa en una placa de cultivo no adherente con una superficie de 100 cm² (*Corning*, EEUU), con 20 ml de *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza, Suiza)* suplementado con 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/E; *Gibco*, EEUU) y 5% de suero bovino fetal (SBF; *Termo Fisher*, EEUU) (*DMEM* 5%). Usando una jeringa de 10 ml estéril (*BD Biosciences*, EEUU) y una aguja estéril 19G (*BD Biosciences*, EEUU) se realizan varios lavados de la cabeza femoral inyectando el medio de la placa directamente en el interior de la cabeza femoral.

Tras esto, con otra jeringa de 50 ml (*BD Biosciences*, EEUU) se recoge todo el medio de la placa. Con un filtro de 60 µm (*Millipore*, EEUU) se filtra todo el contenido. La suspensión celular se centrifuga a 434 xg durante 10 minutos. Tras retirar el sobrenadante se resuspende el precipitado celular en *DMEM* con 1% P/E y 20% de SBF (*DMEM* 20%). Por último, las células se siembran en un frasco de 75 cm² de superficie (*BD Falcon*, EEUU) y se cultivan a 37°C y 5% de CO₂ en una estufa (*Sanyo MCO-18AIC*, Japón). Pasadas 48 horas se realiza un cambio de medio para retirar las células no adherentes.

3. Subcultivo celular.

Una vez establecido el primer cultivo (Subcultivo 0, S0), se hace un seguimiento cada día bajo el microscopio óptico invertido del estado de las células, buscando signos de contaminación, restos celulares o crecimiento excesivo.

Cuando el cultivo alcanza el 80% de confluencia, se expande mediante un subcultivo a un mayor número de frascos de cultivo o placas dentro de la cabina de flujo laminar. Este proceso comienza con la retirada del medio presente en la placa. Se realizan dos lavados con suero salino y se trata el cultivo con tripsina 2x (*Gibco*, EEUU) durante 3 minutos a 37°C.

Pasado este tiempo se saca el cultivo de la estufa y se comprueba que las células ya no están adheridas al recipiente. Para inactivar la tripsina se usa *DMEM* 5%. Se recoge la suspensión celular mediante una centrifugación a 434 xg durante 10 minutos. Se retira el sobrenadante y se siembran las células con *DMEM* 20% en placas o frascos nuevos.

4. Técnica del preplating.

La técnica del *preplating* se aplica dos veces; en el paso del subcultivo 0 al 1 y del subcultivo 1 al 2. Comienza con dos lavados del cultivo con suero salino seguidos de un tratamiento con tripsina 2x durante 3 minutos a 37°C. Tras esto se comprueba con la ayuda del microscopio si se han despegado las células. Se inactiva la enzima con *DMEM* 5% y se introduce el cultivo durante 15 minutos en la estufa a 37°C. Durante este tiempo los macrófagos y los fibroblastos establecen uniones con la superficie de la placa o frasco, mientras que las CMM suelen requerir más tiempo para hacerlo. Pasado este tiempo, se recoge la suspensión celular, se centrifuga a 326 xg durante 10 minutos y se siembra en un nuevo recipiente de cultivo. Esta técnica reduce enormemente la presencia de los fibroblastos y los macrófagos, pero no garantiza su completa eliminación.

5. Análisis de micoplasma.

Para comprobar que las muestras obtenidas están libres de micoplasma se realiza un test de determinación a partir de los sobrenadantes de cultivo celular. En cada muestra, al realizar cambios de medio durante el subcultivo 0 se recogen 3 ml de sobrenadante en un tubo de propileno, que se centrifugó a 434 xg y se mantuvo en el congelador a -20°C hasta realizar la prueba.

El día del análisis se descongela la muestra, se resuspende y se recoge 1 ml en un tubo *ependorf*. Se centrifuga este *ependorf* a 8000 xg durante 5 minutos. Se retira el

sobrenadante y se resuspende el *pellet* en *Chellex* al 10% (*Sigma-Aldrich*, EEUU). Tras esto se incuba a 95°C durante 10 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente. Después se realiza un *spin* del tubo y se mantiene a 4°C mientras se prepara la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*). En un tubo *ependorf* se cargan 23 µl de la mezcla de *PCR* y 2 µl del ADN extraído y se introduce en un termociclador (*Gene AMP PCR System 9700*, EEUU) con un programa de ciclos específico (desnaturalización inicial a 94°C de 5 minutos, 5 ciclos de 94°C 30 segundos, 50°C 30 segundos y 72°C 30 segundos, y a continuación 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos y 72°C 30 segundos, y una extensión final de 72°C 7 minutos, 4°C).

Una vez terminado el programa, se carga la muestra en un gel de agarosa 1,5% (*Sigma-Aldrich*, EEUU) con TAE 1X y con 2 µl de *SYBR Safe* (*Invitrogen*, EEUU). Se corre el gel a 100V durante 30 minutos y se observa si hay amplificación de banda a 400 pares de bases. En caso negativo la muestra es apta para cultivo.

6. Diferenciación de los cultivos.

6.1 Adipogénesis.

Tras separar las células de la placa con tripsina 2X se realiza un conteo celular con la ayuda de la cámara *Neubauer* (*Optik Labor*, Reino Unido). En una cámara de 8 pocillos para microscopía (*BD Falcon*, EEUU) se introducen 20.000 células por pocillo en cuatro pocillos. En tres de los pocillos se realiza la estimulación usando 200 µl de medio adipogénico comercial (*Lonza*, Suiza), el cuarto pocillo se rellena con 200 µl de *DMEM* 20% y sirve como control negativo.

Este medio comercial tiene dos composiciones distintas, una de inducción y otra de mantenimiento, que se cambian de forma alternada cada 3 o 4 días, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

6.2 Osteogénesis.

El proceso es el mismo que en la adipogénesis, salvo que los tres pocillos de diferenciación reciben 200 µl de un único medio de diferenciación osteogénica comercial (*Lonza*, Suiza). Este medio se cambia cada tres o cuatro días, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

6.3 Condrogénesis.

Se introducen 200.000 células en dos tubos de propileno, al primero se le añaden 500 µl de medio de condrogénesis comercial (*Lonza*, Suiza) suplementado con 1 µl/ml de factor de crecimiento transformante beta 3 (*TGF-β3*) (*Sigma-Aldrich*, EEUU). El otro tubo, que actúa como control negativo, recibe 500 µl de *DMEM* 20%. Tras esto, ambos tubos se centrifugan a 434 xg durante 5 minutos para asegurar que todas las células se depositan en el fondo. Al día siguiente de haber centrifugado se despega el precipitado celular con un golpe. El medio se cambia cada 3 o 4 días siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

7. Tinciones histológicas.

Las muestras obtenidas para diferenciación adipogénica y osteogénica fueron fijadas en frío durante 10 minutos con paraformaldehído 4% (*Panreac Química S.A.*, España). Las micromasas fueron incluidas en parafina y se obtuvieron secciones de 4 µm de espesor en un microtomo de rotación (*Leica RM2155*, Alemania). Para su desparafinado las secciones estuvieron durante 10 minutos en la estufa a 60 °C y pasado este tiempo se realizaron dos lavados de 5 minutos con xilol (*Panreac Química S.A.*, España). Después se rehidrataron con una concentración de alcoholes decreciente (dos lavados de 5 minutos con alcohol 100°; dos lavados de 5 minutos con alcohol 96°) y un último lavado con agua destilada de 10 minutos.

7.1 Tinción Oil Red-O.

Reactivos:

- Solución stock: 100 ml de alcohol isopropílico 60% (*Panreac Química S.A.*, España) y 0,5 gramos de Oil red O (*Sigma-Aldrich*, EEUU).
- Solución de trabajo: 60 ml de solución stock y 40 ml de agua destilada.

Procedimiento:

- Fijación en paraformaldehído al 4% en *PBS* (*Phosphate-buffered saline*) a 4°C durante 10 minutos.
- Lavado post-fijación en *PBS* pH 7,4.
- Lavado con solución de alcohol isopropílico al 60% durante 10 minutos en un recipiente cerrado.
- Tinción en solución de trabajo previamente filtrada con Oil red-O durante 20 minutos.
- Lavado con alcohol isopropílico al 60%.

- Lavado en agua destilada.
- Contraintinción con Hematoxilina de Gill III (*Panreac Química S.A.*, España) durante 2 minutos.
- Montaje en medio acuoso tipo glicergel (*Dako Cytomaton*, EEUU).

7.2 Tinción con Rojo alizarina.

Reactivos:

- Solución de rojo alizarina: 2 gramos de rojo alizarina (*Sigma-Aldrich*, EEUU) por cada 100 ml de agua destilada, pH entre 4,1 y 4,3.

Procedimiento:

- Dos lavado con *PBS* 1x frío.
- Fijación celular con paraformaldehído 4% en *PBS* durante 10 minutos.
- Lavado con *PBS* 1x.
- Tinción con solución de rojo alizarina durante 5 minutos.
- Lavado en frío con *PBS* 1x.
- Montaje en medio acuoso tipo glicergel.

7.3 Tinción con tricómico de Masson.

Reactivos:

- Solución de alumbre férrico: sulfato amónico férrico (*Merck*, Alemania) al 5% en agua destilada.
- Solución de hematoxilina de Weigert: mezcla de dos soluciones a partes iguales.
 - Solución 1: 1 gramo de hematoxilina férrica (*Fluka*, España) en 100 ml de alcohol absoluto. Maduración de 7 días.
 - Solución 2: 4ml de cloruro férrico (*Merck*, Alemania) al 20% en 95 ml de agua destilada y 1 ml de ácido clorhídrico (*Panreac Química S.A.*, España).
- Solución de ácido pícrico: ácido pícrico (*Panreac Química S.A.*, España) a saturación en alcohol de 96° y filtrar.
- Solución de fucsina de Ponceau: mezcla de 700 ml de la solución 1 y 450 ml de la solución 2.
 - Solución 1: 0,5 gramos de fucsina ácida (*Merck*, Alemania) y 1 ml de ácido acético (*Panreac Química S.A.*, España). Enrasar con agua destilada hasta 1l.

- Solución 2: 1 gramo de Ponceau (*Merck*, Alemania) y 1 ml de ácido acético.
Enrasar con agua destilada hasta 1l.
- Ácido fosfomolibdico (*Merck*, Alemania) al 1%.
- Solución de azul de anilina: ácido acético al 2,5% y azul de anilina (*Merck*, Alemania) a saturación.

