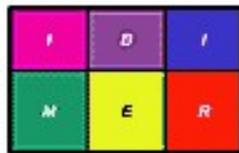


UNIVERSIDAD DE GRANADA



ALTERACIÓN EN LA METILACIÓN DEL ADN EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICO Y MIOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

Memoria presentada por Dña. Inmaculada Zafra Camacho
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, 25 de Noviembre de 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Inmaculada Zafra Camacho
ISBN: 978-84-9163-205-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/46521>

Dra. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO,
CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que Dña. Dña. Inmaculada Zafra Camacho ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“ALTERACIÓN EN LA METILACIÓN DEL ADN EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICO Y MIOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 25 de Noviembre de 2016.

Fdo: Dra. Dña. Consolación Melguizo Alonso
Catedrática de Universidad

Dr. JOSE CARLOS PRADOS SALAZAR,
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D. Jaime Antonio Oliver Esteve ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“ALTERACIÓN EN LA METILACIÓN DEL ADN EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICO Y MIOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 25 de Noviembre de 2016.

Fdo: Dr. D. Jose Carlos Prados Salazar
Catedrático de Universidad

Dra. ANA ROSA RAMA BALLESTEROS,
PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

HACE CONSTAR:

Que Dña. Inmaculada Zafra Camacho ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“ALTERACIÓN EN LA METILACIÓN DEL ADN EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICO Y MIOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 25 de Noviembre de 2016.

Fdo: Dra. Dña. Ana Rosa Rama Ballesteros
Profesora Contratada Doctora

Resumen

Las células madre adultas son en la actualidad una potencial alternativa terapéutica para un gran número de patologías, que carece de limitaciones éticas y que son fácilmente obtenibles de los propios pacientes, evitando los problemas derivados de la incompatibilidad y el rechazo. En este contexto, las células madre mesenquimales aisladas de tejido adiposo han generado una enorme expectación e interés como alternativa terapéutica para el desarrollo de nuevas terapias en enfermedades del sistema músculo esquelético hasta ahora incurables o de mal pronóstico.

En la presente Tesis Doctoral hemos optimizado y caracterizado el proceso de obtención de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y las hemos diferenciado hacia un linaje osteogénico y miogénico. Se han caracterizado las poblaciones obtenidas mediante un intenso estudio morfológico con microscopía óptica, electrónica y de barrido y se han determinado los principales marcadores osteogénicos y miogénicos mediante RT-PCR, Western Blot e inmunofluorescencia. En estudio, hemos encontrando depósitos de calcio y un incremento en la expresión en osteonectina, osteocalcina, osteopontina, elementos fundamentales en la matriz extracelular del tejido óseo, en el proceso de diferenciación osteogénica. Por otra parte, se ha evidenciado un incremento de desmina, actina, actinina o cadena pesada de la miosina en el proceso de diferenciación miogénica. Además, para ahondar en el conocimiento de los genes implicados en estos procesos y su relevancia en los mecanismos que lo inducen, hemos realizado un estudio de metilación, uno de los factores epigenéticos que determinan la identidad celular. El análisis de 27.578 CpG, nos ha permitido identificar 23 y 25 genes en la diferenciación osteogénica y miogénica respectivamente, con modificaciones de la metilación de las CpG en sus promotores en relación a las células madre de tejido adiposo. Una de las modificaciones más relevantes fue la del promotor del gen PIWIL2, que aparece hipermetilado tras ambos procesos de diferenciación disminuyendo su expresión drásticamente en las células de estirpe osteogénica y miogénicas obtenidas. Este hallazgo es, si cabe más importante, dada la recientemente demostrada relación entre PIWIL2 y los procesos de tumorigénesis.

Para determinar exactamente su grado de implicación en los procesos de diferenciación, hemos silenciado PIWIL2 mediante RNA de interferencia, observando que esta pérdida de expresión se correlaciona con un incremento de marcadores de diferenciación osteogénica (osteopontina o fosfatasa alcalina) y miogénica (desmina y MEF2). Por tanto, PIWIL2, parece un gen fundamental en ambos procesos de diferenciación y deberá ser analizado en futuros estudios.

Summary

At the present time, Adults Stem Cells are a potential therapeutic alternative in a large number of pathologies, lacking of ethical limitations and being easily obtainable from the own patients avoiding the problems related to the incompatibility and the rejection. In this context, Mesenchymal Stem Cells isolated from adipose tissue have generated an enormous sense of expectancy and interest as a therapeutic alternative for the development of new therapies related with skeletal muscle system diseases, until now incurable or with a very poor prognosis.

In the present Doctoral Thesis, we have optimized and characterized the process of isolation of this type of cells and have induced its differentiation processes towards osteogenic and myogenic lineages. These obtained cells populations have been characterized by an intense morphologic study using optical, electronic and scanning microscopy techniques. In addition, osteogenic and myogenic principal biomarkers have been determined by RT-PCR, Western Blot and immunofluorescence techniques. For osteogenic differentiation process, these assessments have revealed the appearance of deposits of calcium and an increase in the expression of Osteonectin, Osteocalcin and Osteopontin, key elements in the bone extracellular matrix. The equivalent assessments applied for myogenic differentiation process have showed an increase of Desmin, Actin, Actinin and Myosin Heavy Chain biomarkers. Nevertheless, to fathom in the knowledge of genes which are involved in these processes and the grade of relevancy in the mechanisms that induce them, we have performed a study of methylation which is now recognized as one of the epigenetic factors that allows the determination of cellular identity. The analysis of 27.578 CpG, has allowed us to find 23 and 25 genes in osteogenic and myogenic differentiation respectively, which showed modulation in CpG methylation in relation to adipose-derived mesenchymal stem cells. One of this changes was related to the PIWIL2 gen promoter which appeared hypermethylated after both differentiation process drastically decreasing its expression. In addition, PIWIL2 has been related to tumorogenesis process. To determine the exactly implication grade of PIWIL gene on the differentiation process, we have used PIWIL2 RNA interference, carried out an inhibition of its expression and, at the same time, an increase of osteogenic (Osteopontin or Alkaline Phosphatase) and myogenic biomarkers (Desmin and

MEF2). Accordingly, PIWIL2 may be an essential gene on both differentiation processes and will have to be analysed in future studies.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	1
1. CÉLULAS MADRE.	1
1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE.	1
1.2. CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE.	2
1.3. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs).	9
1.4. APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS.	13
1.5. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS ASCs.	20
1.6. DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS ASCs.	24
1.7. EFECTOS INMUNOMODULADORES DE LAS MSCs.	26
2. EL TEJIDO ÓSEO.	28
2.1. CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO.	28
2.2. MATRIZ DEL TEJIDO ÓSEO.	30
2.3. OSIFICACIÓN.	32
2.4. REMODELACIÓN ÓSEA.	32
3. EL TEJIDO MUSCULAR.	34
3.1. ESTRUCTURA TEJIDO MUSCULAR ESTRIADO.	35
3.3. CONTRACCIÓN MUSCULAR.	39
4. LA EPIGENÉTICA.	41
4.1. LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS.	41
II. OBJETIVOS.	54
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	55
1. OBTENCIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO (hASCs).	55
1.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE GRASA.	56
1.2. CULTIVO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO.	58
1.3. CONTAJE CELULAR.	59
1.4. CONGELACIÓN Y DECONGELACIÓN CELULAR.	60
1.5. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA.	61
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO (hASCs) MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO (FACScan).	62
3. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO (hASCs).	64
3.1. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.	64
3.2. DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA (MIM).	66

4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS: ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.	70
4.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	70
4.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.	70
4.3. SDS-PAGE.....	72
4.4. TRANSFERENCIA: INMUNOBLOTTING.....	74
4.5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	75
5. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ARN.....	76
5.1. EXTRACCIÓN DE ARN.	77
5.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	78
5.3. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	78
5.4. TRANSCRIPTASA REVERSA (RT).....	79
5.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	80
6. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ADN.....	82
6.1. EXTRACCIÓN DE DNA.	82
6.2 CUANTIFICACIÓN DEL DNA.	83
6.3. CHEQUEO DEL DNA MEDIANTE ELECTROFORESIS.....	83
6.4. ESTUDIOS DE METILACIÓN.	83
6.5. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS JERÁRQUICOS Y DEFINICIÓN DE DIFERENCIAS DE METILACIÓN DE CPG.....	85
6.6. SECUENCIACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE METILACIÓN DE CLONOS SELECCIONADOS.	85
7. MICROARRAYS DE EXPRESIÓN.	86
7.1. EXTRACCIÓN DE ARN Y PROCESO DE MICROARRAY.....	86
7.2. RT-QPCR DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS... ..	87
8. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN.	88
9. RNA DE INTERFERENCIA.	89
10. REVERSIÓN DE LOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN.....	90
IV. RESULTADOS.....	91
1. AISLAMIENTO DE (hASCs) A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO.....	91
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS hASCs.....	92
2.1. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS hASCs.	92
3. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS hASCs.	92
3.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.	92
3.2. TINCIÓN CON ROJO DE ALIZARINA.	96
3.3. ANÁLISIS POR WESTERN-BLOT DE MARCADORES OSTEOGÉNICOS.....	97
3.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES OSTEOGÉNICOS.	98
3.4. ESTUDIOS DE MICROARRAY EN HASCS-MIO.....	99
3.5. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN DE SAA1 Y PIWIL2.....	102

3.6. REVERSIÓN DE HASCS DIFERENCIADAS A LINAJE OSTEOGÉNICO.	104
3.7. SILENCIAMIENTO DE PIWIL2.	106
4. DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS hASCs.	107
4.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.	108
4.2. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA DE MARCADORES MIOGÉNICOS.	110
4.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.	111
4.4. ESTUDIOS DE MICROARRAY.	112
4.5. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA EXPRESIÓN DE PTPRS Y PIWIL2.	115
4.6. REVERSIÓN DE HASCS DIFERENCIADAS A LINAJE MIOGÉNICO.	116
4.7. SILENCIAMIENTO DE PIWIL2.	119
V. DISCUSIÓN.	121
VI. CONCLUSIONES.	135
VII. BIBLIOGRAFÍA.	137

I. INTRODUCCIÓN.

1. CÉLULAS MADRE.

Las células madre representan en la actualidad una alternativa terapéutica real para el tratamiento de una gran cantidad de patologías. Las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas, a pesar de sus grandes ventajas, siguen presentando limitaciones derivadas de las consideraciones éticas y/o de la manipulación genética. Por ello, cada vez son más los estudios que analizan las células madre adultas, de fácil obtención, expansión y sin limitaciones éticas, con el objeto de determinar su grado de aplicabilidad en la medicina regenerativa de diferentes enfermedades. En este contexto, las células madre mesenquimales aisladas de tejido adiposo, además de ser capaces de diferenciarse a células origen mesodérmico, ofrecen dos relevantes ventajas desde el punto de vista clínico en relación a otras células madre: 1) la posibilidad de obtenerlas en gran número dada la accesibilidad del tejido de origen y 2) que dicha obtención puede ser realizada de forma ambulatoria y mediante anestesia local. La posibilidad de reprogramar estas células mediante señales microambientales y dirigir su diferenciación hacia un tejido específico ha generado una enorme expectación e interés como alternativa terapéutica. En este sentido la demostrada habilidad de las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo para generar células de estirpe muscular u ósea ha abierto una nueva vía de investigación para el desarrollo de nuevas terapias en enfermedades del sistema musculoesquelético hasta ahora incurables o de mal pronóstico.

1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE.

Por definición, una célula madre es una célula indiferenciada que posee la capacidad de auto-renovarse y de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir uno o más tejidos maduros (Cheng y cols., 2011).

La capacidad de autorenovación permite a las células madre perpetuarse mediante divisiones asimétricas que generan una célula hija de características similares a la célula progenitora y otra célula hija diferenciada. Esta capacidad permite mantener un número limitado de células madre en los tejidos que actúan como un reservorio para cubrir las necesidades fisiológicas y homeostáticas del organismo. La división simétrica, permite a la célula madre llevar a cabo una división dando lugar a dos células madre indiferenciadas con el mismo patrón de expresión génica y fenotipo (Galzit y cols., 2014). Para que este proceso pueda ocurrir, las células madre deben encontrarse en condiciones apropiadas, condiciones que eviten los procesos de apoptosis y de diferenciación. Diversos estudios sugieren que la auto-renovación de las células madre puede estar controlada mediante señalizaciones Wnt, Notch y BMP (Van Camp y cols., 2014).

La segunda característica de las células madre es su plasticidad, es decir, la capacidad para diferenciarse a múltiples linajes celulares que les lleva a originar uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados a través de un proceso regulado a nivel molecular y dependiente de factores exógenos dependiente del microambiente celular. Esta capacidad convierte a este tipo celular en un elemento potencial para regenerar y reparar diferentes tejidos y órganos ofreciendo un amplio abanico de soluciones terapéuticas en un gran número de enfermedades (Mizuno y cols., 2012).

1.2. CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE.

La clasificación de este tipo de células está sujeta a continuos cambios, pero podemos clasificarlas atendiendo a su plasticidad o potencial de diferenciación y a su origen.

1.2.1. Según Potencial de Diferenciación.

Según su potencial de diferenciación (Lakshmiathy y Verfaillie, 2005) a las distintas capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), las células madre se pueden clasificar (Figura 1) en:

• **Totipotentes:** son aquellas capaces de crecer, transformarse en cualquiera de los tejidos de un organismo y formar un organismo completo puesto que no sólo son capaces de diferenciarse hacia las 3 capas embrionarias, tejido del saco vitelino o linaje germinal sino también a tejidos extraembrionarios como la placenta. Estas células resultan de las primeras divisiones del cigoto formado a partir de la fecundación del óvulo (Morgani y cols., 2013).

• **Pluripotentes:** también conocidas como células madre embrionarias. Proceden de la masa celular interna del blastocisto y pueden dar lugar a cualquier tipo de célula del organismo, de cualquiera de las 3 capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero no pueden formar un organismo completo puesto que no pueden generar tejidos extraembrionarios (Posfai y cols., 2014).

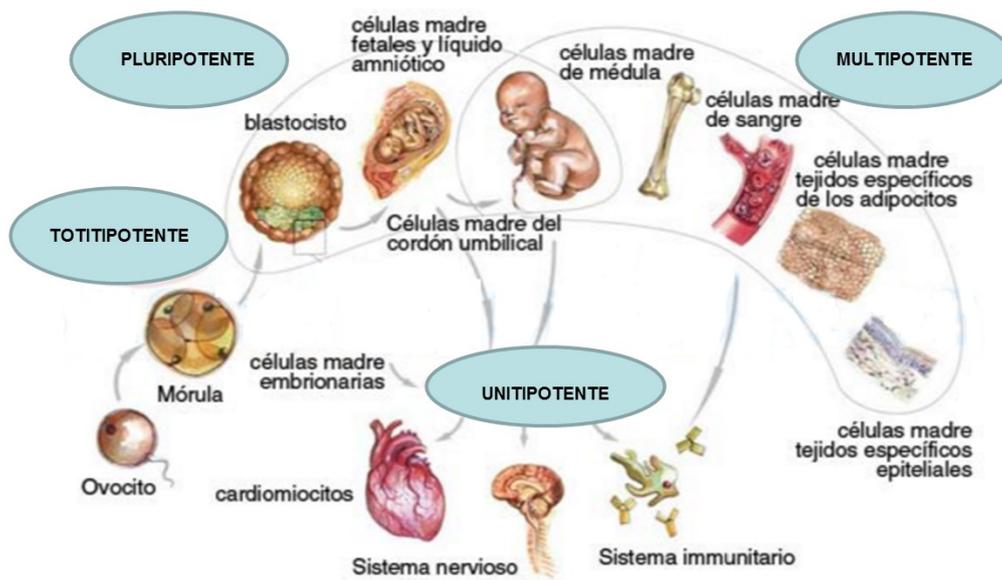


Figura 1. Clasificación de células madre en función de su potencial de diferenciación (modificada de delatandoalaciencia2.blogspot.com.es). Las células madre sufren un proceso de especialización que implica un compromiso irreversible hacia el tipo celular en el que definitivamente se van a convertir.

• **Multipotentes:** proceden de los tejidos adultos siendo capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas, en concreto sólo son capaces de

diferenciarse a células de la misma capa embrionaria de la que proceden (Stochaj y cols., 2013).

- **Unipotentes:** solamente pueden formar un tipo de célula específica (Slack, 2000).

- **Pluripotentes inducidas:** obtenidas por reprogramación genética de células somáticas adultas utilizando los factores de transcripción, Oct3 / 4, Sox2, Klf4 y c-Myc.

1.2.2. Según su Origen.

a. Células Madre Embrionarias (ESCs).

El cigoto formado tras la fecundación de un óvulo por un espermatozoide es una célula capaz de originar un organismo completo con todos sus tejidos, es por tanto, una célula totipotente y la ESC por excelencia. A medida que se va desarrollando el embrión, sus células van perdiendo esta capacidad de forma progresiva. La totipotencialidad se mantiene durante los cuatro primeros días del desarrollo embrionario, en los que el cigoto sufre una serie de divisiones formando una esfera compacta llamada mórula (Figura 2), donde cada una de las células que la forman y por separado continúan teniendo la capacidad de generar un individuo completo y por lo tanto continúan siendo totipotentes (De Paepe y cols., 2014).

Sin embargo, a partir del cuarto día del desarrollo embrionario humano comienza una primera especialización y se forma el blastocisto formado por:

- El trofoblasto: capa superficial que formará la placenta y las envolturas embrionarias.

- Una cavidad casi hueca, rellena de fluido, donde se encuentra una masa celular interna denominada embrioblasto.

Esta masa celular interna está formada por células pluripotentes, es decir, dejan de ser células totipotentes debido a que ya no pueden generar un individuo

completo puesto que necesitarían también el trofoblasto. No obstante, poseen un gran potencial de diferenciación dado que pueden diferenciarse hacia cualquier tejido embrionario (De Paepe y cols., 2014).

A pesar de la controversia ético-social generada por la utilización de las ESCs (Palacios-González y cols., 2014), estas células son consideradas unas de las principales herramientas para el screening de nuevos fármacos, para el estudio de las enfermedades prenatales o en la terapia de reemplazo celular, puesto que pueden mantenerse indefinidamente en cultivo sin diferenciarse usando fibroblastos humanos o de ratón (Reynolds y Lamba, 2013).

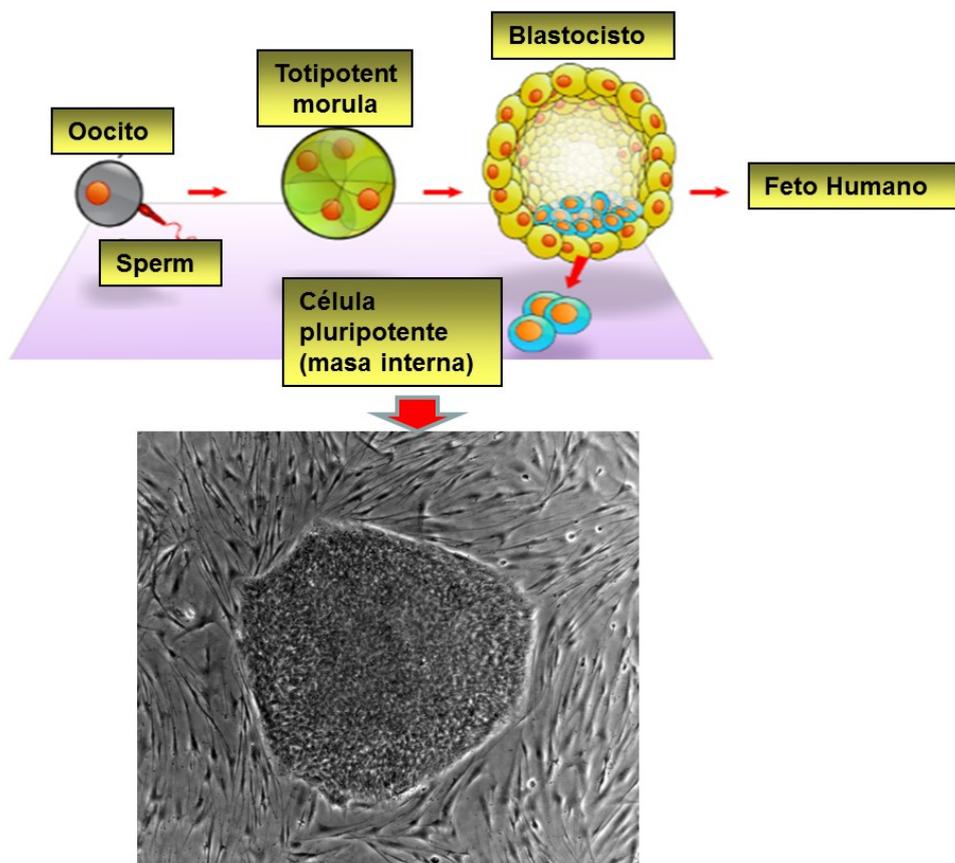


Figura 2. Obtención de células madre embrionarias y posterior cultivo in vitro (modificada de wikipedia.es). Las células madre obtenidas (zona central) crecen en un soporte de células nodrizas de estirpe fibroblástica (zona periférica).

b. Células Madre Adultas (ASC).

La mayoría de los tejidos de los individuos adultos poseen una población especial de células que les permiten su renovación periódica o su regeneración ante una lesión. Estas células, denominadas células madre adultas, son capaces de diferenciarse en más de una estirpe celular siendo lo más frecuente que se diferencien a la mayoría de tipos celulares del tejido u órgano del que proceden. Se caracterizan por tanto por

- 1) ser capaces de auto-renovarse,
- 2) dividirse tantas veces como sea necesario para mantener un tejido y regenerarlo y
- 3) diferenciarse hacia distintos tipos de líneas celulares (Crawford y cols., 2014),

A diferencia de las ECS, cuyo origen es conocido (la masa celular interna del blastocisto), el origen de las ASC en los tejidos maduros no se conoce. No obstante, ha sido ampliamente documentado que se encuentran en un número extremadamente bajo y que residen de forma quiescente (sin división) en un área específica de cada tejido, siendo sólo activadas ante daño o pérdida tisular. Los tejidos donde se han detectado estas células madre adultas incluyen médula ósea, sangre periférica, músculo esquelético (denominadas células satélite miogénicas), músculo cardiaco, tejido adiposo, piel, hígado y cerebro (Pearson, 2006). Esta última localización es especialmente relevante por su capacidad para generar astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Las investigaciones más actuales se centran, dada su demostrada capacidad para reparar los tejidos lesionados, en la posibilidad de cultivarlas y manipularlas in vitro para su futura aplicación en Medicina Regenerativa.

Las principales diferencias entre las ESCs y ASCs estriba en que mientras que las primeras pueden diferenciarse a cualquier tipo celular del organismo (De Paepe y cols., 2014), las ASCs tienen una capacidad de diferenciación limitada, ya que sólo pueden diferenciarse en tipos celulares que provengan de su tejido original (Stochaj y cols., 2013). Sin embargo, actualmente existen evidencias que sugieren que estas células madre adultas pueden tener una mayor plasticidad de la que se pensaba con anterioridad (Wang y cols., 2014). En 1999, Bjornson y cols., consiguieron cultivar células madre de adulto, procedentes del sistema nervioso de rata y transformarlas en células sanguíneas. Además aseguraron que las células

madre de los tejidos adultos podían diferenciarse, reprogramarse y dividirse igual que las de la masa interna de los embriones. Las posibilidades derivadas de esta mayor plasticidad de las ASC unido a que está demostrada la capacidad de formación de teratomas (Kunter y Floege, 2011) y las propiedades alogénicas de las ESC, que limitan su uso en clínica debido a sus diferencias en el sistema de histocompatibilidad HLA (Chen y cols., 2015) están convirtiendo a las células madre adultas en la base de la investigación para la regeneración de tejidos.

Podemos diferenciar tres tipos de ASCs:

c. Células madre hematopoyéticas (HSC).

Las células madre hematopoyéticas presentan la capacidad de proliferación y diferenciación in vitro hacia todos los linajes hematopoyéticos (Nakajima, 2011), por lo que han sido utilizadas en enfermedades hematológicas recurrentes y en inmunodeficiencias hereditarias. La principal fuente de obtención es la médula ósea, sangre periférica y la sangre de cordón umbilical (Mera y cols., 2007). Básicamente las células madre hematopoyéticas se caracterizan por:

- 1) ser multipotentes con capacidad para generar células de las series roja, blanca y trombocítica;
- 2) poseer un alto potencial proliferativo y;
- 3) auto-renovarse.

Sin embargo, la capacidad de auto-renovación de estas células no es homogénea en todas las poblaciones obtenidas de HSCs, por lo que se ha establecido una clasificación que diferencia entre HSC a largo plazo, con capacidad para diferenciarse en todos los tipos celulares sanguíneos (Figura 3) y además generar progenitores capaces de reconstituir la totalidad del sistema hematopoyético y, las HSCs a corto plazo que tan sólo tienen capacidad para generar células progenitoras de los linajes linfoides y mieloides (Ivanova y cols., 2002; Mayani y cols., 2003).

Para identificar HSCs se utilizan diversos marcadores de membranas, siendo uno de los más utilizados el antígeno CD34, presente en células formadoras de colonias y en células progenitoras linfoides y mieloides y ausente

en las células diferenciadas. Las células que expresan este marcador tienen la capacidad de generar progenie eritroide y mieloide a partir de células formadoras de colonias. También han sido utilizados otros marcadores como CD38, CD133, marcador de CMHs progenitoras de monocitos/granulocitos y eritroides, C-KIT o CD34 importante en la purificación de CMHs de médula ósea y cordón umbilical (Hoffman y cols., 2000; Szilvassy, 2003).

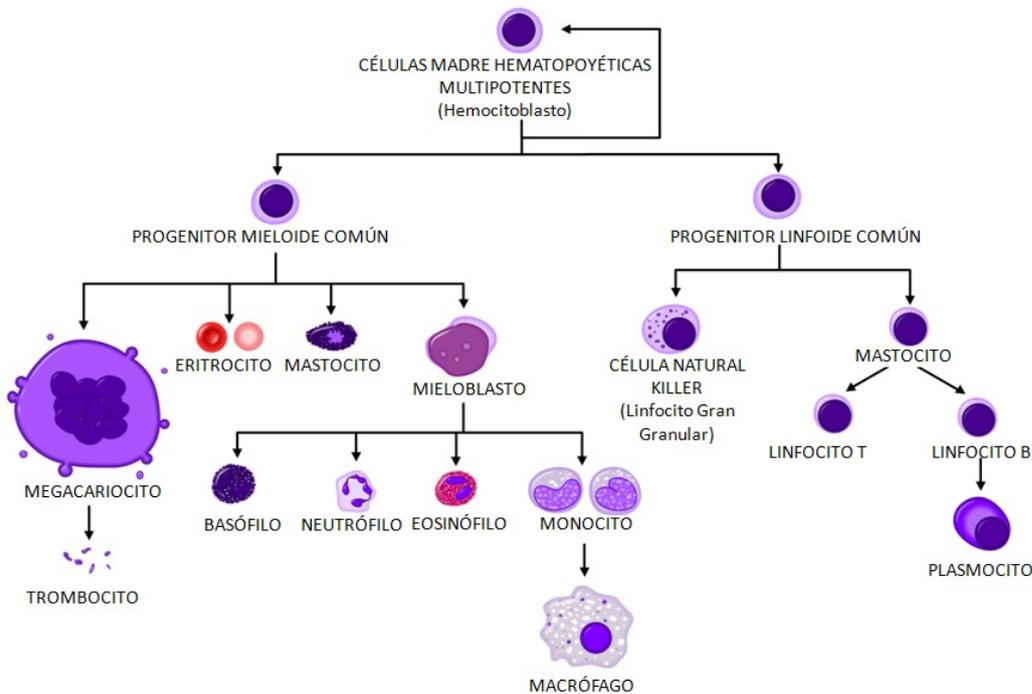


Figura 3. Esquema representativo de la capacidad de diferenciación de las HSCs. Estas células se localizan cerca de la superficie del hueso o asociadas al endotelio sinusoidal. Su principal función es la hematopoyesis. No obstante, existen en otros compartimentos del organismo como sangre del cordón umbilical, placenta, y en menor medida en sangre periférica.

d. Células madre mesenquimales (MSCs).

Son una población mixta de células que pueden generar varios tejidos derivados de la capa mesodérmica (Farini y cols., 2014) en la que nos centraremos en el siguiente apartado por ser objeto de la presente tesis doctoral.

e. Células madre Unipotentes.

Como mencionamos anteriormente, tan sólo son capaces de originar células de los linajes celulares específicos del órgano del que proceden (Figura 4) (Fernández y cols., 2013), son por tanto la célula madre adulto con menor plasticidad, a pesar de ello mantienen la capacidad de autorenovarse por lo que tienen potencial terapéutico para tratar lesiones y enfermedades.

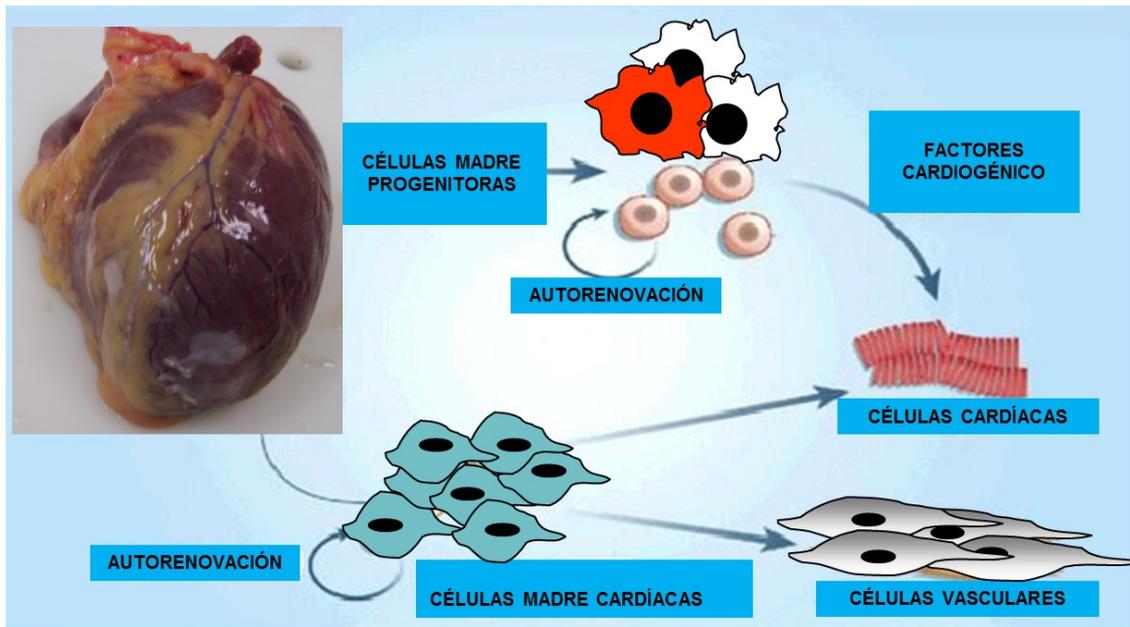


Figura 4. Célula madre cardíaca capaz de diferenciarse en células específicas del órgano de la que procede bajo los estímulos adecuados (modificada de Mummery, 2004).

1.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCS).

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) (Dominici y cols., 2006) existen 3 criterios básicos para definir una célula madre mesenquimal adulta:

- 1) Su adherencia al frasco de cultivo en condiciones de cultivo estándar;
- 2) la expresión en más del 95% de la población de CD73, CD90 y CD105, siendo más del 98% de la población negativa para antígenos celulares de superficie hematopoyéticos como CD34 y CD45 y
- 3) Su capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, condroblastos y adipocitos cuando se les pone un medio de diferenciación adecuado (Figura 5).