Procedimiento:

- Tratamiento con Hematoxilina de Weigert (*Merck*, Alemania) durante 10 minutos.
- Enjuague en ácido clorhídrico al 1% en alcohol de 95°.
- Lavado en alcohol amoniacal.
- Tinción con fucsina de Ponceau 8 minutos.
- Dos lavados veces en ácido fosfomolibdico al 1%, 5 minutos por lavado.
- Tinción con azul de anilina durante 8 minutos.
- Lavado con agua.
- Deshidratación, lavado y montaje con DePeX.

7.4 Tinción con Safranina-O.

Reactivos:

- Ácido acético al 1%:
 - 1 ml de ácido acético en 99 ml de agua destilada.
- Solución de Safranina O al 0,1%:
 - 0,1 g de Safranina O (*SIGMA*, EEUU) en 100 ml de ácido acético.
- Solución de hematoxilina férrica de Weighert (*Merck*, Alemania).

Procedimiento:

- Tinción con hematoxilina férrica de Weighert 7 min.
- Lavado en agua destilada 5 min.
- Tinción con safranina O 15 min.
- Deshidratación, lavado y montaje con DePeX.

7.5 Tinción con Safranina-O/Fast Green.

Reactivos:

- Solución de verde luz al 1%:

- 1 g de Light Green.
- 100 ml de agua destilada.
- 05 ml de ácido acético.
- Ácido acético al 1%:
 - 99 ml de agua destilada.
 - 1 ml de ácido acético.
- Solución de Safranina O:
 - 33,33 g de Safranina O (SIGMA, EEUU).
 - 483,3 ml de agua destilada.
 - 516,6 ml de OH 96°.

Procedimiento

- Tinción con solución Safranina-O: 30 minutos.
- Lavado en agua destilada.
- Tres pases en solución Verde luz.
- Lavar en agua destilada.
- Deshidratación, lavado y montaje con DePeX.

7.6 Tinción con Azul de Toluidina.

Reactivos:

- Tampón acetato a pH 4,2.
 - Solución A: 2,7 g de acetato de sodio (*Merck*, Alemania) en 100 ml de agua destilada.
 - Solución B: ácido acético 0,5 M (1,1 ml en 100 ml de agua destilada).
 - Solución de trabajo: Mezclar 30 ml de solución A (pH 4,2) con 90 ml de solución B.
- Solución al 0,2% de azul de toluidina (*Merck*, Alemania) en tampón a pH 4,2.
- Solución acuosa al 4% de molibdato de amonio (*Panreac Química S.A.*, España).

Procedimiento:

- Tinción con azul de toluidina 30 min.
- Lavar en agua destilada 5 min.
- Contrateñir con hematoxilina 5 min.
- Deshidratación, lavado y montaje con DePeX.

8. Inmunohistoquímica.

Las secciones de las micromasas se incubaron con los anticuerpos monoclonales recogidos en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos usados para la inmunohistoquímica de las micromasas.

<i>Especificidad</i>	<i>Pretratamiento enzimático</i>	<i>Clon</i>	<i>Dilución</i>	<i>Casa comercial</i>
Colágeno tipo I	Proteínasa K	COL-1	1:100	<i>Abcam</i>
Colágeno tipo II	Coindritinasa ABC	5B2.5	1:25	<i>Abcam</i>
Agrecano	Coindritinasa ABC	BC-3	1:50	<i>Abcam</i>

El kit de detección empleado para detectar la reacción antígeno-anticuerpo fue *peroxidase/DAB ChemMate DAKO EnVision (Dako Cytomation, EEUU)*.

Procedimiento:

- Desparafinado e hidratación de los cortes de tejido.
- Lavado de 5 minutos con *PBS*.
- Pretratamiento enzimático de los anticuerpos para su exposición de epítomos.
- Incubación con el inhibidor de la actividad peroxidasa endógena (*Dako Cytomation, EEUU*) durante 10 minutos.
- Tres lavados de 5 minutos con *PBS*.
- Incubación con el anticuerpo primario 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- Tres lavados de 5 minutos cada uno con *PBS*.
- Incubación con el anticuerpo secundario (*Peroxidase/DAB ChemMate DAKO EnVision Detection Kit*) 1 hora a temperatura ambiente.
- Tres lavados de 5 minutos cada uno con *PBS*.
- Revelado la reacción con 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB, 1:50; *Dako Cytomation, EEUU*).
- Lavado con agua destilada.
- Deshidratación en baños de gradación creciente de alcoholes.
- Aclaramiento en xilol y montaje en DePeX.

9. Caracterización fenotípica por citometría de flujo.

Para realizar esta técnica se utiliza el siguiente panel de anticuerpos (Tabla 2). Para preparar las células se tratan con tripsina 2X. Con la cámara Neubauer se realiza el conteo celular para asegurar que el volumen celular es óptimo (ya que se requieren 200.000 células por pocillo). Se centrifuga el cultivo a 434 xg durante 10 minutos. Después se retira el sobrenadante y se resuspende el cultivo en tampón *FACS* (*Fluorescence activated cell sorting*; *BD biosciences*, EEUU). Se añaden 200 µl del cultivo en cada pocillo y se centrifuga la placa a 434 xg durante 5 minutos y a 4°C. Pasado este tiempo se descarta el sobrenadante y se homogeniza con el vórtex. A cada pocillo se le añade la dilución adecuada de cada anticuerpo. Después la placa se incuba en oscuridad a 4°C entre 40 y 60 minutos.

Tras esto se realizan dos lavados con el tampón *FACS*, repitiendo centrifugación, retirada de sobrenadante y resuspensión en 200 µl de *FACS*. Por último se pasa el contenido de cada pocillo a un tubo de citómetro para su análisis con el citómetro de flujo (*BD FACSCalibur*, Irlanda) usando el programa informático *BD Cell-Quest Pro* (versión 1.c.8fb, *BD*, Irlanda).

Tabla 2. Anticuerpos usados para la caracterización por citometría de flujo.

Especificidad	Marcaje	Clon	Dilución	Casa comercial
CD29	PE	TS2/16	3:50	BioLegend
CD34	PE	1H6	4:50	BD Pharmingen
CD44	PE	IM7	1:50	BD Pharmingen
CD45	FITC	UCHL1	3:50	Immunostep
CD73	PE	bs-4834R	3:50	Immunostep
CD90	PECy5	5E10	1:50	Immunostep
CD105	FITC	SN6	1:50	AbD Serotec
CD271	PE	ME20.4	1:1000	Grupotaper
Anti <i>MHC</i> II	FITC	CVS20	1:50	LSBIO
Iso PECy5	PECy5	1F8	1:50	Abcam
Iso FITC	FITC	MOPC-21	1:50	Immunostep
Iso PE	PE	B11/6	1:50	Immunostep

10. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar (DE). En análisis estadístico se realizó con el software R (versión 2.15.2). Solamente se realizó análisis estadístico de aquellos datos con una n superior a 3. Tras pasar el test de normalidad (*Shapiro-Wilk*) se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía considerando diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

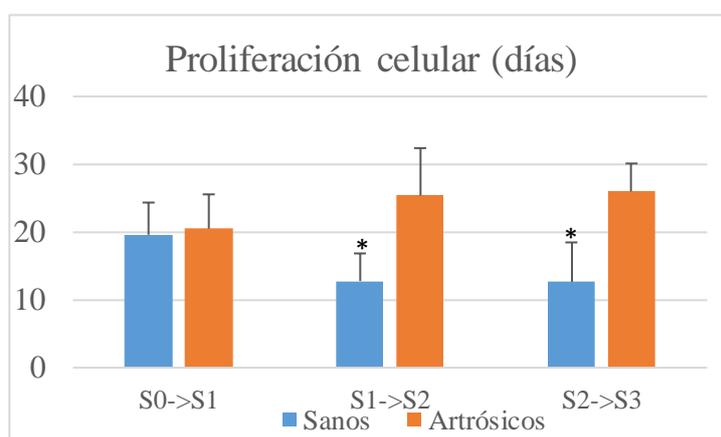
Resultados

1. Estudio de la proliferación celular.

En la tabla 3 y 4 y en las gráficas 1 y 2 se muestran la duración en días que han mostrado los cultivos estudiados. Estos datos fueron obtenidos de distintas muestras usadas en el instituto de investigación biomédica de A Coruña (INIBIC).

Tabla 3. Datos de duración de los cultivos en días en función de su patología.

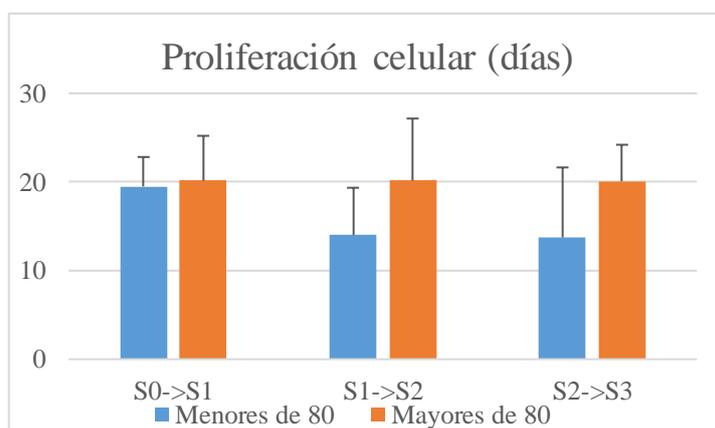
Pase	Sanos			Artrósicos		
	S0->S1	S1->S2	S2->S3	S0->S1	S1->S2	S2->S3
N	10	10	10	8	8	8
Media (%)	19,60	12,78	12,67	20,50	25,38	26,00
Desv. Est.	± 4,76	± 4,08	± 5,81	± 5,07	± 7,01	± 4,12



Gráfica 1: Media de la proliferación celular de las células mesenquimales en días en los diferentes pases de donantes sanos (azul) y artrósicos (naranja) * $P < 0,05$

Tabla 4. Datos de duración de los cultivos en función de su edad.

Pase	Menores de 80 años			Mayores de 80 años		
	S0->S1	S1->S2	S2->S3	S0->S1	S1->S2	S2->S3
N	4	4	4	14	14	14
Media (%)	19,50	14,00	13,75	20,14	20,15	20,08
Desv. Est.	± 3,32	± 5,35	± 7,89	± 5,33	± 8,94	± 8,33



Gráfica 2: Media de la proliferación celular de las células mesenquimales en días en los diferentes pases de donantes menores de 80 años (azul) y mayores de 80 años (naranja).

En la tabla 3 y en la gráfica 1 se puede observar que de S0 a S1 ambas poblaciones muestran el mismo potencial de proliferación, tardando ambas aproximadamente 20 días en necesitar un subcultivo. Pero a partir del S1 la población de donantes sanos tiende a proliferar en períodos medios de 12 días mientras que la de donantes artrósicos mantiene la una proliferación similar a la observada en S0. Estos datos se mantienen subcultivos posteriores. Por otro lado, cabe destacar que, dentro de las muestras artrósicas, tres de las ocho poblaciones de CMM fueron desechadas para su uso en investigación debido al exceso de macrófagos presentes en el cultivo, lo que nos indica que las células procedentes de la médula de los donantes con OA podrían tener una mayor población de macrófagos y ser por tanto de menor calidad que las muestras de donantes sanos.

En la tabla 4 y gráfica 2 se observa un patrón similar al que muestra la tabla 3. De esta manera se observa que los cultivos de donantes más jóvenes tienden a proliferar más rápidamente que aquellos más avejentados.

2. Citometrías.

Las médulas se analizaron usando el citómetro y el software BD *Cell-Quest Pro* (versión 1.c.8fb, BD, Irlanda). Se analizaron un total de 8 cultivos de médula ósea, 4 pertenecientes a donantes con patología artrósica y 4 donantes sanos. Los datos obtenidos se muestran en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Datos de los paciente artrósicos.

Anticuerpo	Media (%)	Desv. Est.
CD29	93,53	±7,79
CD34	8,95	±9,66
CD 44	87,99	±20,48
CD 45	1,58	±1,95
CD73	60,55	±23,77
CD 90	87,74	±11,24
CD105	82,11	±13,87
CD 271	0,36	±0,28
MHC II	4,41	±3,40

Tabla 6. Datos de los donantes sanos.

Anticuerpo	Media (%)	Desv. Est.
CD29	91,84	3,69
CD34	3,14	±5,10
CD 44	92,09	±4,20
CD 45	0,72	±0,24
CD73	58,84	±30,98
CD 90	89,92	±4,85
CD105	59,96	±26,09
CD 271	0,20	±0,50
MHC II	2,59	±1,48

Los cultivos de CMM estudiados fueron aquellos con mejor estado y proliferación, ya que era necesario un mínimo de 2 millones de células para realizar cada citometría. Dichos cultivos se mantuvieron hasta el S3. La figura 3 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos.

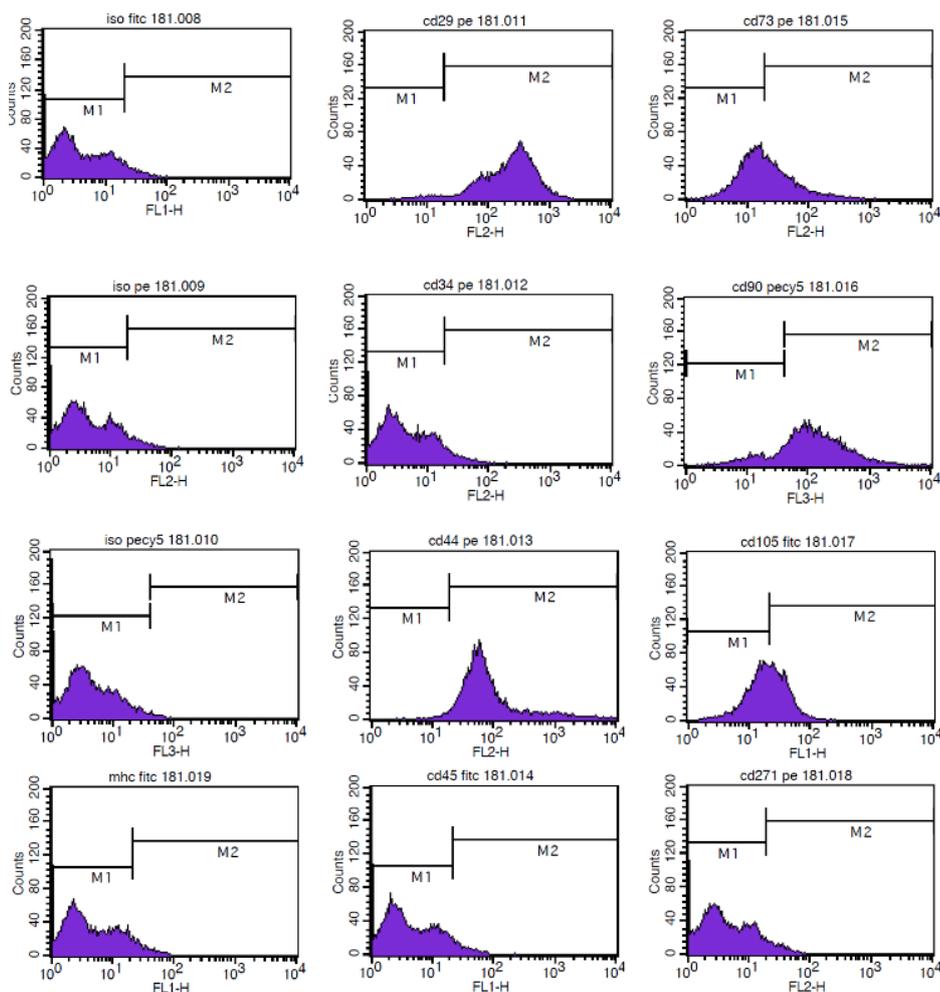


Fig 3. Ejemplo de análisis de un cultivo por citometría de flujo.

Los datos se ajustan a los requisitos exigidos por la Sociedad Internacional de Citoterapia (Dominici *et al.*, 2006) y a los resultados obtenidos por otros autores (Alegre *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2014; Busser *et al.*, 2015), mostrando valores positivos (mayores de 10%) para CD105, CD73 y CD90 y valores negativos (menores de 10%) para CD34 y CD45.

Debido a que los cultivos de CMM no son homogéneos, no existe un marcador específico para estas células (Busser *et al.*, 2015). Por ello, cuantos más marcadores moleculares se analicen, mayor será la seguridad de que los resultados sean correctos. Siguiendo ésta premisa, hemos incluido a mayores en los análisis cuatro marcadores positivos (CD29, CD44, CD90 y CD271) (Alegre *et al.*, 2012), y uno negativo, el *MHC II*, el cual está relacionado con su capacidad de evadir el sistema inmune.

3. Tinciones histológicas de condrogénesis.

Las diferenciaciones celulares realizadas fueron estudiadas usando el microscopio óptico (*Olympus BX61*, Japón) y el software *DPcontroller* v1.1.1.65 (2002, Japón) y *DPmanager* v1.1.1.71 (2002, Japón). Se realizó su análisis usando el software *Image J* v1.51j8 (*National Institute of Health*, 1997). Las dos micromasas de cada paciente se sometieron a dos medios distintos durante 21 días, una a *DMEM* 20% (control) y otra a medio de diferenciación (condrogénesis). En todos los casos estudiados, la micromasa control no muestra cambios, mientras que la condrogénica muestra una estructura capsular en la zona exterior con la organización típica del cartílago, pero en un estadio muy primitivo (Fig. 4). Esta estructura presenta distinto grosor dependiendo del paciente.

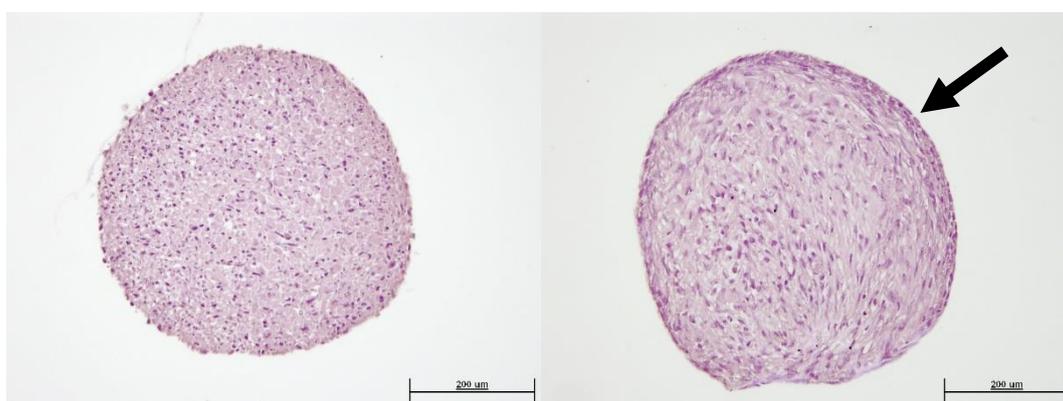


Fig 4. Imagen de 10 aumentos que compara la tinción con Hematoxilina-Eosina entre el control (izquierda) y la condrogénesis (derecha) del mismo individuo. La flecha señala la zona de la condrogénesis donde la micromasa sufre una reestructuración similar a la del cartílago.

Safranina-O.

La tinción con Safranina-O (Fig. 5) muestra la presencia de GAG (Arufe *et al.*, 2009), los cuales son un componente fundamental de los PG. Dichos compuestos son resaltados en distintas tonalidades de rojo, y cuanto mayor sea la intensidad mayor será el contenido de éstos. Tras el cultivo se observa que las micromasas condrogénicas muestran un mayor contenido en GAG que los controles. Otra diferencia notable es que en las micromasas control muestran núcleos teñidos con bastante intensidad, en cambio en las condrogénicas los núcleos tienen menos tonalidad pero la zona exterior de la micromasa está más teñida. Esto puede ser debido a que en los controles se expresan los GAG, mientras que en las condrogénicas éstos ya han sido excretados hacia la matriz extracelular.