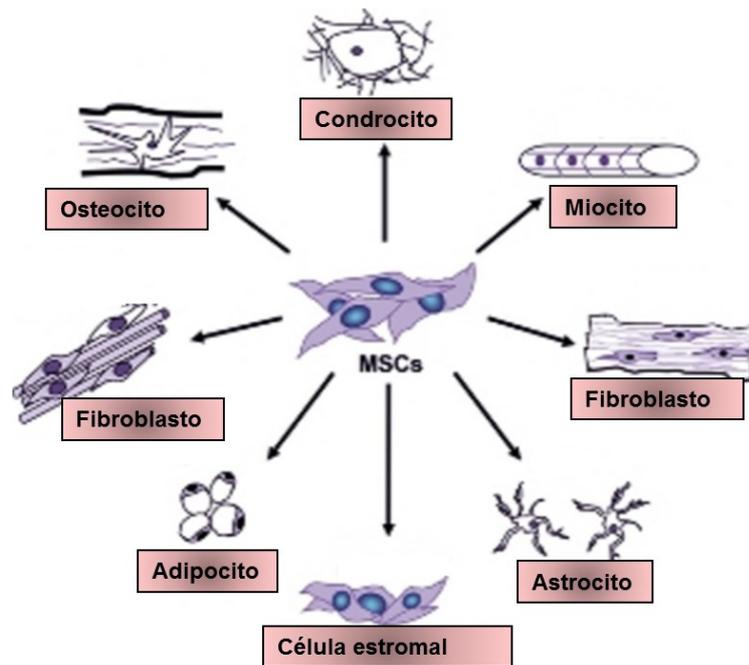


Figura 5. Capacidad de las Células Madre Mesenquimales (MSCs) para diferenciarse a tejidos como cartílago, tendón, hueso, grasa, músculo, etc. (modificado de equicord.com). Estas células se encuentran en una gran cantidad de tejidos adultos (ver a continuación).

Una vez identificadas, su aplicación está limitada por su incapacidad para transformarse en cualquier tipo celular del organismo (Figura 5) ya que no son pluripotentes (Weissman y cols., 2001). No obstante, cada vez más estudios sugieren que las células madre adultas pueden tener una mayor plasticidad de la que tradicionalmente se le asigna (Wagers y Weisman, 2004; Rutenberg y cols., 2004). A pesar de ello, su capacidad de diferenciación limitada se compensa gracias a otras ventajas. Entre estas destacan su facilidad para ser expandidas en cultivo, hecho que resulta especialmente difícil en las células madre embrionarias, y la posibilidad de obtenerlas del propio paciente para posteriormente reintroducírselas (Prósper y cols., 2006) eliminando el problema de la incompatibilidad y la administración de fármacos inmunosupresores.

1.3.1 Fuentes de obtención de Células Madre Mesenquimales.

Las principales fuentes de obtención de estas células madre son: médula ósea, cordón umbilical, tejido adiposo, líquido amniótico, tejido placentario, pulpa dental, decidua, membrana sinovial, hígado, timo, cerebro, bazo, testículos, páncreas y periostio (Summer y Fine, 2008; Roufosse y cols., 2004; Nardi y Da-Silva, 2006; Kolf y cols., 2007). Son tres las teorías que podrían explicar la amplia distribución de este tipo de células madre (Keating, 2006):

1) La primera derivaría del hecho de que los tejidos adultos contienen reservorios de células madre, que dependiendo de las señales emitidas por los respectivos nichos serían capaces de desarrollar características específicas

2) La hipótesis, cada vez más aceptada de que las MSCs circulan por el torrente sanguíneo, determinaría que estas células pueden alcanzar todos los tejidos en los que permanecen en forma de reservorio y

3) Finalmente, existe la teoría de que las MSCs proceden de células de los vasos sanguíneos.

Los tejidos más utilizados actualmente como posible alternativa terapéutica son:

a. Médula ósea. El primer tejido del que se obtuvieron las MSCs fue la médula ósea, en la que estas células se encuentran formando parte del estroma proporcionando soporte estructural y funcional (Nardi y Da-Silva, 2006). Sin embargo, presentan serias limitaciones como son:

1) la utilización de un método invasivo para su obtención

2) las diferentes capacidades de diferenciación de estas células en función de la edad del paciente del que han sido obtenidas

3) el escaso número de MSCs obtenidas puesto que se estima que hay 1 célula madre por cada 10000 células nucleadas del tejido y

4) el descenso de células obtenidas en función de la edad, en el nacimiento se estima 1 de cada 10000 células, en adolescentes 1 de 100000 células, a los 30 años 1 en 250000 células, a los 50 años 1 en 400000 células, y a los 80 años 1 en 2 millones de células. A pesar de ello, de sus limitaciones son consideradas de gran utilidad para la terapia de enfermedades degenerativas (Kassen y Abdallah, 2008; Kern y cols., 2006; Vater y cols., 2011).

b. Sangre de cordón umbilical. La sangre de cordón es una de las fuentes más utilizadas para la obtención de MSCs fundamentalmente debido a la creación de los

bancos de sangre de cordón umbilical (SCU), que han generado la posibilidad de almacenar estas muestras para su futura utilización autóloga. A pesar de la ventaja que supone las técnicas menos invasivas utilizadas y de que presentan una capacidad osteogénica del 100%, la eficiencia de obtención es tan solo del 30-35% (Wexler y cols., 2003; Wagner y cols., 2005) y no pueden diferenciarse a linaje adipogénico (Kern y cols., 2006).

c. Tejido adiposo. Los tejidos adiposos obtenidos a partir de liposucción han sido aceptados como una fuente eficiente de células madre mesenquimales adultas, que se han denominado como células madre/estromales adiposas (ASCs) y que hoy poseen una amplia gama de propuestas para su utilización en reparación y regeneración tisular (Zuk, 2010). Este hecho responde a que las células madre de tejido graso cumplen todos los criterios para una aplicación en procesos de regeneración: i) Se encuentran en cantidades abundantes en el tejido de origen y además su obtención mediante la aspiración (liposucción), posee una ventaja social, ya que es mejor aceptado socialmente que la de la médula ósea (Leong y cols., 2006; De Ugarte y cols., 2003). Como describen Spitkovsky y Hescheler (2008), el lipoaspirado subcutáneo contiene un 2% de este tipo celular lo que supone 1 millón de células madre en 200 ml de aspirado (40 veces más que en médula ósea), que se caracterizan por presentar los marcadores de membrana CD29, CD44, CD90, CD13, y CD105, y ser negativas, o presentar bajos niveles de expresión de CD34, CD45, CD31, y CD106 (Zeng y cols., 2013); ii) Pueden ser obtenidas por procedimientos poco invasivos y aisladas con facilidad (Londoño y cols., 2008; Londoño y cols., 2007); iii) Pueden ser diferenciadas a múltiples linajes celulares de forma reproducible (Rebelatto y cols., 2008); de hecho se ha comprobado su capacidad para diferenciarse hacia linajes tales como adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico (Leong y cols., 2006; Guilak y cols., 2010) y; iv) Pueden ser segura y eficazmente trasplantadas a un huésped autólogo o alogénico (Gimble y cols., 2007).

Estudios basados en la comparación de MSCs obtenidas a partir de médula ósea, de la sangre de cordón umbilical y a partir de tejido adiposo, han demostrado que la morfología y el análisis por citometría de flujo así como un alto potencial de diferenciación, no mostrando diferencias significativas *in vitro*. Sin embargo, la tasa

de aislamiento de las MSCs de la sangre del cordón umbilical representa un tercio de las obtenidas en médula y tejido adiposo. (Rebelatto y cols., 2008). Varios estudios describen que la capacidad de proliferación parece ser mayor en las MSCs derivadas de tejido adiposo que en las MSCs obtenidas a partir de médula ósea, y estas a su vez que las obtenidas de cordón (Rebelatto y cols., 2008; Choudhery y cols., 2013). Las MSCs derivadas de tejido adiposo alcanzaban el doble de su población a las 45.2 horas. Del mismo modo, se percibió y describió que esta duplicidad de población celular dependía y variaba en función de la región corporal de la que se obtenía la grasa (subcutánea o visceral), del tipo del tejido adiposo (blanco o marrón), de la edad de los sujetos donantes de tejido adiposo, del proceso de extracción del tejido empleado, de las condiciones de cultivo y de la densidad del cultivo celular utilizada (Mizuno y cols., 2012).

Investigadores como Cheng y cols. (2011), afirman que existen diversos factores a tener en cuenta para poder estimar e incrementar la velocidad de expansión y crecimiento así como la capacidad de diferenciación de las MSCs derivadas de tejido adiposo. Estos factores son: edad del donante, el tipo de tejido graso obtenido (tejido adiposo blanco o marrón), la localización del tejido adiposo (visceral o subcutáneo), el procedimiento quirúrgico llevado a cabo, las condiciones de cultivo, la densidad celular que se siembra y el medio de cultivo que se emplea durante la expansión del cultivo celular.

1.4 APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS.

El uso de las células madre representa una opción innovadora que promete resolver muchos de los problemas clínicos actuales asegurando un suficiente número de células específicas del tejido para el paciente. A pesar de los avances en los últimos años en su conocimiento, su aplicación clínica como elementos de terapia celular es limitada.

La utilización de células madre adultas, a diferencia de lo que ocurre con las células madre embrionarias, no inducen rechazo por parte del paciente y parecen no tener tanto riesgo de producir tumores (Ringe y cols., 2002). Estos hechos han sido decisivos para el inicio de los primeros ensayos clínicos. Estos ensayos se

han centrado básicamente en dos objetivos, i) por una parte, y gracias a su potencial de diferenciación, diseñar estrategias que permitan regenerar tejidos destruidos o dañados, de los que los ejemplos más representativos han sido las enfermedades neurodegenerativas, la diabetes o la patología cardíaca; ii) por otra parte, las células madre adultas están siendo utilizadas como vehículo terapéutico de genes, un clásico ejemplo es la hemofilia, o incluso como vehículo de terapias antitumorales o antiangiogénicas (Prósper y cols., 2006). La capacidad de estas células para regenerar tejido o transportar elementos terapéuticos ha hecho que puedan ser utilizadas en la mayoría de los campos de la patología, incluyendo las lesiones del aparato musculoesquelético. De hecho, este tipo celular ha sido probado en diferentes ensayos clínicos aunque con resultados no totalmente satisfactorios (Tabla 1).

Tabla 1. Ensayos clínicos (ejemplo) realizados con MSCs sobre una amplia variedad de patología que afectan a diferentes tejidos.

ENFERMEDAD	FASE	NÚMERO DE PACIENTES	REFERENCIA
Cirrosis hepática	I / II	8	Kharaziha y cols., 2009
Lupus eritematoso sistémico	I	2	Carrion y cols., 2010
Esclerosis múltiple	I	3	Riordan y cols., 2009
Enfermedad de Chron	II	14	Garcia-Olmo y cols., 2009
Infarto de miocardio	I	69	Chen y cols., 2004
osteogenesis imperfecta	I	3	Horwitz y cols., 1999
Lesión patelar	I	2	Wakitani y cols., 2004
Enfermedad de injerto contra huésped	I	20	Baron y cols., 2010
Lesión cardíaca	I	1	Zeinaloo y cols., 2011
Transplante de células hematopoyéticas	I / II	15	Macmillan y cols., 2009
Transplante de células hematopoyéticas	I	10	Ning y cols., 2008
Transplante de células hematopoyéticas	I	46	Lazarus et al., 2005

Esclerosis múltiple	I	10	Yamout y cols., 2010
---------------------	---	----	----------------------

En la actualidad, son muy numerosos los ensayos clínicos que se están llevando a cabo con MSCs, que están en fase de desarrollo y de los que será previsible obtener los resultados a corto plazo (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayos clínicos realizados con MSCs y con resultados esperables en los próximos años.

AÑO/REF.	PATOLOGÍA	NOMBRE ESTUDIO	PROMOTOR
2015 -005140-33	Prostactectomia/ Impotencia	Fat Derived Stem Cells (SVF) be Used in the Treatment of Erectile Dysfunction After Prostatectomy-randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial	Odense Universitets Hospital
2015 -005580-16	Diabetes	A Phase 1b, open label, uncontrolled non-randomised single dose study to examine the safety of topically applied bone marrow derived allogeneic mesenchymal stromal cells	Steno Diabetes Center A/S
2015 -000137-78	Esclerosis múltiple	Randomised, double-blind, cross-over phase II study with intravenous autologous mesenchymal stem cells vs. placebo for multiple sclerosis patients in Austria	SALK - Gemeinnützige Salzburger Landeskliniken Betriebsges.
2015 -005717-80	Lesión de medulla espinal	linical trial of phase 1/2 to evaluate the feasibility, safety, tolerability and preliminary efficacy of the administration of FAB117-HC	Ferrer Internacional S.A
2015	Isquemia cardíaca	Allogeneic adipose	Department of

-001560-19		tissue-derived stromal/stem cell therapy in patients with ischemic heart disease and heart failure	Cardiology, Rigshospitalet
2015 -004359-18	Estenosis laringea	RegenVOX: Phase I/IIa clinical trial of stem cell based tissue engineered partial laryngeal implants in adult patients with end-stage laryngotracheal stenosis with 24 months follow-up	University College London (UCL)
2015 -002929-19	Isquemia cardiaca	Stem Cell therapy in IschEmic Non-treatable Cardiac disease -	Department of Cardiology, Rigshospitalet
2014 -000510-59	Hipoplasia de mama	Fat transplantation enriched with ex vivo expanded adipose-derived autologous mesenchymal stem cells in reconstruction of the breast.	Breast Surgery & Burns
2014 -003561-15	Transplante de Hígado	Safety and Tolerance of Immunomodulating Therapy with Donor-specific Mesenchymal Stem Cells in Pediatric Living-Donor Liver Transplantation	University Hospital of Tuebingen
2014 -004349-29	Cáncer orofaríngeo	Mesenchymal stem cells for radiation-induced xerostomia (MESRIX) in previous HPV-positive oropharyngeal head and neck cancer patients	Rigshospitalet

En este contexto, las enfermedades osteodegenerativas como la osteoporosis, la artritis y las lesiones de los discos articulares o intervertebrales así como las patologías derivadas de los traumatismos por accidente que generan lesiones con grandes pérdidas de fragmentos óseos, representa un grave problema de salud,

con un tratamiento de alto coste económico que en la mayoría de los casos no suele ser efectivo. Los procedimientos clínicos basados en trasplante presentan alta morbilidad para el donante en el caso de los autoinjertos o generan rechazo inmune o baja capacidad regenerativa, en el caso de los aloinjertos o xenoinjertos. Sin embargo, está ampliamente demostrado que el propio organismo tiene una importante capacidad de reconstruir huesos, cartílagos y tendones dañados. Hoy sabemos que esta capacidad se debe a la actividad de las células madre adultas presentes en las estructuras lesionadas, de las que se siguen investigando su origen, su fenotipo y los factores que las gobiernan. Una posibilidad es la reparación a través de la utilización de células madre con capacidad de diferenciarse hacia tejidos de estirpe mesenquimal como hueso o cartílago. Entre ellas, las células madre mesenquimales adultas obtenidas a partir de médula ósea, de grasa e incluso de otros tejidos, han conseguido proliferar extensamente *in vitro* sin perder su capacidad de diferenciarse hacia osteocitos o condrocitos según las condiciones en las que se cultivan. Así, diferentes experiencias demuestran como la exposición a dexametasona genera cambios en la expresión génica promoviendo la osteogénesis, el β -glicerol fosfato da un soporte a la osteogénesis mediante el control de la mineralización y los fosfatos libres pueden inducir la expresión de mRNA y proteínas osteogénicas tales como la osteopontina. Otros agentes como el ácido ascórbico incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina y promueve la producción de osteocalcina incrementando la síntesis de proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea hasta formar los osteocitos maduros (Figura 6) (Tuli y cols., 2003; Kotobuki y cols., 2004.). Aunque se sigue investigando sobre la forma de inducir la diferenciación osteogénica de estas células madre adultas, hay ya evidencias *in vivo* de que su utilización es capaz de reparar lesiones óseas extensas especialmente cuando se utiliza algún tipo de soporte. De hecho, se ha comprobado que su diferenciación sobre hidroxiapatita no altera su estabilidad cromosómica y conlleva expresión de genes que indican un compromiso osteogénico (Gardin y cols., 2012).