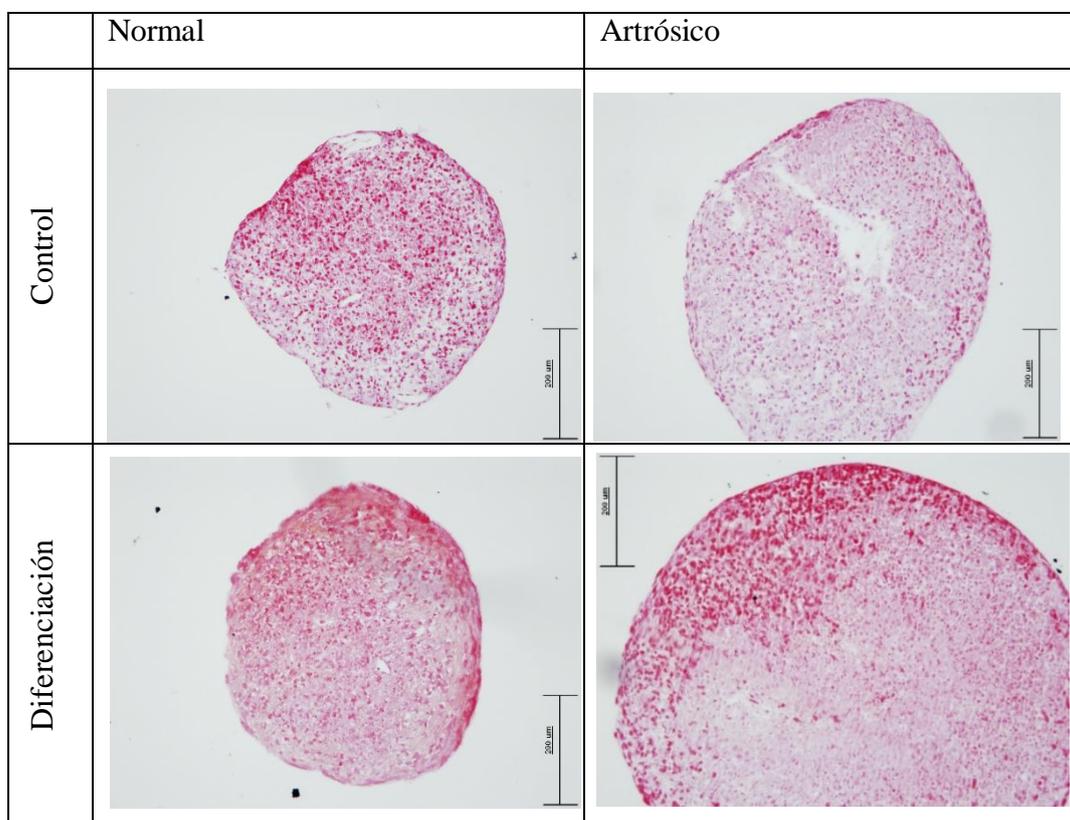


Fig 5: Imágenes representativas de la tinción de Safranina-O de las micromasas. Imágenes a tamaño 10X

Los datos obtenidos tras el análisis están reflejados en la tabla 7. Se puede observar que en la comparación de patologías la artrósica presenta mayor diferenciación, pero esto es debido a que en ese grupo está el paciente más joven (69 años) y debido al bajo tamaño muestral este valor se dispara. En la comparación de edades, se ve que los donantes más jóvenes presentan mayor contenido en GAG que los donantes más avejentados.

Tabla 7. Datos de la tinción con Safranina-O de las micromasas.

Grupo	N		OA		<80		>80	
	C	D	C	D	C	D	C	D
N	3	3	1	2	2	3	2	2
Media (%)	13,26	19,78	6,23	40,06	16,09	35,59	6,92	16,35
Desv. Est.	±11,20	±9,05		±30,40	±14,24	±23,74	±0,97	±3,13

Safranina-O/ Fast Green.

En el caso de la Safranina-O/ Fast Green (Fig. 6) también se resalta el contenido de GAG, pero la presencia de éstos es menor. Esto puede ser debido a que la tinción de Fast Green se superponga sobre las zonas teñidas ligeramente con Safranina-O, evitando así la detección de estos compuestos. Los datos obtenidos tras el análisis están reflejados en la tabla 8. Se observa contenidos en GAG muy inferiores comparados con la tabla 7. Una vez más los donantes de mayor edad presentan menos desarrollo de GAG.

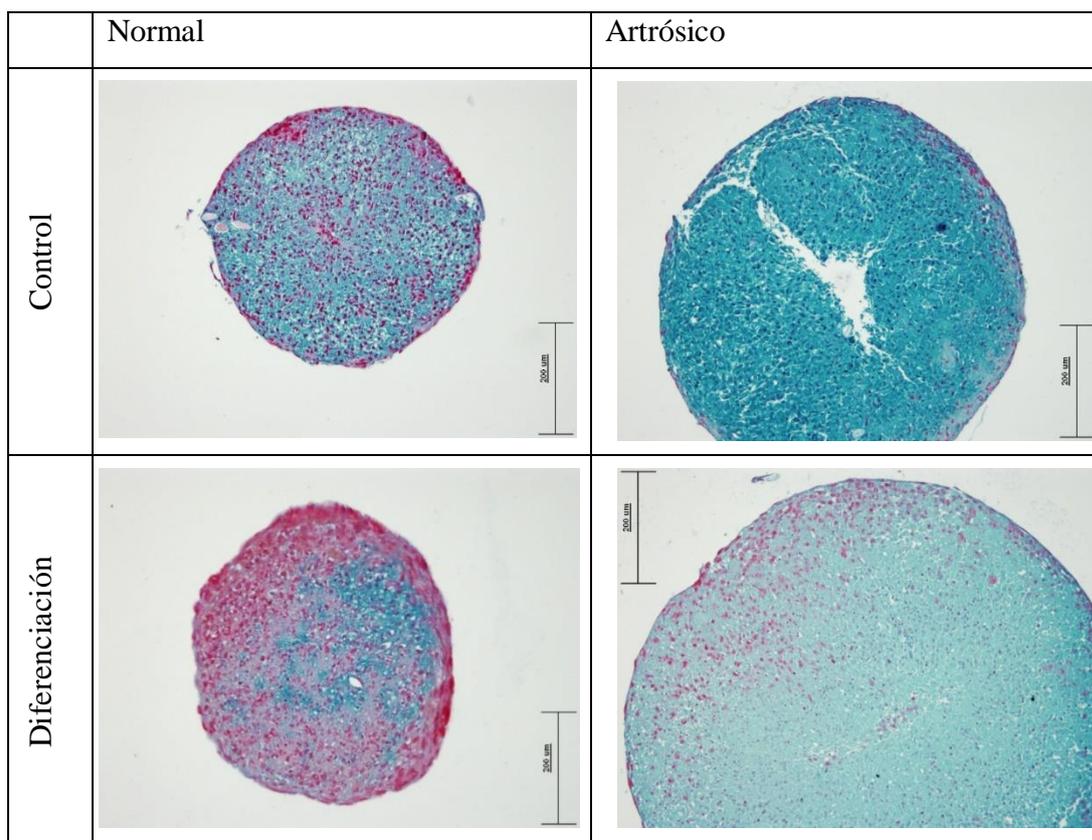


Fig 6: Imágenes representativas de la tinción de Safranina-O/ Fast Green de las micromasas. Imágenes a tamaño 10X

Tabla 8. Datos de la tinción con Safranina-O/Fast Green de las micromasas.

Grupo	N		OA		<80		>80	
	C	D	C	D	C	D	C	D
N	3	3	2	2	3	3	2	2
Media (%)	9,65	13,61	1,71	5,40	14,66	16,17	2,33	2,84
Desv. Est.	±8,03	±18,75	±0,64	±3,77	±7,01	±17,26	±1,19	±1,30

Azul de Toluidina.

El azul de toluidina (Fig. 7) es un colorante metacromático acidófilo. Al unirse a estructuras ácidas cambia de color, tornándose rojizo al contactar con PG. Además también presenta afinidad con los ácidos nucleicos tiñendo así el ADN y ARN de color azul (Sridharan y Shankar, 2012).

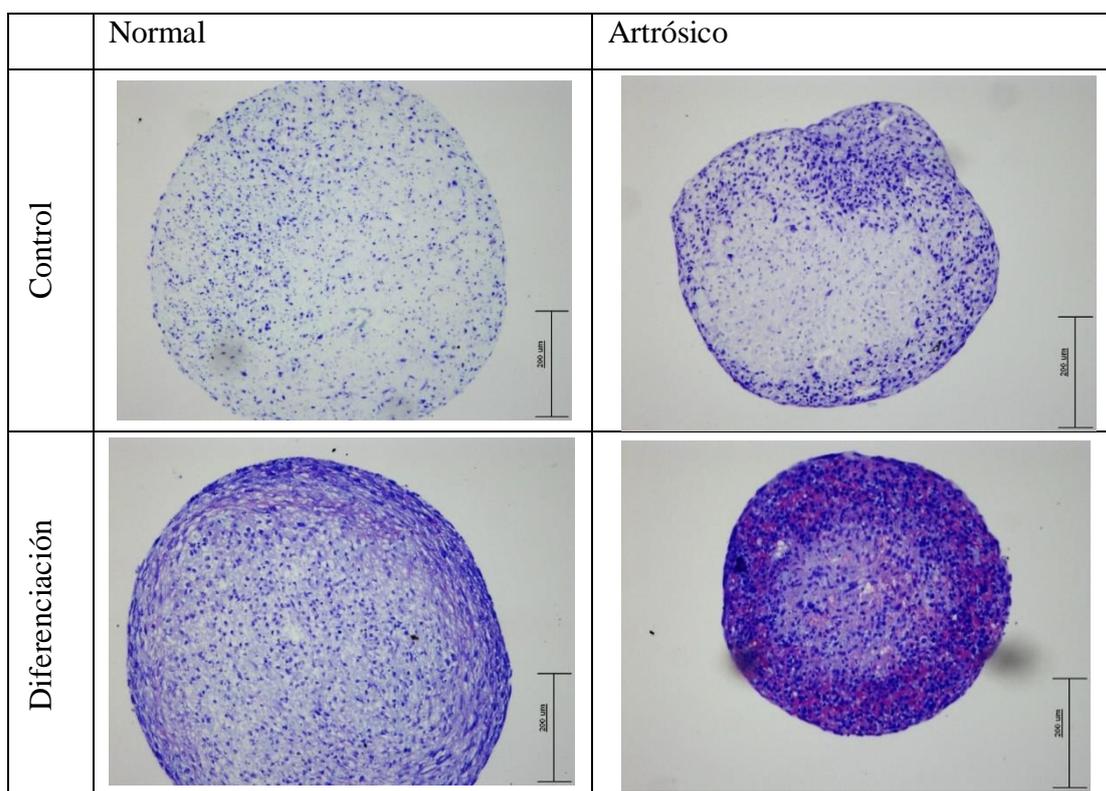


Fig 7: Imágenes representativas de la tinción de Azul de Toluidina de las micromasas. Imágenes a tamaño 10X

Los datos obtenidos quedan reflejados en la tabla 9. Se observa como la patología no parece afectar al desarrollo de PG, sino que más bien está relacionada con la edad, presentando los donantes más avejentados valores menores de PG.