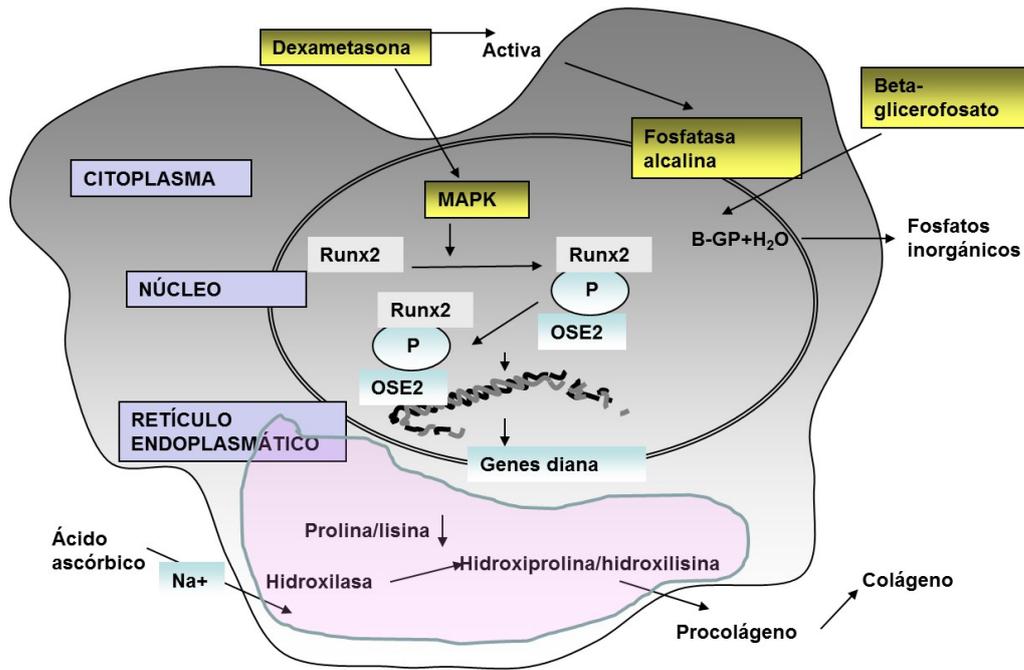


Figura 6. Proceso molecular de diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales. La regulación y expresión de los genes de colágeno tipo I, RunX2 y osteopontina, entre otros, son esenciales en el proceso de diferenciación osteogénica.

Numerosos estudios *in vivo*, han demostrado que la regeneración ósea con MSCs es factible. En este tipo de regeneración, las MSCs pueden ser administradas de forma intravenosa o pueden ser directamente implantadas en la zona en la que se encuentra el defecto óseo (Gazit y cols., 2011). El ensayo en ratones con necrosis en la cabeza femoral avascular demostró que la inyección intravenosa de MSCs inducía su diferenciación osteogénica por producción de los marcadores específicos Osteopontina y BMP, dando lugar a la regeneración ósea. Además, la producción de VEGF mejoró la vascularización (Liao y cols., 2013).

Resultados alentadores se consiguieron tras la inyección de MSCs en un feto con osteogénesis imperfecta (Lafforgue, 2010). En 2002, Wakitani y cols., realizaron un ensayo con 24 pacientes con rodillas osteoartrosíticas con anterior osteotomía tibial alta. De los 24 pacientes, 12 fueron usados como control, y a los otros 12 pacientes se les inyectó las MSCs suspendidas en gel de colágeno en el defecto articular del cóndilo femoral. Aunque el examen artroscópico reveló mejores

resultados en los sujetos tratados en comparación con los controles, dichos resultados no fueron clínicamente significativos. Sin embargo, en 2004, el mismo grupo de investigación realizó más estudios, examinando los beneficios clínicos 6 meses después del trasplante. En este tiempo los resultados fueron satisfactorios según las mejoras en el dolor y la movilidad, corroboradas por hallazgos artroscópicos de reparación mejorada del cartílago por MSCs trasplantadas (Wakitani y cols., 2004). Similares resultados de regeneración fueron observados en el ensayo clínico de Pak, 2011. hASCs, obtenidas de liposucción de los propios pacientes con osteoartritis, fueron trasplantadas en la articulación lateral y medial de dichos pacientes. Tras 12 semanas se observó mediante resonancia magnética un aumento significativo del grosor del cartílago del menisco situado en las articulaciones de la rodilla, acompañado de más del 90% de mejoría en el dolor.

Por otra parte, las patologías del músculo esquelético pueden haber encontrado una nueva vía de tratamiento a través de las células madre adultas y también en sus posibles progenitoras (Qu-Petersen y cols., 2002; LaBarge y Blau, 2002), células que son especialmente interesantes no sólo por contribuir a la regeneración de las fibras musculares, sino por ser capaces también de diferenciarse hacia osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Pero una nueva estrategia terapéutica es la utilización de células madre adultas de otro tejido, como el adiposo, para diferenciarlas a células con fenotipo muscular que puedan ser usadas para tratar las lesiones musculares que conducen a una pérdida funcional parcial o completa (Prósper y cols., 2006). Estas células, co-cultivadas con mioblastos de músculo esquelético o en condiciones especiales de suero en el medio de crecimiento son capaces de sufrir una fusión espontánea formando miotubos (Mizuno, 2010). En este proceso, los niveles de hipoxia parecen ser determinantes no sólo para la diferenciación hacia la estirpe miogénica sino también para la osteogénica y adipogénica (Lee y Kemp, 2006). El ejemplo más característico de esta aplicación se encuentra en el esfuerzo de muchos investigadores para corregir miopatías congénitas tales como la distrofia muscular de Duchenne, enfermedad en la que la ausencia de expresión de distrofina, conduce a una destrucción crónica del tejido muscular que las células satélites propias del enfermo son incapaces de regenerar. El uso de modelos experimentales de esta enfermedad en ratones mdx1 (ratones transgénicos deficientes en distrofina) ha podido demostrar que las células madre

obtenidas de grasa contribuyen a formar fibras musculares con expresión de distrofina.

Además, Zambon y cols. (2014) ha demostrado la capacidad de las MSCs para regenerar el músculo liso de la pared de la vejiga urinaria en modelos de conejo, cuando son implantadas en la submucosa. Similares resultados han sido mostrados tras trasplantar hASCs en ratones con distrofia. La expresión de distrofina fue aumentando con el tiempo hasta encontrarse en el 50% de las miofibrillas analizadas. Además la distrofina se encontró bien distribuida por las fibras musculares, sugiriendo migraciones desde la zona del trasplante hacia otras con daño muscular no trasplantadas (Rodríguez y cols., 2005). Choi y cols., 2010, indujo la diferenciación de las hASCs a tejido muscular cardíaco mediante su co-cultivo con cardiomiocitos de rata (rCM). Tras 6 semanas de cultivo, dichas hASCs fueron diferenciadas a cardiomiocitos (hASCs-rCM), células de músculo liso y adipocitos, observándose también estructuras vasculares. Dichas hASCs-rCM presentaron mayor número de contracciones y de volumen vascular que los cultivos aislados de rCM. En el estudio *in vivo*, dichas hASCs-rCM demostraron su alta plasticidad para diferenciarse a tejido cardíaco, contribuyendo además a la vascularización y promoviendo el crecimiento de nuevo tejido cardíaco. Quedan todavía por resolver los problemas de la baja supervivencia de las células una vez implantadas a pesar de que el implante se realice directamente en el músculo (Mizuno, 2010).

1.5. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS ASCs.

La diferenciación osteogénica (Figura 7) *in vitro* de las ASCs necesita de un medio de cultivo base suplementado con dexametasona, ascorbato, β -glicerofosfato y 10% de suero bovino fetal (Yamaguchi, 2014).

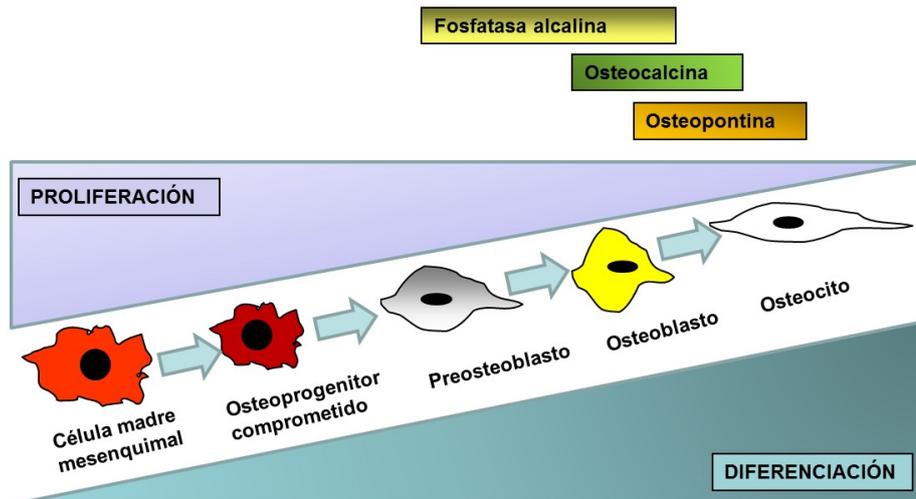


Figura 7. Esquema representativo de los diferentes pasos y diferentes tipos celulares que aparecen en el proceso de diferenciación osteogénica a partir de las MSCs y su relación con el proceso de diferenciación y proliferación celular.

La dexametasona, potente glucocorticoide sintético, actúa como antiinflamatorio e inmunosupresor y promueve la diferenciación de las MSCs *in vitro*, a concentraciones fisiológicas, regulando la fosforilación de una serina de la proteína Runx2, que a su vez regula la expresión y activación de los genes de osteocalcina y xialoproteína y aumentando la fosfatasa alcalina y las acumulaciones de calcio (Phillips y cols., 2006). También ha sido demostrada su actividad en el proceso de diferenciación adipogénica de las MSCs, actuando en este caso sobre el factor de transcripción C/EBP (Rosen, 2005). El β -glicerofosfato, es un sustrato de la fosfatasa alcalina ósea localizada en las vesículas de la matriz extracelular, por ello estimula la mineralización de estas vesículas, fundamental en el proceso de osteogénesis. La fosfatasa alcalina hidroliza fosfatos orgánicos a inorgánicos que posteriormente se transformarán en cristales de hidroxapatita (Hamade y cols., 2003). El ácido ascórbico, estimula la hidroxilación de aminoácidos y el procesamiento de procolágeno puesto que es necesario para que las hidroxilasas catalicen la hidroxilación de los residuos de lisina y prolina necesaria para la síntesis de colágeno. Finalmente, se ha comprobado que el suero bovino fetal induce la diferenciación osteogénica, en comparación con el uso de suero humano o un medio libre de suero, lo cuales están relacionados con una mayor diferenciación adipogénica (Lindroos y cols., 2010). La utilización de estos factores de inducción de

la osteogénesis produce la transformación de las ASCs en osteoblastos, que producen matriz extracelular compuesta principalmente por colágeno tipo I y osteocalcina, y en estadios más avanzados forman depósitos de calcio, los cuales pueden ser detectados por técnicas como la tinción con alizarina roja (Park y cols., 2016). Durante esta diferenciación también se aprecia un aumento en la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) y osteopontina, marcadores de uso general en la fase terminal de diferenciación (Lindroos, 2011; Lindroos, 2010).

Existen otros métodos para inducir los procesos de diferenciación osteogénica de las hASCs. Un ejemplo son los geles de fibrina, en los que se ha demostrado la potenciación de la proliferación de las hASCs bajo condiciones severas de hipoxia (Weijers y cols., 2011). Otros estudios con soportes de fosfato de calcio bifásico (BCP) permiten la adhesión, la proliferación y la diferenciación osteogénica de las MSCs y hASCs (Guha y cols., 2009; Vats y cols., 2005; van Esterik y cols., 2016). En el estudio de diferenciación de hASCs a linaje osteogénico de van Esterik y cols. (2016), se comparó dos BCP a distintas proporciones de hidroxiapatita (HA) and β -fosfato de tricalcio (β -TCP), BCP60/40 and BCP20/80, entre ellos y respecto a geles de fibrina. En ambos soporte la adhesión y proliferación celular fue similar, pero BCP20/80 presentó una mayor actividad de ALP, así como un aumento de la expresión génica del marcador de etapa tardía de diferenciación osteogénica dentina de la matriz fosfoproteína ácida 1 (DMP1) y de los marcadores de vascularización CD31 y VEGF189, frente a las hASCs diferenciadas en soporte de BCP60/40 y gel de fibrina. Diversos investigadores apoyan la teoría de que los factores de crecimiento de la familia TGF también juegan un papel fundamental en el proceso de diferenciación de las hASCs hacia células osteogénicas (Alfaro y cols., 2011)

En este sentido, son muchos los investigadores que han analizado las diferencias en el proceso de diferenciación osteogénica de las ASCs en relación a las MSCs obtenidas de médula ósea. Los resultados obtenidos han sido contradictorios puesto que mientras que Rebelatto y cols. (2008) no encuentran diferencias entre ambos tipos celulares, autores como Shafiee y cols. (2011) afirman que el incremento de la actividad de fosfatasa alcalina y la mineralización conseguida es superior en el proceso de diferenciación a partir de mesenquimales obtenidas de médula ósea. En contraste, estudios realizados con ASCs y MSCs

obtenidas de médula de conejo indican que independientemente de la capacidad de diferenciación de cada una de las líneas, el proceso de regeneración ósea es similar en ambos casos (Han y cols., 2014). Estos mismos autores, destacan la capacidad de las ASCs para expresar colágeno, osteopontina, osteocalcina y BMP-2, proteínas que serían las responsables de contrarrestar la menor capacidad de diferenciación osteogénica de estas células en relación a las obtenidas de médula ósea, asegurando su potencial terapéutico en la regeneración ósea.

Por último, también se ha investigado presencia de ASCs y su capacidad de diferenciación osteogénica en función del tipo de grasa, la zona de obtención o del estado metabólico del donante (Leiva y cols., 2015). En relación al tipo de grasa utilizada, autores como Locke y cols. (2011) y Zimmerlin y cols. (2010) sugieren el origen y la localización de las células madre derivadas de tejido adiposo en el espacio perivascular del tejido adiposo blanco. En relación al potencial de diferenciación de los distintos depósitos de grasas del organismo, la bibliografía no es muy amplia, e incluso los resultados obtenidos son contradictorios (Levi y cols., 2010; Toyoda y cols., 2009), por lo que es necesario realizar mayores estudios sobre las ASCs de los diferentes depósitos para si una fuente específica de grasa es más eficaz en el proceso de regeneración celular. Por último, la edad y estado metabólico del donante también parece ser un elemento fundamental en el proceso de diferenciación, al igual que ocurre con las MSCs obtenidas de otras fuentes, el número de células y la capacidad de diferenciación de las misma disminuye con la edad de los pacientes, observando una relación inversa en la edad del donante y la capacidad osteogénica de las ASCs, con una disminución de marcadores osteogénicos como fosfatasa alcalina o osteocalcina en las células obtenidas de donantes de más de 60 años. Incluso, autores como Aksu y cols. (2008), sugieren que la capacidad de diferenciación osteogénica es superior en el caso de ASCs obtenidas de donantes masculinos que de los femeninos. En relación al estado metabólico, se está analizando la posibilidad de que el índice de masa corporal y el desarrollo del Síndrome Metabólico, que alteran la composición celular como consecuencia del proceso inflamatorio crónico al que están sometidos, pueda modificar el potencial de regeneración ósea de las ASCs obtenidas de estos pacientes (Kokai y cols., 2014; Ouchi y cols., 2011; Samaras y cols., 2009).

1.6. DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS ASCs.

La diferenciación miogénica de las ASCs ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro*. Las condiciones *in vitro* requieren un medio de cultivo base suplementado con hidrocortisona 50 μ M y Suero de Caballo 5% (Li y cols., 2012; Chen y cols., 2004; Wu y cols., 2012; Desai y cols., 2014; Park y cols., 2016). La hidrocortisona es un glucocorticoide necesario para el mantenimiento a largo plazo de los cultivos de las células madre obtenidas de médula ósea. En los cultivos de MSCs, la adición de hidrocortisona al medio reduce la proliferación celular pero aumenta su eficacia para formar clones, siendo este efecto mayor en las muestras de MSCs obtenidas de donantes femeninas. En general, el efecto de los glucocorticoides está íntimamente relacionado con la procedencia sexual de las muestras de MSCs (Shipunova y cols., 2013). Cultivos de MSCs cuyos receptores para glucocorticoides fueron bloqueados, reflejaron un notorio aumento de la proliferación respecto a los cultivos de MSCs sin receptores bloqueados. En relación al proceso de diferenciación, la hidrocortisona inhibe la expresión de marcadores osteogénicos, como son *osteopontina* y *osteocalcina*, aumentando la de marcadores de diferenciación de adipocitos, como son *FABP4* y *PPRAR* (Shipunova y cols., 2013) y de diferenciación miogénica como MRF4, MEF2C, Myf5, MHC (Ramírez-Espinosa y cols., 2016). Otra ventaja que presenta la hidrocortisona con respecto a otros glucocorticoides es que no influye sobre el proceso de inmunomodulación producido por las MSCs (Shipunova y cols., 2013). Una práctica habitual es el uso del suero de caballo para recubrir las superficies de plástico donde crecerán dichos cultivos y potenciar su proliferación y diferenciación a linaje miogénico (Keire y cols., 2013). Así, Yablonka-Reuveni y Seifert, 1993, demostraron el potencial del uso del suero de caballo en la diferenciación de mioblastos primarios de pollo. La utilización de estos factores de inducción de la miogénesis induce la transformación de las hASCs en miocitos, que secretan fibronectina a la matriz extracelular y producen α -actina sarcomérica, desmina, proteína 1 de diferenciación miogénica (MyoD) y cadena de miosina pesada (MHC) (Bitto y cols., 2013; Gurel y cols., 2014; Wu y cols., 2012). En estadios más avanzados producen depósitos lipídicos, detectables por tinción con Oil Red O, un lisocromo lipófilo que tiñe de rojo los lípidos y los aceites minerales (Wu y cols., 2012; Yuan y cols., 2010; Saeyoung-Park, 2016).

Pero además del uso de estos factores, existen otros métodos para favorecer la diferenciación miogénica de las hASCs. Por ejemplo, la 5-azacitidina, un inhibidor de la ADN metiltransferasa, es capaz de promover en estas células la formación de células multinucleadas y el aumento de expresión de las proteínas específicas de músculo como desmina y cadena pesada de miosina (MHC) (Kazama y cols., 2008). Recientemente se ha comprobado que el estradiol aumenta la diferenciación miogénica de las hASCs induciendo la expresión de los marcadores α -actina sarcomérica, calponina y MHC (Feng y cols., 2016). Por otra parte, el uso de co-cultivos de las ASCs con mioblastos primarios refuerza la diferenciación miogénica. Así, Di Rocco y cols. (2006), comprobó como el potencial de diferenciación miogénica entre las hASCs co-cultivadas con mioblastos primarios mejora la diferenciación miogénica de estas células.

Parece demostrado que la procedencia de las MSCs influye en su capacidad de diferenciación miogénica. Así, esta capacidad es notablemente mayor en las MSCs procedentes de médula ósea y membrana sinovial (De la Garza-Rodea y cols., 2012). Por otra parte, Stern-Straeter y cols. (2014) realizaron un estudio comparativo entre las MSCs procedentes de médula ósea y las ASCs cultivadas en diferentes medios de diferenciación miogénica. En todos los medios utilizados las ASCs mostraron una mayor proliferación. Sin embargo, en relación a su capacidad de diferenciación hay controversia. Mientras que Bayati y cols. (2013), no han hayado diferencias significativas en el uso de unas u otras, otros autores afirman que las ASCs presentan un mayor potencial de diferenciación miogénica que las MSCs procedentes de médula ósea (Stern-Straeter y cols., 2014) y de membrana sinovial (De la Garza-Rodea y cols., 2012). La expresión génica de marcadores específicos musculares como MYH8, MYH1 y α -actina sacomérica, al igual que la proteína desmina, han sido detectados en ASCs sometidas a diferenciación miogénica, pero no en MSCs sometidas a las mismas condiciones (Stern-Straeter y cols., 2014).

1.7. EFECTOS INMUNOMODULADORES DE LAS MSCs.

Además de su evidente función regenerativa, las MSCs son especialmente importantes por sus propiedades inmunomoduladoras debido a la pérdida de expresión de la mayoría de los complejos de histocompatibilidad de clase II (Al Battah y cols., 2011) (Figura 8). Estas células son capaces de modular respuestas de inmunidad a través de la producción de células reguladoras T (Tregs), células que expresan los marcadores CD4, CD25 y el factor de transcripción (Foxp3), y que juegan un papel fundamental en la protección autoinmune debido a su capacidad inmunosupresora (Brady y cols., 2014). Para desarrollar esta función, las MSCs deben ser estimuladas mediante mediadores inflamatorios liberados por células inmunes activadas. Las moléculas de Interferon-gamma (IFN γ), interleukina-1-beta (IL1 β) y el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) jugarían un papel importante en estos procesos (Cho y cols., 2014).

En este sentido, las MSCs han mostrado actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos una vez han sido activadas con citocinas inflamatorias (De la Rosa y cols., 2012). Además, han sido usadas para tratar enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades de injerto contra huésped (Mizuno y cols., 2012). En este sentido, las MSCs pueden ser usadas para transplantes alogénicos ya que reducen las complicaciones de origen inmunológico debido a sus ventajas incluyendo efectos inmunomoduladores e inmunosupresores de la respuesta del huésped. Así, estas células son hipo-inmunogénicas pudiendo eludir el sistema inmune del huésped. Las MSCs expresan de forma variable en su superficie el Complejo de Histocompatibilidad Clase I (MHC Clas I). Sin embargo, estas células no expresan el Complejo de Histocompatibilidad Clase II (MHC Clas II) lo que les permite escapar del reconocimiento de células CD4+ y células T del huésped.

Parece que las MSCs pueden interactuar directamente con las células del sistema inmune del huésped modulando e incluso suprimiendo su aloreactividad. Así, estudios *in vitro* muestran que las MSCs inhiben la proliferación de las células T ya que al no mostrar expresión de los marcadores CD40, CD80 y CD86 probablemente no activan la aloreactividad de las células T. También se ha descrito

que las MSCs son capaces de crear un microambientes inmunosupresor a nivel local mediante la secreción de factores solubles como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β 1), la interleucina 10 (IL-10) y la prostaglandina E2. Además, se ha detectado que las MSCs pueden reaccionar con varios tipos de células del sistema inmune, alterar la respuesta inmune y transformar la respuesta pro-inflamatoria hasta conducirla a una respuesta anti-inflamatoria. El mecanismo de acción (Figura 8), probablemente consista en inhibir las citoquinas responsables de desarrollar la respuesta pro-inflamatoria (INF- γ y TNF- α), y producir la estimulación de citoquinas inmunosupresoras (IL-10 y la prostaglandina E2).

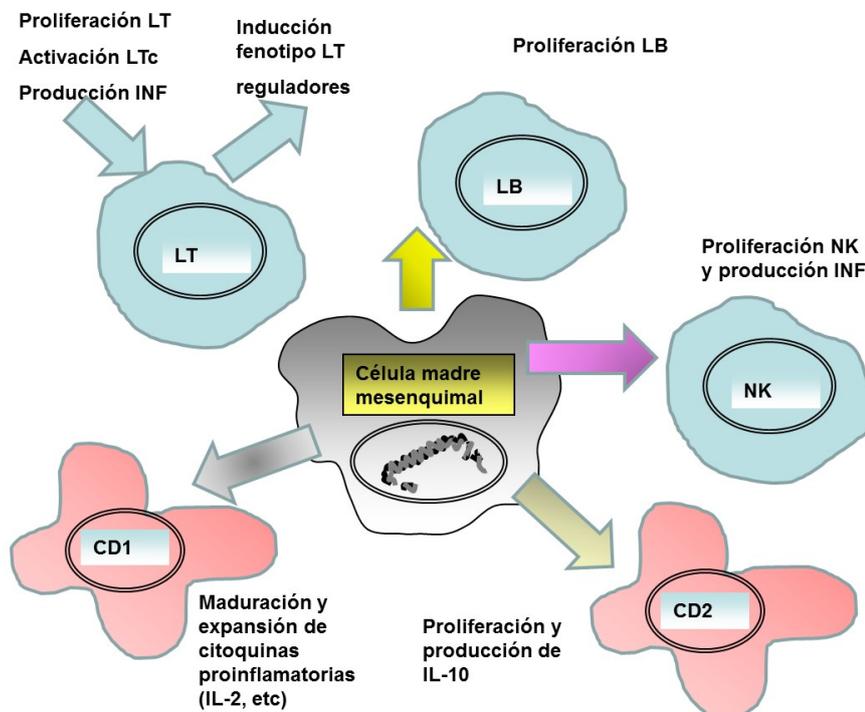


Figura 8. Esquema representativo del efecto inmunomodulador de las MSCs (modificada de Rasmusson, 2006).

Por tanto, las MSCs se presentan como un tipo celular cuyas propiedades inmunosupresoras e inmunomoduladoras pueden ser usadas *in vivo* para mejorar los injertos de otros tejidos, hacer prevención profiláctica o incluso como posible tratamiento en aquellos casos en los que existe un rechazo por parte de huésped, promoviendo el éxito del trasplante y garantizando la supervivencia del paciente.

2. EL TEJIDO ÓSEO.

El tejido óseo que constituye el esqueleto del cuerpo humano, es un tejido conectivo denso especializado de gran resistencia y dureza que actúa como palanca de inserción de músculos y ligamentos, como sistema de protección de estructuras internas y como reservorio de sales minerales como calcio y fósforo.

El tejido óseo está constituido por elementos celulares y una matriz extracelular caracterizada por su alto grado de mineralización (Tabla 3).

Tabla 3. Elementos constitutivos del tejido óseo.

Elementos celulares	Matriz extracelular (componentes)	
	Orgánicos	Inorgánico
Osteoprogenitoras Osteoblastos Osteocitos Osteoclastos	Colágeno tipo I, IV, XIII, XIV Osteonectina Osteopontina Fosfatasa Alcalina Fibronectina Vitronectina Trombospondina Proteína Sialica del hueso Osteocalcina Proteína S Fibromodulina Biglican Modulina	Calcio Fósforo

2.1. CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO.

El tejido óseo está constituido por 4 tipos de células (Figura 9):

Osteoprogenitoras: Son células indiferenciadas con carácter de fibroblasto. Son consideradas como las células madre del hueso y tienen la capacidad de proliferar, diferenciarse hasta osteoblastos y secretar matriz ósea. En el hueso en crecimiento activo, estas células se encuentran en la parte interna del periostio, en el

endostio y en los canales perforantes y de Havers. Son células con núcleos ovalados voluminosos, con escaso citoplasma, retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgy y abundantes ribosomas libres. (Ros y Pawlina, 2013).

Osteoblastos: Son las células encargadas de secretar la matriz ósea (osteóide). Secretan colágeno tipo I y proteínas de matriz ósea como la osteocalcina y osteonectina (proteínas captadoras de calcio), osteopontina y fosfatasa alcalina. La concentración de osteocalcina y de fosfatasa circulantes son indicadores de la actividad osteoblástica. Al microscopio los osteoblastos activos se reconocen por su estructura en forma de epitelio cúbico o poligonales, y su distribución monoestratificada. Su citoplasma es basófilo debido a la abundancia de retículo endoplasmático rugoso con cisternas dilatadas y gran número de ribosomas, que refleja su función de células sintetizadoras y secretoras de proteínas (Ros y Pawlina, 2013). El complejo de Golgi está desarrollado y tienen numerosas mitocondrias con gránulos de fosfato tricálcico y presentan pequeñas vacuolas de contenido amorfo, inclusiones lipídicas y lisosomas.

Osteocitos: son osteoblastos maduros, inactivos, atrapados en la matriz ósea secretada previamente por el propio osteoblasto. Su función es la de mantener la matriz ósea. Son células alargadas con un núcleo ovoide central, citoplasma basófilo y prolongaciones citoplasmáticas que las relacionan con células vecinas y osteoblastos mediante uniones comunicante. Dichas prolongaciones, se sitúan en estrechos canales denominados canalículos o conductos calcóforos, que les permite comunicarse con otros osteocitos adyacentes. El análisis mediante microscopía electrónica nos permite observar una gran disminución de retículo endoplásmico rugoso y aparato de golgy en relación a los osteoblastos así como un número escaso de mitocondrias y lisosomas.

Osteoclastos: Estas células son fundamentales en el proceso de remodelación ósea, tanto en la etapa de crecimiento como en la de reparación del hueso. Son células grandes multinucleadas, con abundante citoplasma y vacuolas con cristales de hidroxapatita. Se localizan adheridos a la superficie ósea en zonas de reabsorción ósea activa, entre las trabéculas óseas a reabsorber y un capilar. La superficie celular relacionada con las trabéculas, que presenta una forma estriada por la presencia de microvellosidades se sitúa en cavidades lagunas de Howship. Estas

células reabsorben el tejido óseo a través de lisosomas que liberan al medio extracelular enzimas capaces de destruir la matriz del hueso y liberar el calcio. Debido a esta gran cantidad de lisosomas presentan una reacción intensa a la fosfatasa alcalina. (Ros y Pawlina, 2013).

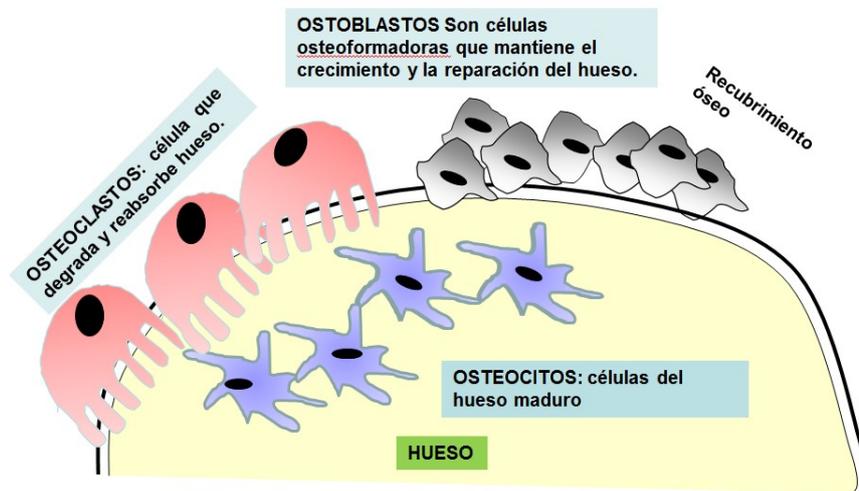


Figura 9. Elementos celulares del tejido óseo. Esquema en el que se observa la disposición de los diferentes elementos celulares que componen el hueso: osteocitos, osteoblastos y osteoclastos.

2.2. MATRIZ DEL TEJIDO ÓSEO.

La matriz ósea está constituida por elementos inorgánicos y orgánicos. Los primeros son depósitos de fosfato cálcico cristalino denominados hidroxiapatita ($[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$) aunque también se pueden encontrar magnesio, sodio, potasio, citrato y carbonato. Los componentes orgánicos están representados por fibras de colágeno que elasticidad y resistencia a las fuerzas de tensión, y glicoproteínas, proteínas gamma-ácido glutámico y proteoglicanos entre las que destacan:

Osteonectina: Es una glicoproteína de 35 KDa, representa el 25% de las proteínas-no-colagenadas y presenta gran afinidad por el colágeno tipo I siendo fundamental en el proceso de mineralización del hueso manteniendo unidas las fibras de colágeno con la porción mineral.

Osteocalcina: Proteína gamma-ácido-glutámico, es un pequeño péptido de 49 aminoácidos sintetizado por los osteoblastos en forma de un precursor denominado pro-osteocalcina bajo el control de la vitamina D. Es considerada como un marcador de diferenciación osteoblástica tardía y de la remodelación ósea. Su estructura es fundamental para establecer uniones con la hidroxiapatita participando en los procesos de movilización y depósitos de calcio.

Ostepontina: Es una glicoproteína que se expresa en las células osteoprogenitoras por lo que es considerado como un marcador de formación temprano de matriz extracelular pero tardío para la diferenciación osteoblástica. Está implicada en la unión de los osteoclastos al hueso y en la mineralización.

Fosfatasa alcalina: Es un enzima que hidroliza el fósforo orgánico liberando fósforo inorgánico que forma la hidroxiapatita del hueso, fundamental en la mineralización de la matriz extracelular. Se considera un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica.

Como hemos indicado anteriormente, la mineralización de la matriz extracelular es la principal característica de tejido óseo puesto que le confiere la dureza y resistencia necesaria para desempeñar su función. Para que se produzca esta mineralización, las concentraciones locales combinadas de iones Ca^{++} e iones PO_4^- deben situarse por encima de un valor umbral. Varios factores influyen para que esto se produzca:

- La osteocalcina y otras silicoproteínas fijan iones de Ca^{++} extracelulares, aumentando su concentración local. Este aumento de concentración Ca^{++} activa la producción de fosfatasa alcalina por parte de los osteoblastos. Esta enzima aumenta la concentración de PO_4^- , que a su vez incrementa la de Ca^{++} .