Tabla 9. Datos de la tinción con Azul de Toluidina de las micromasas.

Grupo	N		OA		<80		>80	
	C	D	C	D	C	D	C	D
N	2	2	2	3	2	3	2	2
Media (%)	11,91	40,10	13,94	41,42	21,36	53,51	6,96	28,01
Desv. Est.	±5,86	±8,85	±13,26	±33,60	±8,37	±23,19	±0,58	±16,74

Tricrómico de Masson.

Por último, las tinciones con tricrómico de Masson (Fig. 8) tienen como objetivo teñir las fibras de colágeno de azul y los citoplasmas y núcleos de tonos rosáceos. Se observa como las micromasas control tienden a mostrar colores rosáceos intensos y azules nítidos, mientras que las micromasas condrogénicas muestran tonos azules mayores debido al incremento en la síntesis de colágeno. A pesar de esto no se realizó el análisis porque también resalta el contenido en otros colágenos como el Col X los cuales son abundantes también en los controles, dando falsos positivos (Fig. 8, control artrósico). Por tanto, es una tinción adecuada para estudiar la morfología de la micromasa pero no su potencial de diferenciación.

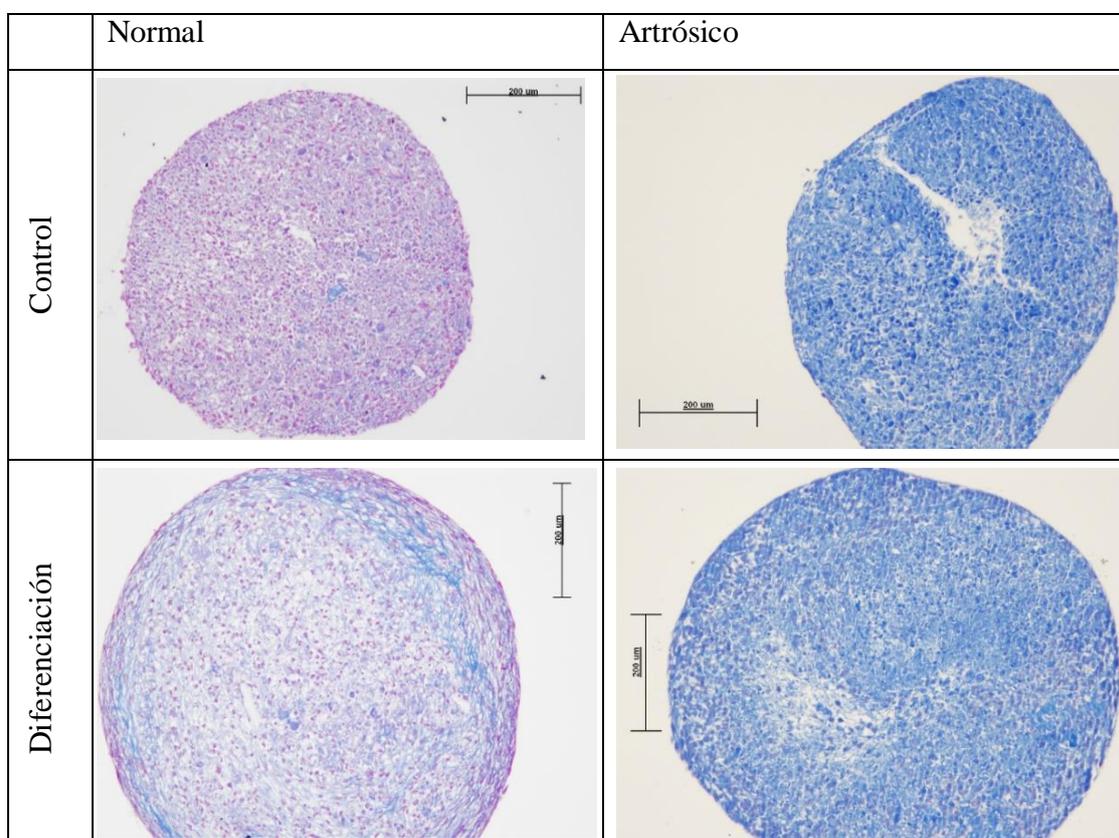


Fig 8: Imágenes representativas de la tinción de Tricrómico de Masson de las micromasas. Imágenes a tamaño 10X

4. Tinciones histológicas de adipogénesis y osteogénesis.

Los cultivos de adipogénesis y osteogénesis duraron 21 días. El colorante Oil-Red-O se une a las vacuolas lipídicas generadas por diferenciación adipogénica resaltándolas de un color rojo intenso. Tras los 21 días de exposición al medio de diferenciación se ha observado como casi todos los donantes han desarrollado vacuolas lipídicas en distintas cantidades (Fig. 9), volviéndose a observar variabilidad entre donantes. Además otra vez los cultivos avejentados tienden a mostrar resultados menores que los más jóvenes (Tabla 10), mientras que no se observan diferencias entre artrósicos y sanos.

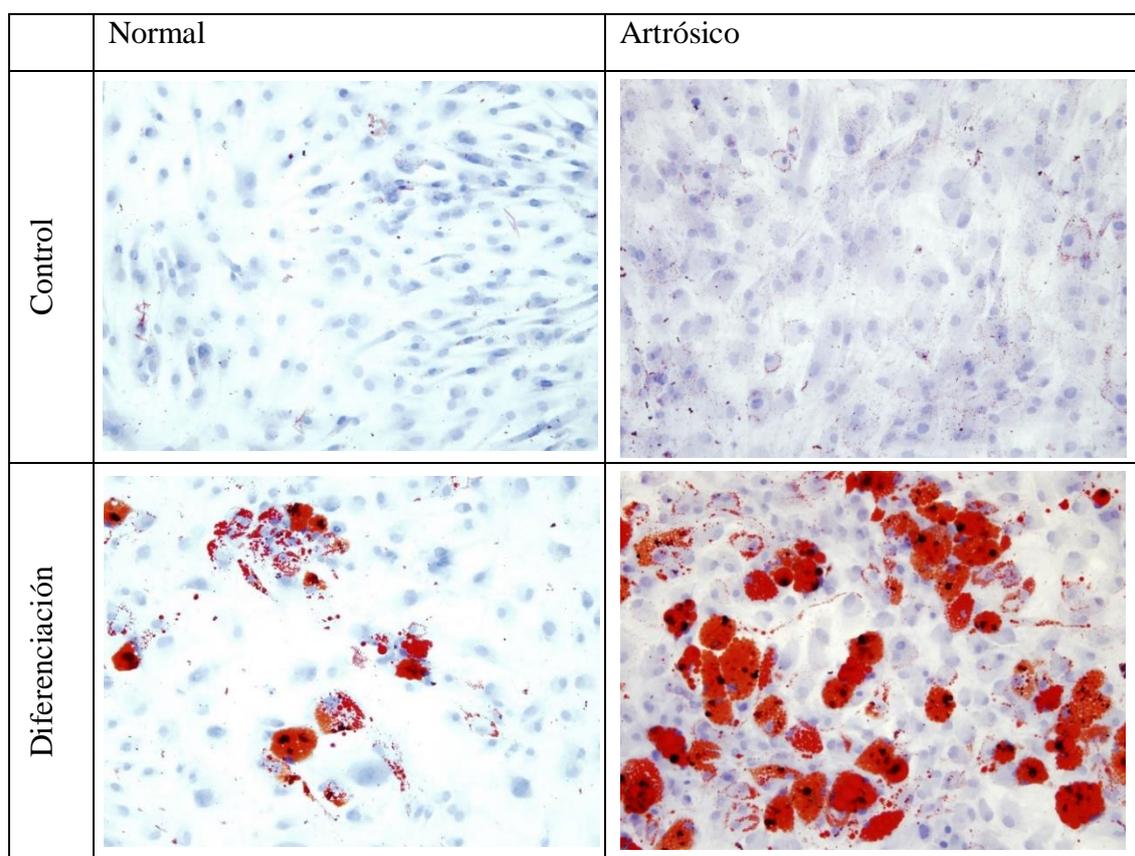


Fig 9: Imágenes representativas de la tinción de Oil-Red-O de los cultivos de adipogénesis. Imágenes a tamaño 10X

Tabla 10. Datos de la tinción con Oil-Red-O de las cámaras de adipogénesis.

Grupo	N		OA		<80		>80	
	C	D	C	D	C	D	C	D
N	3	3	2	3	2	3	3	3
Media (%)	0,12	12,93	0,42	14,92	0,32	19,79	0,19	8,05
Desv. Est.	±0,03	±17,93	±0,19	±6,19	±0,33	±12,92	±0,09	±9,61

En el caso de la tinción con rojo alizarina (Fig. 10), ésta resalta de colores rojizos los depósitos cálcicos generados por la diferenciación osteogénica. Tras los 21 días de exposición al medio de diferenciación se ha observado como todos los cultivos muestran dichos depósitos. En la osteogénesis (tabla 11) cada paciente ha desarrollado distintos niveles de depósitos cálcicos viendo otra vez la variabilidad entre donantes, pero en este caso el dato más elevado ha sido el del donante más avejentado (92 años). Además se observa que los donantes sanos muestran mayores potenciales de osteogénesis comparados con los artrósicos.