- El aumento de las concentraciones extracelulares de Ca^{++} y PO_4^- , inducen la producción de vesículas matriciales por parte de los osteoblastos. Estas vesículas contienen las enzimas fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, que libera PO_4^- de otras moléculas de la matriz ósea.

- A continuación se produce la cristalización de CaPO_4 , iniciándose la mineralización de la matriz ósea por formación y precipitación de cristales de hidroxiapatita. Una vez que precipitan estos primeros cristales de hidroxiapatita la

mineralización ocurre rápidamente, extendiéndose por todo el osteoide (Ros y Pawlina, 2013).

2.3. OSIFICACIÓN.

La existencia de dos tipos de formación de hueso solo alude al mecanismo inicial de formación, siendo finalmente el tejido óseo igual en ambos casos.

2.3.1 Osificación Intermembranosa.

El hueso se forma mediante diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos. En la octava semana de gestación, algunas células mesenquimales migran a zonas donde se formará el tejido óseo, diferenciándose en células osteoprogenitoras, y estas a su vez en osteoblastos, iniciándose la formación de la matriz ósea por secreción de colágeno tipo I, osteocalcina y otros componentes. Los osteoblastos atrapados se convierten en osteocitos, y se organizan en láminas concéntricas para formar osteonas (Ros y Pawlina, 2013).

2.3.2. Osificación Endocondral.

Aunque también se inicia con la acumulación de mesenquimales en zonas de formación ósea, estas células van a expresar colágeno tipo II diferenciándose en condroblastos, los cuales formarán una matriz cartilaginosa. El acúmulo de condroblastos forma un rodete que señala el fin de la producción de condroblastos para iniciarse la formación de osteoblastos, procediéndose de igual forma que en la intermembranosa (Ros y Pawlina, 2013).

2.4. REMODELACIÓN ÓSEA.

La regeneración del tejido óseo (Figura 10), es un proceso que se produce periódicamente para reemplazar el hueso dañado o envejecido, que se desarrolla en 4 etapas: activación, resorción, reversión y formación (Montecinos y Zeni, 2009).

• **Activación:** Durante esta fase, por la acción de citoquinas secretadas por las células que tapizan la superficie ósea se produce la diferenciación de precursores osteoclastícos mononucleares, formados a partir de progenitores hematopoyéticos, a preosteoclastos multinucleados. La interacción de los receptores de integrinas de estas células con péptidos de la matriz extracelular permiten delimitar un compartimento denominado laguna de resorción y provoca la polarización de los osteoclastos que emiten prolongaciones que les permitirán secretar elementos para la resorción del tejido óseo.

• **Resorción:** Para que se inicie esta fase es necesario la disminución del pH en la laguna de resorción, proceso que se desencadena por la activación de los canales iónicos y la bomba de protones presentes en la membrana de las prolongaciones de osteoclastos. Paralelamente, el osteoclasto secreta enzimas lisosomales (fosfatasa ácida tartrato resistente, catapaína K, colagenasas) que, a pH ácido degradan los cristales de hidroxapatita y el colágeno formando unas cavidades denominadas lagunas de Howship en el hueso trabecular y túneles cilíndricos en el hueso cortical (Mundy, 1996). La fase finaliza con la apoptosis del osteoclasto.

• **Reversión:** En esta etapa, los osteocitos liberados y los progenitores osteoblastícos ocupan las lagunas de resorción, iniciándose la formación de nuevo hueso. Se desconoce exactamente las señales que provocan el inicio de esta etapa, existiendo dos hipótesis. La primera, implica que los osteoclastos, durante la resorción liberan factores de crecimiento como el TGF β que inducen factores quimiotácticos osteoblastícos estimulando su proliferación y diferenciación. La segunda hipótesis, implica la actuación de los osteoclastos y de los receptores de efrina en el establecimiento de señales bidireccionales entre osteoblastos y osteoclastos (McCormick, 2007).

• **Formación:** Es la etapa más lenta, en la que los osteoblastos sintetizan proteínas de la matriz como colágeno I, osteocalcina, osteonectina e inducen la mineralización liberando vesículas que contienen calcio, fosfato y enzimas que degradan a los inhibidores de la mineralización. Finalmente los osteoblastos quedan incluidos en la matriz y se diferencian hacia osteocitos (Seibel, 2006).

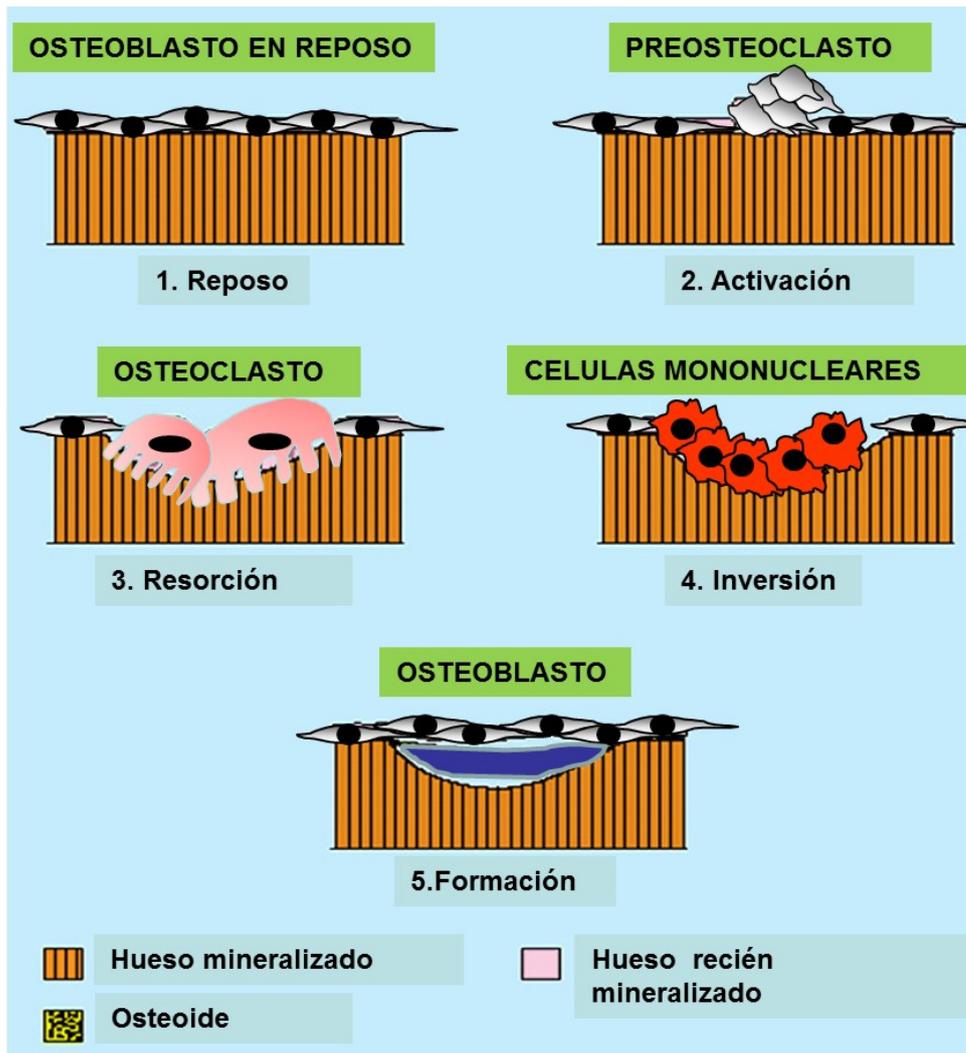


Figura 10. Esquema representativo del proceso de regeneración ósea (modificada de <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-13.-envejecimiento-musculo-esqueletico/13.2-remodelacion-osea>)

3. EL TEJIDO MUSCULAR.

El tejido muscular está constituido por células especializadas en la contracción que presentan en su citoplasma una compleja red de filamentos proteicos que acúan como una auténtica citomusculatura a la que denominamos citoesqueleto celular.

Su función es permitir el movimiento del cuerpo humano, mantener el tono de la pared de órganos internos y vasos sanguíneos y la contracción cardiaca.

Existen dos tipos generales de tejido muscular:

Tejido muscular liso, sus células son fusiformes y mononucleadas y .no presentan estriaciones en su citoplasma al ser observadas al microscopio óptico. Se localiza en las vísceras y los vasos sanguíneos, siendo responsables de los movimientos involuntarios.

Tejido muscular estriado, sus células son multinucleadas y cilíndricas que contienen en su citoplasma gran cantidad de mitocondrias y estriaciones originadas por la organización de sus proteínas contráctiles en bandas. A su vez se puede clasificar en: tejido muscular estriado voluntario o esquelético, que forma parte del aparato locomotor y el tejido muscular estriado involuntario o cardiaco.

3.1. ESTRUCTURA TEJIDO MUSCULAR ESTRIADO.

La fibra muscular, es una célula alargada, con aspecto estriado y múltiples núcleos, en la cual aproximadamente dos tercios de su masa seca están ocupados por una estructura que representa una especialización de este tipo de células: las miofibrillas.

Durante el desarrollo embrionario, los mioblastos, células uninucleares musculares, se fusionan formando las células musculares que constituyen el tejido muscular estriado (Frontera y Ochala, 2015). Estas células plurinucleares reciben el nombre de fibras musculares. Estas fibras, de entre 10-80 μm , están formadas a su vez por subunidades sucesivamente más pequeñas, las miofibrillas, las cuales se extienden por su citoplasma o sarcoplasma. Las miofibrillas son cilindros de 1-2 μm de diámetro que ocupan toda la longitud de la célula, y que presentan prominentes bandas seriadas responsables de la apariencia estriada de la célula muscular (Figura 11). Están formadas por unidades estructurales llamadas sarcómeros que se repiten regularmente, y que se alinean con los sarcómeros de las miofibrillas adyacentes dando a la célula una apariencia estriada con bandas claras y oscuras alternantes. La banda oscura, o banda A, ocupa el centro y tiene una longitud

aproximada de $1.5 \mu\text{m}$. En la parte central de la misma existe una región clara denominada zona H, dividida en dos partes por la línea M. La banda clara o banda I, situada a ambos lados de la banda A, presenta una longitud variable. En el centro de ésta se encuentra una zona oscura denominada línea o disco Z que separa un sarcómero del siguiente.

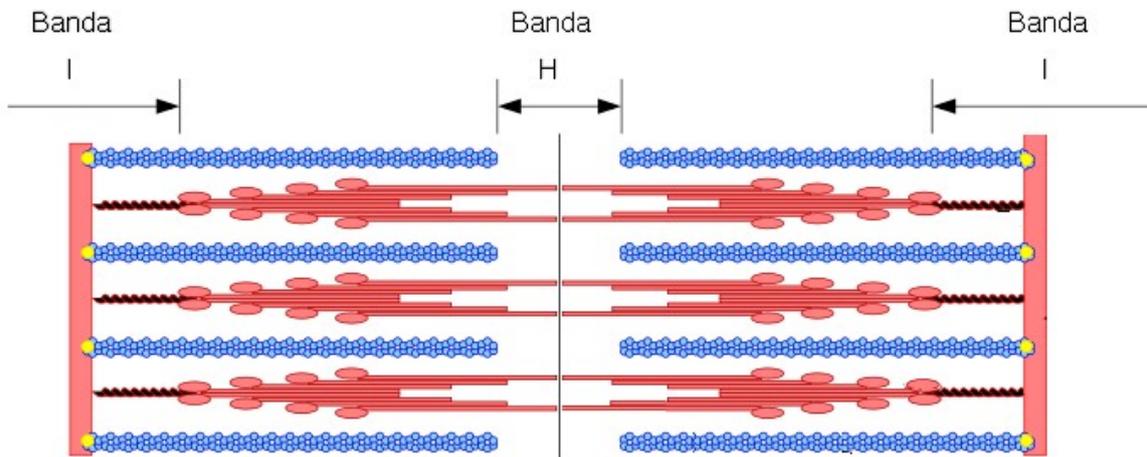


Figura 11. Estructura del sarcómero (Modificada de https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Sarcomere_es.svg.)

En el sarcómero existen dos grupos de filamentos proteicos paralelos y parcialmente superpuestos, los filamentos delgados, isotrópicos y claros y, los filamentos gruesos, anisotrópicos y oscuros. Los filamentos delgados tienen una longitud aproximada de $1.0 \mu\text{m}$ y un diámetro de 8 nm y se extienden desde la línea Z de la banda I hasta la banda A, donde penetran, sin llegar a alcanzar la zona H. Los filamentos gruesos tienen una longitud de $1.6 \mu\text{m}$ y un diámetro de 15 nm y ocupan la banda A de un extremo al otro. Por lo tanto, en la banda A se superponen ambos tipos de filamentos, en la banda I sólo se encuentran los filamentos delgados y en la zona H de la banda A sólo existen filamentos gruesos.

Envolviendo a las miofibrillas encontramos el retículo endoplasmático o sarcoplasmático, que se expande en forma de red desde la zona de unión de las bandas A-I hasta la adyacente. Se forman por tanto dos redes, una que rodea la banda A y la continua que rodea la banda I. En su zona de unión, la banda A-I, forman un conducto llamado cisterna terminal. En esta unión encontramos

invaginaciones del sarcolema que reciben el nombre de túbulos T. Al complejo formado por las dos cisternas terminales contiguas y un túbulo T se denomina tríada. (Ros y Pawlina, 2013). Por último, en la fibra muscular encontramos otro elemento fundamental de su citoesqueleto, los filamentos intermedios, que se disponen en forma de “cesta” alrededor del núcleo.

3.1.1. Proteínas de los filamentos delgados.

Los filamentos delgados están constituidos por tres proteínas, actina, troponina y tropomiosina.

• **Actina:** Es la proteína más abundante en los filamentos delgados, representando más del 20% del total de proteínas de la célula muscular. Está constituida por la polimerización de polipéptidos de actina G de 43 KDa y presenta una estructura en doble cadena enrollada en hélice con entrecruzamientos. Durante la polimerización, el ATP unido a la molécula de actina G es hidrolizado a ADP que permanecerá en la estructura del filamento delgado, siendo fundamental en el proceso de polimerización y despolarización. En su estructura presenta zonas de unión a la tropomiosina y a miosina fundamentales en el proceso de contracción muscular.

• **Troponina:** La troponina junto a la tropomiosina, constituyen aproximadamente un 10% de los filamentos delgados y son las responsables de la regulación, mediada por calcio, de la contracción celular. La troponina, complejo constituido por tres proteínas, troponina C, I y T, es la responsable de captar el calcio necesario para la activación de la miofibrilla. El calcio se une a la troponina C y transporta la señal a la troponina I y T provocando una cascada de cambios en el resto de proteínas que constituyen la miofibrilla que inician el proceso de contracción. Además, las troponinas I y T presenta en su región N-terminal una región de interacción con la actina y tropomiosina respectivamente, que permiten regular la contracción muscular mediada por calcio.

• **Tropomiosina:** Es una proteína muy conservada constituida por dos subunidades que adoptan una estructura secundaria en alfa-hélice. La tropomiosina muscular se une a la actina, y aumenta la sensibilidad al calcio de la actomiosina en presencia de troponina.

3.1.2. Proteínas de los filamentos gruesos.

Los filamentos gruesos están formados básicamente por miosina y alfa-actinina, aunque también contienen pequeñas cantidades de miomesina y titín que unen transversalmente los filamentos gruesos de miosina a nivel de la línea M y conectan los filamentos gruesos con el disco Z.

• **Miosina:** Es una proteína constituida por seis subunidades polipeptídicas: dos cadenas pesadas de 200 KDa y dos pares de cadenas ligeras, de 20 y 16 KDa cada una. Las cadenas pesadas presentan un dominio en su extremo carbono terminal enrollado en hélice que forma la cola del filamento grueso, localizada en el centro del filamento grueso y un dominio del extremo amino terminal que junto con un par de cadenas ligeras distintas, forma la cabeza globular que se orienta hacia el filamento delgado.

• **Alfa-actinina:** Es un homodímero con un peso molecular de 95-100 KDa y una estructura en doble hélice que se localiza en el disco Z. Actúa sobre la interacción entre miosina y actina, induciendo a la actina a adoptar formas globulares y agregados fibrosos y sirviendo como un punto de anclaje o centro de organización para la preformación de filamentos de actina.

3.1.3. Proteínas de los filamentos intermedios.

Los filamentos intermedios forman una red citoplasmática que se dispone formando una especie de "cesta" alrededor del núcleo desde donde se extienden

hacia la periferia celular. La proteína característica de estos filamentos es la desmina estrechamente relacionada la vimentina.

• **Desmina:** Está constituidas por cadenas polipeptídicas que se enrollan entre sí para formar protofilamentos, que son subunidades tetraméricas que se ensamblan par formar filamentos de 10 nm de diámetro. Se localiza en la línea Z, en los espacios entre las líneas Z de miofibrillas adyacentes y en los espacios comprendidos entre la miofibrilla y la membrana plasmática, asociada en este caso a los desmosomas que permiten la unión entre células adyacentes en el tejido muscular. Su función es aportar soporte a la célula muscular manteniendo unidas miofibrillas adyacentes con la membrana plasmática.

• **Vimentina:** Al igual que la desmina las cadenas polipeptídicas que la constituyen se enrollan para formar subunidades tetraméricas que se ensamblan espontáneamente para formar filamentos. Se distribuye en la región central del citoplasma alrededor de la membrana nuclear desempeñando un papel de soporte mecánico del núcleo.

3.3. CONTRACCIÓN MUSCULAR.

La iniciación y la ejecución de la contracción muscular (Gordon y cols., 2000) se producen según los siguientes pasos secuenciales:

-Un potencial de acción llega al terminal del nervio motor de las fibras musculares, abriéndose los canales de calcio en la membrana presináptica.

-Se produce un aumento de los niveles de Ca^{++} , lo que conlleva la liberación de acetilcolina a la hendidura sináptica.

-La acetilcolina se une a sus receptores nicotínicos en la membrana postsináptica, que corresponde con el sarcolema, induciendo la apertura de los canales de Na^{+} .

-Despolarización local de la membrana que conlleva la transmisión de este potencial de acción por todo el sarcolema, incluyendo los tubos T.

-La despolarización de los tubos T abre los canales de Ca^{++} del retículo sarcoplasmático, aumentándose su concentración en el sarcoplasma.

-El Ca^{++} se une a la troponina dejando libres los centros activos de la actina. Además, este aumento de Ca^{++} activa la ATPasa unida a la cabeza de la miosina.

De esta forma, se inician fuerzas de atracción entre los filamentos de actina y miosina, haciendo que el filamento de actina puede desplazarse a lo largo del de miosina hacia el centro del sarcómero, dando lugar a la contracción muscular. Cuando la fibra muscular se contrae, los filamentos finos se extienden sobre los gruesos, disminuyendo las bandas I y H. La Figura 12 muestra el mecanismo básico de la contracción muscular. Los filamentos de actina, procedentes de dos discos Z sucesivos, son atraídos hacia el interior de la banda A, deslizándose sobre los filamentos de miosina, superponiéndose entre sí. Asimismo, los discos Z han sido atraídos por los filamentos de actina hacia la banda A, acortándose por tanto.

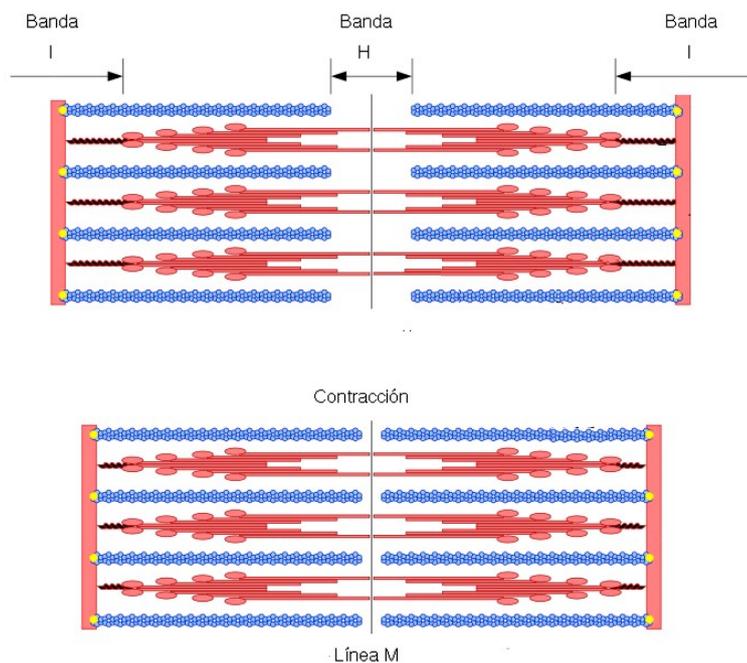


Figura 12. Imagen representativa del proceso de contracción muscular (modificada de <https://es.wikipedia.org>).

Podemos decir que en la contracción muscular, la banda I reduce su grosor, los discos Z se aproximan, pero la banda A no se modifica. Transcurrida una fracción de segundo, los iones calcio son bombeados de nuevo al interior del retículo

sarcoplasmático mediante una bomba de calcio de membrana, donde permanecerán almacenados hasta la llegada de un nuevo potencial de acción al músculo; esta retirada de los iones calcio de las miofibrillas hace que cese la contracción muscular.

4. LA EPIGENÉTICA.

El genoma humano contiene aproximadamente 30.000 genes. Sin embargo, cada tipo de célula sólo expresa una pequeña cantidad de genes necesarios para su funcionamiento adecuado. En eucariotas el ADN es empaquetado como heterocromatina silenciosa y eucromatina activa. La heterocromatina corresponde a la mayor parte del material nuclear muy rico en secuencias repetitivas y generalmente no se transcribe, es la eucromatina la transcripcionalmente activa y la que contiene la mayoría de los genes. Este perfil de expresión génica en respuesta a estímulos ambientales y mecanismos regulatorios a nivel molecular es el epigenoma celular (Espada y Esteller, 2010; Gonzalez y cols, 2011).

El término “Epigenética” fue acuñado originalmente en los años 1940, cuando Conrad Waddington lo empleó para referir *“el estudio de los procesos a través de los cuales los genotipos dan lugar a los fenotipos”* (Waddington, 2012). Actualmente la epigenética se define comúnmente como *“los cambios mitóticos y/o meióticos heredados en el fenotipo o en la expresión genética que no entrañan una modificación en la secuencia del ADN”* (Carén y cols., 2013).

4.1. LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS.

La epigenética consiste en un componente fundamental de regulación de la expresión génica. Los mecanismos tradicionales de regulación epigenética incluyen (Gonzalez y cols., 2011):

- Metilación del ADN
- Modificación de Histonas
- Impronta génica

- Silenciamiento por unión de RNA

Estos mecanismos están interrelacionados y necesitan mantenerse estables durante la división de las células para conservar la identidad celular (Stancheva y Schirmer, 2014).

4.1.1. Metilación del ADN.

La metilación del ADN es el mecanismo epigenético derivado de la actividad de las ADN metiltransferasas (DNMTs) más ampliamente estudiado (Jeronimo y Henrique, 2014). Griffith y Mahler, (1969) ya contemplaron la posibilidad de que la metilación tuviese un papel muy importante en lo referente a la memoria a largo plazo. Desde 1975 (Riggs, 1975) se han propuesto como mecanismos de control génico varios modelos de metilación de ADN aunque, no fue hasta los años 80, cuando existió evidencia empírica (Razin y Riggs, 1980).

La metilación tiene lugar principalmente durante la mitosis celular llevándose a cabo la diferenciación celular, aunque también se han descrito procesos de metilación e incluso de desmetilación en estadios post mitóticos. Esto indicaría que la epigenética de cada célula puede modificarse tanto en cualquier estadio celular (Meserschmidt y cols., 2014).

La inactivación genética, en este tipo de mecanismo consiste en la metilación aberrante de la citosina presente en sitios CpG de las islas CpG de las regiones 5' correspondientes a los promotores génicos. Las islas CpG son regiones de entre 0,5 y 2.0Kb ricas en dinucleótidos CpG, presentes en las regiones reguladoras de aproximadamente la mitad de los genes humanos identificados. La hipometilación de las islas CpG, permite que los factores de transcripción y las polimerasas puedan identificar las señales de inicio de transcripción génica. Por el contrario, la hipermetilación inhibe la acción de los factores de transcripción provocando una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina (Jeronimo y Henrique, 2014). Por tanto, con esta metilación se produce la inhibición de la expresión génica debido al desplazamiento de las uniones habituales de los factores activadores de

transcripción con el ADN. Por otro lado, se produce la atracción de proteínas de unión a citosinas metiladas, lo que conlleva la parada de la transcripción. Atendiendo a los efectos producidos, se puede afirmar que la metilación del ADN implica un silenciamiento génico (Cavagnari, 2012). Cuanto más metilado esté un tramo de ADN, menos probable es que se exprese la información que contiene. La metilación es un mecanismo de defensa de la célula contra la gran cantidad de genes parásitos y defectos que se han acumulado en el ADN a lo largo de la evolución, como si fueran virus informáticos.

La metilación de las islas CpG, tiene lugar por la actuación de las ADN- metiltransferasas (DNMT), que incluyen 5 proteínas: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, y DNMT3L y que catalizan la unión de grupos metilo, cedidos por la coenzima S-adenosil-metionina (SAM), al carbono 5 del anillo de pirimidina de las citosinas, dando un análogo llamado 5'metilcitosina (Jeronimo y Henrique, 2014). Después de donar el grupo metilo, SAM se convierte en S-adenosil homocisteína. Este proceso es unidireccional de forma que la metilación de novo de una secuencia CpG es estable y heredada en las siguientes divisiones celulares. Debido a la estructura que presentan estas islas, 5'CpG3' y su cadena complementaria 5'GpC3', ambas cadenas pueden metilarse, conservándose siempre una cadena metilada original durante la replicación. Además, las enzimas DNMT identifican la secuencia 5'metil – CpG3' y metilan el residuo de citosina de la cadena complementaria, favoreciéndose el traspaso de este estado de metilación a la herencia (Cavagnari, 2012).

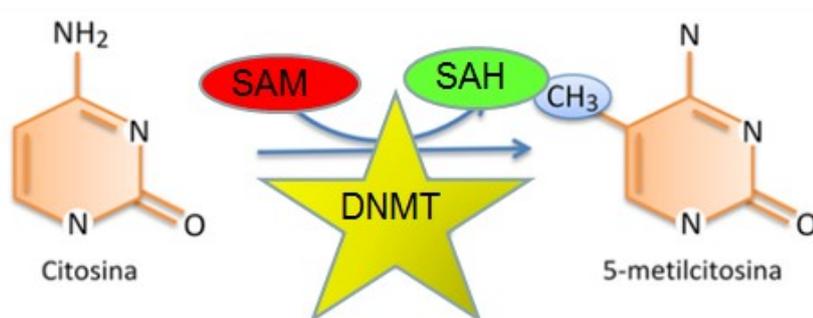


Figura 13. Metilación de la citosina. La metilación del ADN se produce por la adición de un grupo metilo (-CH₃) al quinto átomo de carbono del anillo de citosina (con 6 átomos de carbono), creando la 5-metilcitosina (5mC). Esta modificación covalente se lleva a cabo por un conjunto de enzimas llamadas ADN metiltransferasas. Estas proteínas, detectan citosinas seguidas inmediatamente de guaninas (CpG) y las metilan (modificado de geneticamolecularunlar.wikispaces.com).

Hay dos mecanismos principales por los cuales la metilación bloquea la transcripción:

1) En primer lugar, habría un efecto directo de la formación de las 5 metilcitosina en las islas CpG; estas inhiben la unión de ciertos factores de transcripción en sus sitios de reconocimiento. Por ejemplo, modifica las actividades de unión de factores de transcripción como: E2F, CREB, AP2, cMyc/ Myn y NFκB; aunque otros como SP1 no son inhibidos (Rodríguez-Dorantes y cols., 2004).

2) El segundo involucraría a proteínas o complejos proteicos que se unen específicamente a CpG metilados y bloquean indirectamente la unión de los factores de transcripción al limitar su acceso a los elementos reguladores. Este grupo correspondería a las MBP (Ballestar y Wolffe, 2001). Las proteínas MBP interaccionan con el ADN metilado y los componentes de la cromatina, actuando como mediador, debido a que son capaces de reclutar complejos represores que incluyen a las desacetilasas de histonas (HDAC). Las HDAC eliminan grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 y parece ser que la carga positiva resultante facilita la condensación de la cromatina y limita el acceso de los factores de transcripción a los promotores localizados cerca (Rodríguez-Dorantes y cols., 2004).

Un ejemplo ya bien conocido de MBD es la MeCP2 la cual contiene dos dominios definidos: un dominio de unión a dinucleótidos CpG metilados (MBD), común en todas las proteínas de unión a DNA metilado, y un dominio de represión transcripcional (TRD) (Kaludov y Wolffe 2000; Neissa y Guerrero 2004), implicado en el reclutamiento del correpressor Sin3A e histona desacetiladas, los cuales reprimen

la transcripción. El dominio TRD de MeCP2 reprime la transcripción gracias a la interacción con un componente básico de la maquinaria transcripcional, TFIIB (Kaludov y Wolffe, 2000). De este modo, MeCP reprime la unión de los factores de transcripción (TFII), los factores activadores y las histonas acetiltransferasas (Urduño y cols., 2009). De un modo parecido actuarían MBD1, MBD2 y MBD3.

Existen varios métodos de detección de estos cambios del estado de metilación del ADN, como aquellos basados en la sensibilidad de específicas enzimas de restricción que reconocen secuencias metiladas y desmetiladas, inmunoprecipitación (utilizando la anti-5'-metilcitosina o complejos de enlace de dominio de grupos metilo), secuenciación con bisulfito, microarray, espectrometría de masas, pirosecuenciación, etc (Stevens y cols., 2013; Liloglou y cols., 2014).

4.1.2. Modificaciones de Histonas.

Los nucleosomas son unidades básicas de la cromatina compuestos por 2 vueltas de ADN (147 pb) y un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) (Luger y cols., 1997). Estas biomoléculas dinámicas proporcionan soporte físico al ADN y están implicadas en la regulación transcripcional, la reparación y la replicación (Jeronimo y Henrique, 2014). Dicha interacción entre el ADN y las histonas está regulada por modificaciones en los extremos N-terminales de las histonas (Kouzarides, 2007). El nucleosoma puede encontrarse condensado impidiendo la expresión génica o relajado permitiendo la transcripción. Esa variabilidad en la arquitectura del nucleosoma y su estado de relajación o condensación es regulada por enzimas nucleares (Nikitina y cols., 2013).

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas son diversas, reversibles y están cuidadosamente compensadas por un gran número de enzimas modificantes de histonas (Wilting y Dannenberg, 2012). Las colas de histonas que sobresalen del ADN presentan diversas marcas para permitir las modificaciones bioquímicas post-traduccionales. Estas marcas epigenéticas forman un patrón a lo largo del genoma denominado "El Código de Histonas" (Jeronimo y Henrique, 2014). Actualmente se conoce la existencia de varios tipos de modificaciones de histonas entre los que se incluyen la acetilación, metilación, fosforilación, propionilación, butirilación, N-

formilación, ubiquitinación, sumoilación, citrulinación, prolina isomerización y ADP ribosilación (Wilting y Dannenberg, 2012)

Las características principales de algunos de ellos son: acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación.

• **Acetilación y desacetilación de lisinas.**

La reacción de acetilación de los residuos de lisinas que se encuentran en los extremos de las histonas es catalizada por las lisinas acetiltransferasas (KATs) también conocidas como histonas acetiltransferasas (HATs) (Allis y cols., 2007). Los grupos acetilo neutralizan las cargas positivas de las lisina provocando la disociación del ADN y el nucleosoma. Esto permite el acceso al ADN de los factores de transcripción y de la enzima RNA Polimerasa con la consecuente transcripción del mismo (Wilting and Dannenberg, 2012). _Las HATs se dividen en tres familias: GNAT-, p300/CBP- y MYST, y aunque se encuentran predominante en el núcleo, hay evidencias que sugieren también su localización en el citoplasma (Sadoul y cols., 2011).