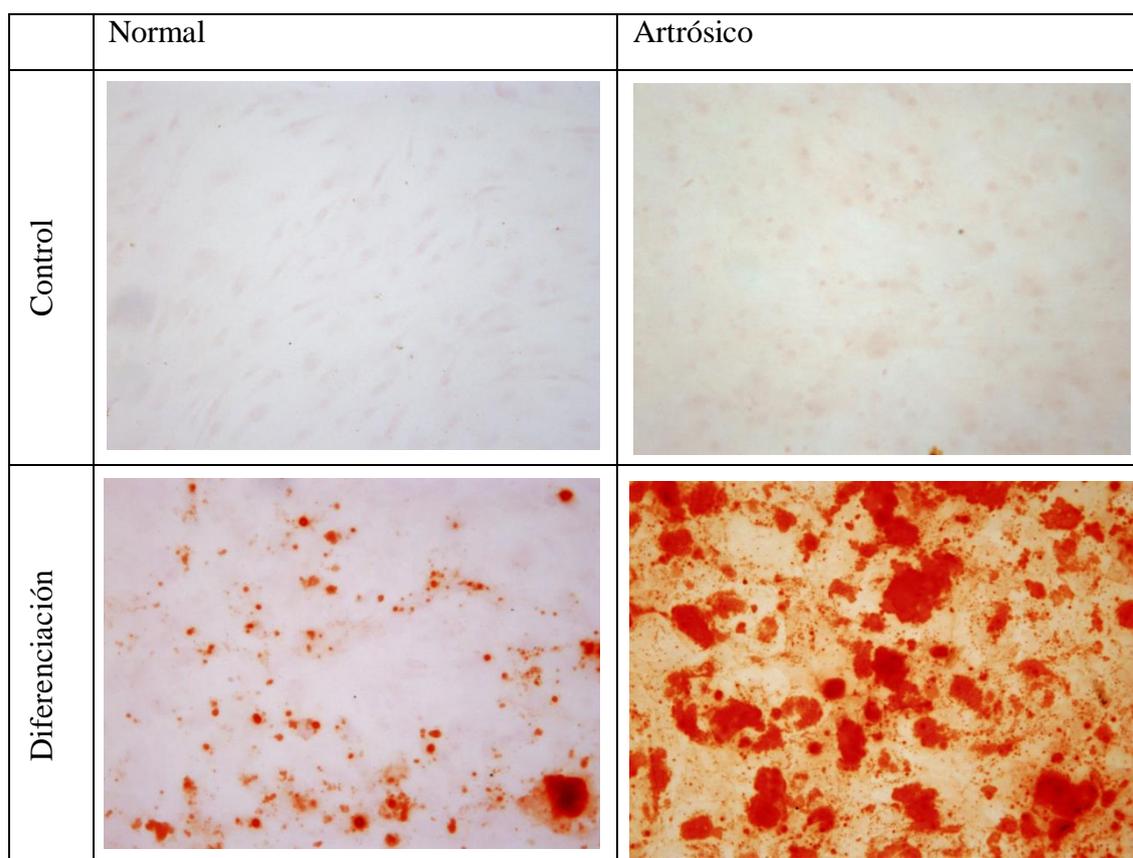


Fig 10: Imágenes representativas de la tinción de Rojo Alizarina de los cultivos de osteogénesis. Imágenes a tamaño 10X

Tabla 11. Datos de la tinción con Rojo Alizarina de las cámaras de osteogénesis.

Grupo	N		OA		<80		>80	
	C	D	C	D	C	D	C	D
N	3	3	3	3	3	3	3	3
Media (%)	1,85	32,98	1,31	17,05	0,58	27,57	2,57	22,45
Desv. Est.	±2,91	±27,29	±1,24	±7,87	±0,74	±13,27	±2,59	±28,31

5. Tinciones inmunohistoquímicas.

Las tinciones inmunohistoquímicas de las micromasas tenían como objetivo resaltar la cantidad de colágeno I, colágeno II y agrecano presentes en la muestra. Estos compuestos son fundamentales en el cartílago, siendo el más abundante de ellos el colágeno II.

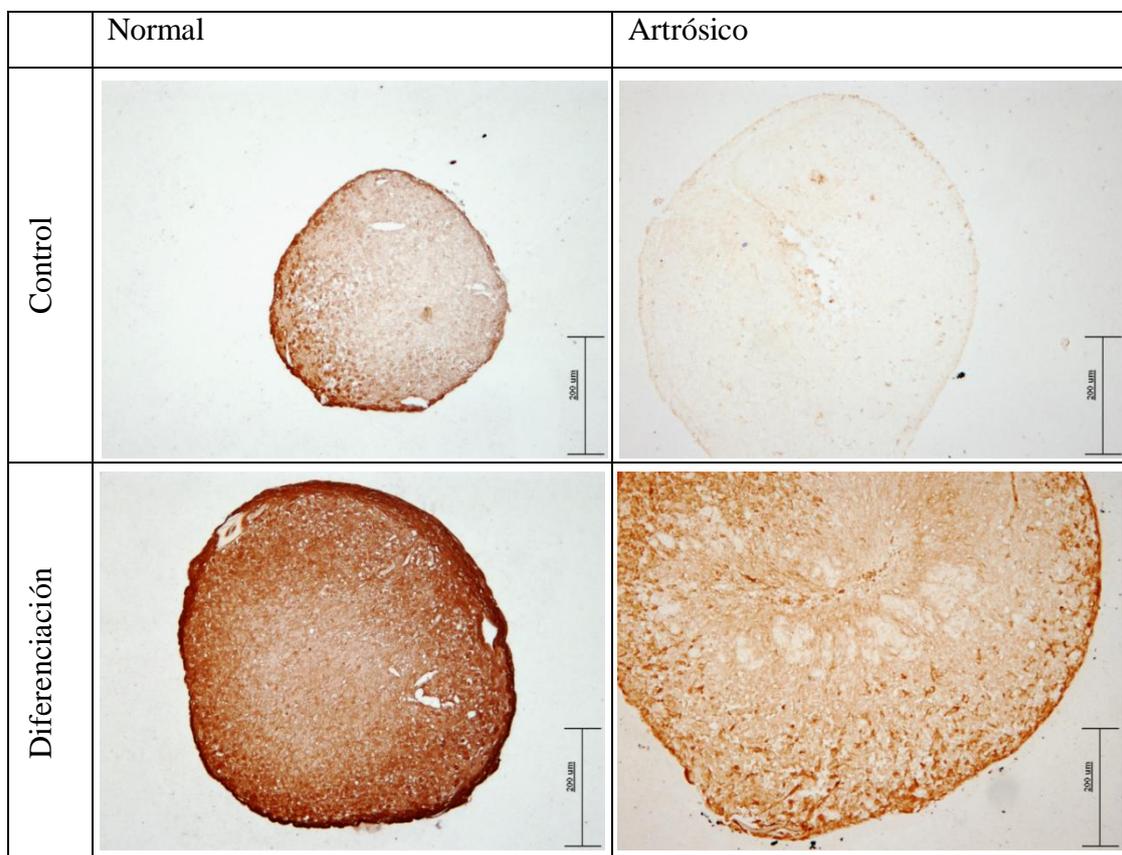


Fig 11: Imágenes representativas de la inmunohistoquímica con Colágeno I de las micromasas.
Imágenes a tamaño 10X

El protocolo con colágeno I (Fig. 11) ha mostrado unos valores medios de positividad muy elevados (tabla 12). Igual que en el caso de las tinciones histológicas, se observa como el factor determinante en la expresión del colágeno I parece ser la edad, siendo los más ancianos los que menor cantidad de colágeno presentan.

Tabla 12. Datos de la inmunohistoquímica con Col-1.

Grupo	N		OA		<80		>80	
	C	D	C	D	C	D	C	D
N	3	4	2	3	3	4	2	3
Media (%)	13,29	54,90	11,44	54,09	20,69	71,17	0,34	32,39
Desv. Est.	±21,92	±34,33	±15,47	±39,82	±18,81	±24,06	±0,23	±34,58

Por otro lado, con los protocolos para realizar la inmunohistoquímica del colágeno II y agregano no se han obtenido resultados válidos debido a que la técnica no ha podido ponerse a punto durante este tiempo.

Discusión

En los últimos años la investigación clínica en *OA* ha avanzado de manera significativa, y una alternativa terapéutica que ha dado grandes resultados es el uso de CMM que de forma natural están involucradas en el mantenimiento y la regeneración del tejido conectivo y se sabe que migran a los tejidos en respuesta a estrés inflamatorio, donde participan en la reparación de los daños (Campagnoli *et al.*, 2001; Karp y Leng Teo, 2009).

En general, en los últimos años, son muchos los estudios que apoyan el uso de las CMM en *OA*, y aunque el grado de mejoría varía en función de los pacientes tratados, las dosis utilizadas y los parámetros analizados, los resultados coinciden en que sin duda son beneficiosas para las articulaciones (Davatchi *et al.*, 2011, 2016; Emadedin *et al.*, 2012; Orozco *et al.*, 2013; Koh *et al.*, 2015).

Es de destacar que una serie de estudios sugieren que las CMM obtenidas de donantes en el último estadio de la *OA* podrían tener un potencial de condrogénesis y una multipotencialidad menor que la de donantes sanos (Murphy *et al.*, 2002; Centeno *et al.*, 2010; Chua *et al.*, 2014). Esto parece sugerir que las CMM de donantes artrósicos tienen menor capacidad regenerativa y es posible que ésa sea la causa de que los tratamientos con CMM autólogas tengan ciertas limitaciones. Esto conduce a la hipótesis de que a pesar de que el tratamiento autólogo es eficaz para el tratamiento de la *OA*, el heterólogo podría ser la clave para la resolución de esta enfermedad.

En este estudio hemos realizado un proceso de aislamiento de CMM a partir de médula ósea humana. La caracterización para confirmar si las células aisladas son las de interés se basa en tres puntos (Dominici *et al.*, 2006):

1. Deben de ser capaces de adherirse a la superficie de las placas de cultivo.
2. Deben de expresar en su superficie CD73, CD90 y CD105 y carecer de CD34 y CD45.
3. Deben de ser capaces de diferenciarse a adipocitos, osteocitos y condrocitos.

Las muestras han sido donadas por individuos de distintas edades con y sin patología artrósica. De esta manera podemos estudiar el efecto de la OA y la edad en la proliferación, expresión de marcadores y potencial de diferenciación de los cultivos.

En la fase de proliferación de los cultivos hemos estudiado datos utilizados por el INIBIC, analizando un total de 18 muestras, 10 sanas y 8 artrósicas. Tres de las ocho muestras artrósicas tuvieron que ser descartadas, bien por exceso de macrófagos bien por que llegaron a la senescencia celular, lo que supone que un 38% de las muestras obtenidas no fueron aptas para su uso, lo que no sucedió con las muestras obtenidas de donantes sanos. Esto a pesar de que el número de muestras es bajo, y que probablemente afectan otras variables como la edad, patologías concurrentes, etc., parece indicar que la población obtenida de muestras artrósicas no tiene la calidad necesaria para ser utilizada clínicamente como tratamiento.

Las células de donantes avejentados tienden a presentar mayor tamaño celular comparados con los más jóvenes debido al estadio de senescencia. Además hemos comprobado que, cuanto mayor es la edad del paciente menor es la capacidad de proliferación algo en lo que coincidimos con los estudios realizados con Stolzing *et al.*, 2008 y Kuang *et al.*, 2015. La alteración del crecimiento debido a la OA puede ser debido a que estas células sufren un acortamiento telomérico y alcanza antes el estado de senescencia. El grupo de Jones *et al.*, 2010 también vio esta diferencia de proliferación entre normales y artrósicos, y, tras realizar estudios de longitud telomérica descubrieron que ésta en donantes jóvenes con OA era similar a la de donantes avejentados sanos, presentando ambas poblaciones telómeros más pequeños que la población de donantes sanos jóvenes.

El estudio de marcadores moleculares de superficie por citometría de flujo solo se realizó en aquellos cultivos que presentaban buen crecimiento celular y buen aspecto ya que era necesario un gran volumen de células para realizar esta técnica. La comparación entre los resultados del grupo de donantes artrósicos y el grupo de donantes sanos no muestra gran variabilidad salvo por dos marcadores, CD34 y CD105, los cuales muestran mayores niveles de expresión en donantes artrósicos.

CD34 es un marcador de células con origen hematopoyético (Sidney *et al.*, 2014). Es mayor en donantes artrósicos debido a que esta patología conlleva procesos inflamatorios (Goldring & Otero, 2011), por ello los cultivos artrósicos presentan más macrófagos, que son células de origen hematopoyético y por tanto positivas para CD34.

CD105 se corresponde con la endoglina, la cual es un receptor de citoquinas que regulan proliferación, diferenciación, migración y adhesión celular (Nassiri *et al.*, 2011). El aumento de CD105 en donantes artrósicos también aparece en estudios como el de Alsalameh *et al.*, 2004 y Hermida *et al.*, 2011. A pesar de esta diferencia, tener más CD105 no implica que su potencial de diferenciación condrogénica sea mayor (Alegre *et al.*, 2012; Cleary *et al.*, 2016).

Se cree que un marcador óptimo para evaluar la capacidad de condrogénesis de los cultivos puede ser CD271. Sin embargo, de los 8 análisis realizados ninguno muestra positividad para este marcador. Diversos autores (Hoffmann *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016) justifican esto en base a que bajo condiciones de cultivo *in vitro* las células pueden sufrir alteraciones en sus marcadores de superficie. Uno de los más afectados es CD271, cuyo nivel de expresión se ve reducido bajo estas condiciones. Otra explicación puede ser el uso de la tripsina durante el subcultivo celular, ya que al usar esta enzima para romper las uniones celulares es posible que también se degraden marcadores como CD271, obteniéndose así un falso negativo (Hoffmann *et al.*, 2016).

Además todos los cultivos han resultado negativos para el complejo mayor de histocompatibilidad, el de *MHC* de clase II, lo cual es fundamental para evitar activar el sistema inmune (Chen y Tuan, 2008). Esto permite a estos cultivos ser adecuados para el trasplante heterólogo de CMM entre pacientes.

El potencial condrogénico de los cultivos se estudió comparando dos micromasas de cada paciente entre sí, una micromasa actuaba como control negativo y no se inducía su diferenciación mientras que a la otra se la sometía a un medio que sí lo hacía. Debido a que las poblaciones no son homogéneas, existe gran variabilidad de potencial de diferenciación entre donantes (Somoza *et al.*, 2014). Aun así, todas las micromasas sometidas al medio de diferenciación han desarrollado una capa externa, aunque su grosor y composición varía entre donantes. En esta estructura externa las fibras de colágeno muestran una organización similar a la que presenta el cartílago hialino (Espanha, 2010), orientándose paralelamente a la superficie en la zona más externa, y cambiando su orientación según se profundiza en la micromasa.

En este estudio se utilizaron las tinciones con Safranina-O, Safranina-O/Fast Green y azul de Toluidina para analizar los niveles de PG y GAG. Estos compuestos son parte fundamental del cartílago hialino, y representan entre un 30 y 35% del peso seco (Benito, 2010). Debido a su abundancia en la matriz sirven como marcadores de

diferenciación condrogénica. Los valores de PG y GAG obtenidos en las diferenciaciones se ajustan a los valores presentes en el cartílago hialino. La inmunohistoquímica con colágeno I ha mostrado valores muy elevados de este compuesto ya que se comienza a sintetizar en los primeros días de diferenciación. Esto es debido a que el cultivo de la micromasa es de 21 días y solo permite observar los primeros estadios de diferenciación. Si alargásemos el proceso el contenido de colágeno I probablemente disminuiría, como ocurre en estudios como el de Ng *et al.*, 2016.

Como resultado del estudio de la condrogénesis no observamos diferencias en el potencial de donantes artrósicos y donantes sanos, aunque sí se aprecia que algunas micromasas control sanas presentan mayores valores de diferenciación que las micromasas control artrósicas. Se observa que un factor determinante parece ser la edad, presentando mayores contenidos en GAG, PG y colágeno I los donantes más jóvenes. Nuestros datos concuerdan con los obtenidos por Beane *et al.*, 2014 y Choudhery *et al.*, 2014 los cuales demuestran que la edad es un factor clave en la capacidad de condrogénesis de un cultivo de CMM de médula ósea.

El estudio de la adipogénesis y de osteogénesis se ha realizado cultivando dos volúmenes celulares conocidos de cada paciente en distintas condiciones, uno actuaba de control negativo sin inducir su diferenciación mientras que el otro se sometía a un medio que inducía su diferenciación. Otra vez debido a la variabilidad entre donantes se han observado distintos contenidos de vacuolas lipídicas y de depósitos cálcicos.

La tinción con Oil-Red-O ha sido adecuada para la tinción de vacuolas lipídicas presentes en el cultivo. De nuevo no se observan diferencias entre los cultivos artrósicos y los cultivos sanos. En cambio, los donantes más jóvenes (<80 años) han desarrollado un mayor volumen de vacuolas lipídicas comparados con los más vejetados (>80 años) de los cuales el mayor no ha mostrado diferenciación. De esta manera la edad también se presenta como un factor crítico para la diferenciación adipogénica.

En el caso de la osteogénesis, la tinción con rojo alizarina ha teñido correctamente los depósitos cálcicos presentes en el cultivo. En este caso no parece haber diferencias entre cultivos artrósicos y sanos, y las observadas entre donantes menores de 80 años y mayores no son tan marcadas como en el caso de adipogénesis y condrogénesis.

En resumen, la OA parece tener un papel clave en la proliferación celular y afectar a la calidad de la población, ya que las células obtenidas de médula ósea de donantes

artrósicos presentaban una mayor cantidad de macrófagos, y en muchas ocasiones tuvieron que ser desechadas por senescencia o por exceso de macrófagos. Sin embargo una vez expandidos los cultivos lo que parece afectar al potencial de diferenciación es más la edad que la OA en sí. Por ello tanto las células obtenidas de donantes con patología artrósica como las obtenidas de donantes sanos pueden ser usadas como tratamiento para la OA si su proliferación es buena ya que no presentan *MHC II* y presentan valores de diferenciación similares. Sin embargo también es cierto que la patología artrósica y la edad van de la mano, ya que las células de donantes sanos proliferan más rápidamente, algo que también puede atribuirse a la edad ya que en nuestro caso coincide que los donantes sanos son los de menor edad. Por tanto, la edad es uno de los factores que más influye en la calidad de la población celular y nuestros resultados parecen indicar que los trasplantes autólogos deben hacerse en donantes jóvenes, en los primeros estadios de la OA, y que para donantes mayores sería más eficaz el trasplante heterólogo.

En este estudio solamente se ha realizado un análisis estadístico de los datos de proliferación debido a que en el resto de datos el tamaño muestral es muy pequeño. Si bien es cierto que los resultados en general parecen indicar que un factor clave es la edad y no la patología, para los resultados de proliferación parece ser al contrario, ya que el tiempo de proliferación es significativamente menor en las células de donantes sanos que de donantes con proceso artrósico. En estudios de continuación sería conveniente aumentar el tamaño muestral para confirmar estos datos.

Conclusiones.

- Los cultivos de médula ósea humana estudiados han cumplido con los tres requisitos básicos que nos marcamos en este estudio. Han mostrado capacidad adherente, han sido positivos para CD73, CD90 y CD105, y negativos para CD34, CD45 y *MHC II*, y han mostrado capacidad adipogénica, osteogénica y condrogénica.
- La patología artrósica fomenta la senescencia celular afectando a los cultivos de donantes artrósicos, que tardan más tiempo en proliferar o pueden no llegar a hacerlo.
- Si la proliferación es buena, los resultados de la caracterización celular son similares en todos los donantes, independientemente de la edad y la OA.

- La edad destaca como factor determinante en la diferenciación adipogénica y condrogénica. Sin embargo no parece afectar a la osteogénesis. Además la OA no parece ser relevante en la capacidad de diferenciación de los cultivos.
- Tanto las CMM de donantes artrósicos como de donantes sanos podrían ser aptas para el trasplante. Ambas muestran capacidad de diferenciación y no expresan *MHC II* por lo que no activarían al sistema inmune. Sin embargo, el uso autólogo de células madres en pacientes artrósicos parece estar limitado a donantes de baja edad, mientras que seguramente en pacientes mayores sería conveniente el trasplante heterólogo, aunque son necesarios más estudios para confirmar estos resultados.

Bibliografía

Artículos:

Alegre, E., Desportes, P., García-Álvarez, F., Castiella, T., Larrad, L., y Martínez-Lorenzo, M.J. (2012). Differences in surface marker expression and chondrogenic potential among various tissue-derived mesenchymal cells from elderly patients with osteoarthritis. *Cells, tissues, organs*, 196(3), 231-40. <https://doi.org/10.1159/000334400>

Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., y Lotz, M. (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 50(5), 1522-1532. <https://doi.org/10.1002/art.20269>

Arufe, M.C., De la Fuente, A., Fuentes-Boquete, I., De Toro, F.J., y Blanco, F.J. (2009). Differentiation of synovial CD-105+ human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(1), 145-155. <https://doi.org/10.1002/jcb.22238>

Beane, O.S., Fonseca, V.C., Cooper, L.L., Koren, G., y Darling, E.M. (2014). Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem stromal cells. *PLoS one*, 9(12), e115963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115963>

Bland, S.D. (2015). Canine osteoarthritis and treatments: a review. *Veterinary Science Development*, 5(1). <https://doi.org/10.4081/vsd.2015.5931>

Brown, P.T., Squire, M.W., y Li, W.J. (2014). Characterization and evaluation of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow. *Cell and Tissue Research*, 358(1), 149-164. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1926-5>

Busser, H., Najar, M., Raicevic, G., Pieters, K., Velez Pombo, R., Philippart, P., Meuleman, N., Bron, D., Lagneaux, L. (2015). Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations: Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue. *Stem Cells and Development*, 24(18), 2142-2157. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0172>

Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., y Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), 2396-402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11588036>

Carmona, L., Ballina, J., Gabriel, R., Laffon, A., y EPISER Study Group. (2001). The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Annals of the rheumatic diseases*, 60(11), 1040-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602475>

- Centeno, C.J., Schultz, J.R., Cheever, M., Robinson, B., Freeman, M., y Marasco, W. (2010). Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Current stem cell research & therapy*, 5(1), 81-93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951252>
- Chahla, J., LaPrade, R.F., Mardones, R., Huard, J., Philippon, M.J., Nho, S., Mei-Dan, O., y Pascual-Garrido, C. (2016). Biological Therapies for Cartilage Lesions in the Hip: A New Horizon. *Orthopedics*, 39(4), e715-23. <https://doi.org/10.3928/01477447-20160623-01>
- Chen, F.H., y Tuan, R.S. (2008). Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis research & therapy*, 10(5), 223. <https://doi.org/10.1186/ar2514>
- Choudhery, M.S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., y Harris, D.T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of translational medicine*, 12(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8>
- Chua, K.H., Zaman Wan Safwani, W.K., Hamid, A.A., Shuhup, S.K., Mohd Hafilah, N.H., y Mohd Yahaya, N.H. (2014). Retropatellar fat pad derived stem cells from older osteoarthritic patients have lesser differentiation capacity and expression of stemness genes. *Cytotherapy*, 16(5), 599-611. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.08.013>
- Cleary, M.A., Narcisi, R., Focke, K., Van der Linden, R., Brama, P.A.J., y van Osch, G.J.V.M. (2016). Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(5), 868-872. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.11.018>
- Creamer, P., y Hochberg, M.C. (1997). Osteoarthritis. *The Lancet*, 350(9076), 503-509. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07226-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07226-7)
- Davatchi, F., Abdohalli, B.S., Mohyeddin, M., Shahram, F., y Nikbin, B. (2011). Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 14(2), 211-215. <https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2011.01599.x>
- Davatchi, F., Abdollahi, B.S., Mohyeddin, M., y Nikbin, B. (2016). Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: 5 years follow-up of three patients. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 19(3), 219-225. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12670>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J. y Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Emadedin, M., Aghdami, N., Taghiyar, L., Fazeli, R., Moghadasali, R., Jahangir, S., Farjad, R. y Baghaban Eslaminejad, M. (2012). Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Archives of Iranian medicine*, 15(7), 422-8. <https://doi.org/012157/AIM.0010>
- Espanha, M.M. (2010). Articular cartilage: structure and histochemical composition. *Acta reumatologica portuguesa*, 35(5), 424-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245810>
- Goldring, M.B., y Otero, M. (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 23(5), 471-478. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328349c2b1>
- Gugjoo, M., Amarpal Sharma, G., Aithal, H., y Kinjavdekar, P. (2016). Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors yamp; scaffolds. *Indian Journal of Medical Research*, 144(3), 339. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.198724>
- Hermida Gómez, T., Fuentes Boquete, I., Gimena Longas, M.J., Muñios López, E., Díaz Prado, S., de Toro, F.J. y Blanco, F.J. (2011). Quantification of Cells Expressing Mesenchymal Stem Cell Markers in Healthy and Osteoarthritic Synovial Membranes. *The Journal of Rheumatology*, 38(2), 339-349. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100614>
- Hoffmann, A., Floerkemeier, T., Melzer, C., y Hass, R. (2016). Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. <https://doi.org/10.1002/term.2153>
- Jones, E., English, A., Churchman, S., Kourouppis, D., Boxall, S., Kinsey, S., Giannoudis, P.G., Emery, P. y McGonagle, D. (2010). Large-scale extraction and characterisation of CD271 + multipotential stromal

cells (MSCs) from trabecular bone in health and osteoarthritis: Implications for bone regeneration strategies based on minimally-cultured MSCs. *Arthritis & Rheumatism*, 62(7), NA-NA. <https://doi.org/10.1002/art.27451>

Karp, J.M., y Leng Teo, G.S. (2009). Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell*, 4(3), 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>

Koh, Y.G., Choi, Y.J., Kwon, S.K., Kim, Y.S., y Yeo, J.E. (2015). Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 23(5), 1308-1316. <https://doi.org/10.1007/s00167-013-2807-2>

Kuang, W., Xu, X., Lin, J., Cao, Y., Xu, Y., Chen, L., Jin, Li, y Tan, J. (2015). Functional and Molecular Changes of MSCs in Aging. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 10(5), 384-391. <https://doi.org/10.2174/1574888X10666150211162933>

Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S. y Kurosaka, M. (2007). Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis and cartilage*, 15(2), 226-31. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.08.008>

Li, H., Ghazanfari, R., Zacharaki, D., Lim, H.C., y Scheduling, S. (2016). Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1370(1), 109-118. <https://doi.org/10.1111/nyas.13102>

Loza, E., Lopez-Gomez, J.M., Abasolo, L., Maese, J., Carmona, L., Batlle-Gualda, E., y Artrocad Study Group. (2009). Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis and rheumatism*, 61(2), 158-65. <https://doi.org/10.1002/art.24214>

Marx, C., Silveira, M.D., y Beyer Nardi, N. (2015). Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications. *Stem Cells and Development*, 24(7), 803-813. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0407>

Murphy, J.M., Dixon, K., Beck, S., Fabian, D., Feldman, A., y Barry, F. (2002). Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 46(3), 704-713. <https://doi.org/10.1002/art.10118>

Musumeci, G., y Giuseppe. (2016). The Effect of Mechanical Loading on Articular Cartilage. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, 1(2), 154-161. <https://doi.org/10.3390/jfmk1020154>

Nassiri, F., Cusimano, M.D., Scheithauer, B.W., Rotondo, F., Fazio, A., Yousef, G.M., Syro, L.V., Kovacs, K. y Lloyd, R.V. (2011). Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer research*, 31(6), 2283-90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737653>

Ng, J., Wei, Y., Zhou, B., Burapachaisri, A., Guo, E., y Vunjak-Novakovic, G. (2016). Extracellular matrix components and culture regimen selectively regulate cartilage formation by self-assembling human mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Stem cell research & therapy*, 7(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0447-4>

Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., Sentís, J., Sánchez, A. y García-Sancho, J. (2013). Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation Journal*, 95(12), 1535-1541. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318291a2da>

Pritzker, K.P.H., Gay, S., Jimenez, S.A., Ostergaard, K., Pelletier, J.P., Revell, P. A., Salter, D. y Van den Berg, W. B. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(1), 13-29. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014>

Richter, D.L., Schenck, R.C., Wascher, D.C., y Treme, G. (2016). Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques. *Sports Health*, 8(2), 153-160. <https://doi.org/10.1177/1941738115611350>

Roberts, S., Genever, P., McCaskie, A., y Bari, C.D. (2011). Prospects of stem cell therapy in osteoarthritis. *Regenerative Medicine*, 6(3), 351-366. <https://doi.org/10.2217/rme.11.21>

Ryu, H.H., Kang, B.J., Park, S.S., Kim, Y., Sung, G.J., Woo, H.M., Kim, W.H. y Kweon, O.K. (2012). Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *The Journal of veterinary medical science*, 74(12),

1617-30. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878503>

Sidney, L.E., Branch, M.J., Dunphy, S.E., Dua, H.S., y Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(6), 1380-9. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>

Somoza, R.A., Welter, J.F., Correa, D., y Caplan, A.I. (2014). Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 20(6), 596-608. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0771>

Sridharan, G., y Shankar, A.A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 16(2), 251-5. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081>

Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., y Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(3), 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.12.002>

Umlauf, D., Frank, S., Pap, T., y Bertrand, J. (2010). Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(24), 4197-4211. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0498-0>

Tesis Doctorales:

Muñoz, E., Blanco, F.J. y Díaz, S.M. (2010). La membrana amniótica humana: caracterización de las células madre y su aplicación en terapia celular para reparar lesiones de cartílago articular humano (Tesis doctoral). Universidade da Coruña, La Coruña, España.

Vela, A., Meijide, R. y Fernández, E. (2015). El sulfuro de hidrógeno como diana terapéutica en la artrosis (Tesis doctoral). Universidade da Coruña, La Coruña, España.

Capítulos de libros:

Alonso, A. (2002). Artrosis: definición y clasificación. En: Batlle-Gualda, E., Benito Ruiz, P., Blanco García, F.J., Martín Mola, E. (Eds). Manual S.E.R. de la Artrosis. Madrid: IMyC, pp. 9-17.

Benito, P. (2002). Estructura y función del cartílago. En: Batlle-Gualda, E., Benito Ruiz, P., Blanco García, F.J., Martín Mola, E. (Eds). Manual S.E.R. de la Artrosis. Madrid: IMyC, pp. 33-43.

Trujillo, E. (2002). Mecanismos de destrucción y reparación del cartílago. En: Batlle-Gualda, E., Benito Ruiz, P., Blanco García, F.J., Martín Mola, E. (Eds). Manual S.E.R. de la Artrosis. Madrid: IMyC, pp. 43-61.

Vicente, E. (2002). Visión global integradora. En: Batlle-Gualda, E., Benito Ruiz, P., Blanco García, F.J., Martín Mola, E. (Eds). Manual S.E.R. de la Artrosis. Madrid: IMyC, pp. 427-441.