Los procesos de acetilación de los residuos de lisinas se ven contrarrestados por las histonas desacetilasas (HDACs) (Allis y cols., 2007), de las que existen 4 tipos se dividen en cuatro familias: HDACs I (HDAC1, 2, 3 y 8), HDACs II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 y 10), HDACs III, que requieren NAD⁺ como cofactor de desacetilación; y HDACs IV (Wilting y Dannenberg, 2012)., las cuales restauran las cargas positivas de los residuos de lisina empaquetando, por tanto, la cromatina y haciendo inaccesible el ADN a los factores de transcripción. La consecuencia final es que las regiones génicas se encuentran transcripcionalmente inactivas.

La manipulación farmacológica de la acetilación de histonas mediante el uso de ácido valproico, butirato sódico y trichostatina A, inhibe el mecanismo de acción de las HDACs. Esta modificación de histonas es dinámica y puede llevar a cabo efectos transcripcionales transitorios y reversibles (Champagne, 2012).

• **Metilación de histonas: metilación de arginina y metilación y desmetilación de lisina.**

La metilación de histonas ocurre tanto en residuos de lisina de los extremos terminales, como en los residuos de arginina de esos mismos extremos. Este mecanismo no modifica la carga de los residuos de estos aminoácidos, pero sí modifican su hidrofobicidad. Además, permite la activación o represión de la transcripcionabilidad en función de si los residuos están modificados o no, y en función de los grupos metilos presentes.

Metilación de Argininas: La reacción de metilación de las argininas de los extremos de las histonas es llevada a cabo por las enzimas arginina metiltransferasas (PRMTs) y por las enzimas lisinas metiltransferasas (KMTs). La familia de las PRMTs está constituida por 11 enzimas, de las cuales PRMT1, 4, 5 y 6 son conocidas como histonas metiltransferasas (Wilting y Dannenberg, 2012).

Metilación y desmetilación de Lisinas: Las reacciones de metilación de lisinas se llevan a cabo de forma predominante en los extremos N-terminales de las histonas y son reguladas por las histonas lisinas metiltransferasas (HMTs/KMTs). Un gran número de estas proteínas se encuentran mutadas, sobre-expresadas o deslocalizadas en algunas enfermedades humanas. Estas reacciones de metilación son contrarrestadas por las histonas lisinas desmetilasas (KDMs), de las cuales se conocen dos familias: KDM1A y KDM1B (Wilting y Dannenberg, 2012). La metilación de arginina tanto en la H3 como en la H4 dirigen al proceso de activación transcripcional; de forma contraria, la metilación de H3K9 se asocia mayormente con la formación de heterocromatina. Se ha observado que la desmetilación de H3K4 por las desmetilasas específicas de lisinas (LSD1 y LSD2) está relacionada con la metilación del ADN dependiente de DNMT3A – DNMT3L (metilasas *de novo*) (Gonzalez y cols., 2011).

• **Fosforilación**

La fosforilación se presenta como un mecanismo regulatorio importante a través de la fosforilación reversible de proteínas, dando lugar a cambios conformacionales que modifican las estructuras de enzimas y receptores, causando su activación o desactivación. La fosforilación es también un proceso importante a través del cual se lleva a cabo la modificación de histonas (Tabla 4). Se encuentra relacionada frecuentemente con la condensación de cromosomas/cromatina, e

incluye procesos de mitosis, meiosis, apoptosis y daño del ADN. Estos procesos son regulados por diferentes histonas quinasas y son críticas para la regulación génica. Es por ello que los defectos que se produzcan en las histonas quinasas presenten un impacto importante en la estabilidad genómica y en la proliferación celular (Nowsheen y cols., 2014).

Tabla 4. Tabla de modificación de histonas por Fosforilación en mamíferos (Obtenida de www.epigentek.com).

Sitio Modificado	Modificación	Enzima Modificadora	Función
Histonas H1			
Ser 27 (H1)	Fosforilación	Desconocida	Activación transcripcional y descondensación de cromatina
Histonas H2A			
Ser 1 (H2A)	Fosforilación	Desconocida, K1	Mitosis, montaje de cromatina y represión transcripcional
Ser139 (Mamíferos H2AX)	Fosforilación	ATR, ATM, ADN-PK	Reparación ADN
Histonas H2B			
Ser14 (Vertebrados)	Fosforilación	Mst1, Desconocido	Apoptosis y reparación ADN
Histonas H3			
Thr3 (H3)	Fosforilación	Haspin/Gsg2	
Ser 10 (H3)	Fosforilación	Aurora-B kinase, MSK1, MSK2, IKK- α , Snf1	Mitosis, meiosis, activación génica temprana, activación transcripcional.
Thr11 (Mamíferos)	Fosforilación	Dlk /	Mitosis
Ser28 (Mamíferos)	Fosforilación	Aurora-B kinase, MSK1, MSK2	Mitosis, activación temprana
Histonas H4			
Ser1 (H4)	Fosforilación	Desconocida, CD2	Mitosis, Montaje de cromatina y reparación ADN

La Ubiquitina es un péptido pequeño de 8.5 kDa que puede actuar como modificador de la función de las proteínas. La ubiquitinación es una modificación

enzimática de proteínas post-traduccionales en las cuales el ácido carboxílico de la glicina terminal del motivo di-glicina de la Ubiquitina activa forma una enlace amino con el amino épsilon de la lisina en la modificación de la proteína (Newsheen y cols., 2014). La ubiquitinación está involucrada en muchos procesos celulares, incluyendo la apoptosis, ciclo y división celular, transcripción y reparación del ADN, diferenciación y desarrollo, repuesta inmune, biogénesis de ribosomas, etc (Tabla 5) (Belogurov y cols., 2014; Kan y cols., 2014; Kato y cols., 2014; Min y cols., 2014; Newsheen y cols., 2014).

Tabla 5. Modificaciones de histonas por Ubiquitinación en mamíferos (obtenida de www.epigentek.com).

Sitio Modificado	Modificación	Enzima Modificadora	Función
Histonas H2A			
Lys119 (Mamíferos)	Ubiquitinación	Ring2	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación transcripción • Reparación ADN • Espermatogénesis
Histonas H2B			
Lys120 (Mamíferos)	Ubiquitinación	UbcH6	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación transcripción • Reparación ADN • Meiosis

4.1.3. Impronta genómica.

El término de impronta genómica es usado habitualmente para referirse al fenómeno donde la expresión del patrón de un alelo depende de su origen parental. En el caso más simple, uno de los dos alelos es silenciado transcripcionalmente mientras que el otro se expresa. Sin embargo, a menudo, algunos genes improntados exhiben patrones complejos. Algunos investigadores utilizan las expresiones de genes maternamente improntados o genes paternamente improntados (Queller, 2003). A pesar del bajo número de genes improntados en el

genoma humano, éstos juegan un papel muy importante en la reproducción y en el desarrollo fetal (Plasschaert y Bartolomei, 2014).

Como ya se ha comentado anteriormente, la impronta genómica se basa en la existencia de modificaciones epigenéticas diferenciales entre los alelos maternos y paternos (Wilkins y Úbeda, 2011). Los genes improntados suelen estar agrupados en cluster de 3-12 genes, que han sufrido modificaciones durante la gametogénesis mediante diferentes señales establecidas en las líneas germinales femeninas o masculinas (Edwards y Ferguson-Smith, 2007). Después de la fertilización, estas señales se propagan a través de las divisiones celulares de forma alelo-específica, permitiendo que la expresión diferencial de un alelo u otro se mantenga durante el desarrollo. A lo largo del desarrollo, principalmente en los primeros estadios, estas señales epigenéticas se encuentran sujetas a modificaciones y reprogramaciones (Plasschaert y Bartolomei, 2014). La activación de alelos normalmente silenciados o el silenciamiento de alelos normalmente activados de un gen improntado ha sido observada en varios estados patológicos (Radford y cols., 2011). Hay evidencias que implican las improntas aberrantes con el desarrollo de algunas patologías (Pozharny y cols., 2010).

4.1.4 Epigenética de las células MSCs.

La aplicación de células MSC en clínica obliga a un profundo estudio de los procedimientos de expansión *in vitro* ya que dichos procesos pueden derivar en cambios no sólo morfológicos sino funcionales que afectan la biología celular induciendo una senescencia (senescencia replicativa de MSCs) (Wagner, 2012). Estos cambios han sido uno de los principales argumentos para potenciar los estudios de estandarización y seguridad en su uso para medicina regenerativa. La epigenética juega un papel esencial en este campo ya que permite detectar alteraciones potenciales del patrón de regulación de MSC durante el cultivo *in vitro* (Figura 12).

Así, cambios epigenéticos en la histona H3 han sido detectados el MSC después de un largo tiempo de cultivo lo que ha estado relacionado con su

envejecimiento afectando a su auto-renovación y diferenciación (especialmente a estirpe osteogénica) (Li y cols., 2011). Otros autores como Jung y cols. (2010) detectan una disminución en la expresión de histonas deacetilasas (HDAC) y de genes como BMI1 y EZH2 que también acompañan a este proceso. Por otra parte, parece que el complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF desempeña un papel clave en MSC de forma que cambios de metilación pueden afectar a la expresión de BRG1, subunidad ATPasa del complejo, induciendo la senescencia de MSCs con supresión de la transcripción de NANOG (Squillaro y cols., 2015).

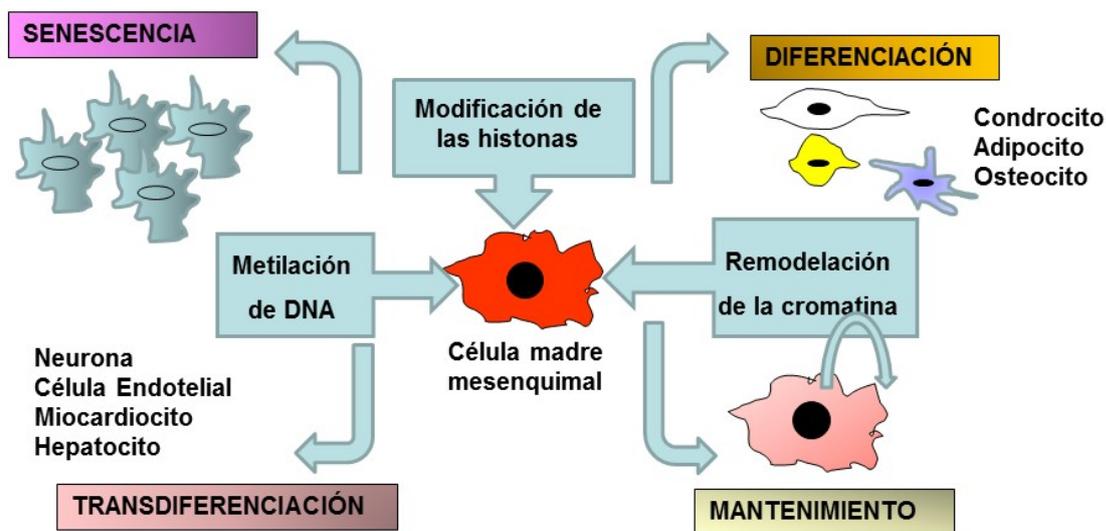


Figura 14. Mecanismos epigenéticos subyacentes al mantenimiento, diferenciación, senescencia y transdiferenciación de las MSCs.

Otros hallazgos, demuestran que la inhibición de la función HDAC promueve la apoptosis y la senescencia en MSCs humanas (Di Bernardo y cols., 2009). Los niveles de metilación de ADN disminuyen durante la senescencia celular y este fenómeno parece estar asociado a la regulación negativa de DNA metiltransferasas (DNMTs) tales como DNMT1 y DNMT3B (Yu y Kang, 2013). Es relevante que la inhibición de DNMT es responsable de la activación o inactivación de regiones promotoras de genes tan importantes como p16 y p21 (So y cols., 2011). Por tanto estos y otros estudios indican que los cambios epigenéticos desempeñan un papel central en la senescencia celular y el envejecimiento de MSCs.

En un caso concreto, como es la diferenciación de MSCs a estirpe osteogénica que se considera un método altamente prometedor para la regeneración de tejidos óseos dañados (Eslaminejad y cols., 2013), ya se han realizado numerosos estudios que se centran en la optimización de las condiciones *in vitro* para su diferenciación ósea pero también en estudios de perfil de expresión genética que caracteriza las fases de diferenciación. Así, los mecanismos epigenéticos que regulan la diferenciación de MSC hacia hueso están siendo descifrados (Huang y cols., 2015) y parece que en la activación/represión de genes clave en este proceso, la modificación de las histonas parece esencial. Por ejemplo, la metilación de lisina (K) es responsable del estado de cromatina inactiva, ya sea en los residuos H3K9-, H3K27-, H3K20- o H3K4-, H3K36- o H3K79 (Huang y cols., 2015). Como hemos dicho antes el papel de las modificaciones epigenéticas de enzimas como la histona metiltransferasa (HMT) o histona demetilasa (HDM) es fundamental para el destino final de las MSC. La implicación de la acetilación de histonas en la expresión génica en MSC y su inducción hacia estirpe osteogénica también ha sido analizada. Shen y cols., analizaron el efecto de la acetilación de H3 y H4 en la regulación de la expresión de Osteocalcina (OC) en las fases temprana y tardía de la diferenciación sugiriendo una relación directa entre la acetilación y la diferenciación osteogénica (Shen y cols., 2003). Recientemente, Hemming y cols., identificaron la implicación de la metilación y desmetilación de la histona H3K27 por la metiltransferasa EZH2 y la desmetilasa KDM6A en la diferenciación de MSCs. Así, la expresión forzada de EZH2 en MSC promueve la diferenciación adipogénica, mientras que el KDM6 inhibe la adipogénesis y promueve la diferenciación osteogénica. EZH2 es capaz de interactuar con más de 30 genes después de la diferenciación lo que subraya el importante papel de la metilación de histonas en la diferenciación osteogénica de MSC (Wei y cols., 2011). Además, Arnsdorf y cols. (2010) demostraron que la diferenciación osteogénica inducida de forma mecánica y biológica está relacionada con una disminución de la metilación del promotor de la osteopontina (OPN), un gen específico del hueso, junto con un aumento de sus niveles de expresión.

Otros factores también han sido implicados en este proceso de diferenciación. Entre ellos cabe destacar los miARN y especialmente miRNAsact que parecen ser reguladores de genes clave en la diferenciación osteogénica (Im y Shin, 2015).

Entre estos MiR-204 inhibe la osteogénesis mediante la represión de RUNX2 (Huang y cols., 2010) y miR-138 disminuye la expresión de osterix (OSX). Por otra parte, hsa-miR-27a y hsa-miR-489 regulan la diferenciación a través de la reducción de la expresión de fosfatasa alcalina (AP) (Schoolmeesters y cols., 2009). También se ha observado una regulación positiva de este proceso a través de miRNAs como es el caso de miARN-335 que aumenta la expresión de RUNX2 (Tome y cols., 2011) o miARN-20A que regula BMP/Runx2 (Zhang y cols., 2011). Trohatou y cols. (2014) aislaron MSCs de médula ósea, cordón umbilical y líquido amniótico. De estas últimas se aislaron una población fusiforme (SS) y otra redondeada (RS), en las que analizó el perfil de microARN identificándose 67 tipos que eran expresados en los tres tipos de MSCs. El microARN 21 (miR-21) presentó los niveles más altos de expresión en las RS-MSCs y MSCs aisladas de la médula ósea, en comparación con la subpoblación SS-MSCs. Así, en la subpoblación SS-MSCs, miR-21 inhibió fuertemente la expresión de Sox2 observándose una reducción del potencial clonogénico y proliferativo. Sin embargo, el silenciamiento de Sox2 promovió la diferenciación osteogénica en las SS-MSCs. Estos hallazgos sugieren que miR-21 podría funcionar específicamente mediante la regulación de la expresión de Sox2 MSCs humanas que podría ser una molécula clave en los procesos celulares de MSCs. Queda por determinar si estos miARN actúan principalmente sobre los reguladores epigenéticos y / o reguladores de la expresión génica.

En conclusión una comprensión detallada de la epigenética de la diferenciación de MSC será de vital importancia para para el éxito de su aplicación en medicina regenerativa. El concepto tradicional es que los genes codifican proteínas a través de una molécula de ARNm intermediario.

II. OBJETIVOS.

Los objetivos principales de la presente tesis doctoral son:

1. Optimizar el proceso de obtención de células madre mesenquimales de tejido adiposo.
2. Diferenciar las células madre mesenquimales a linaje osteogénico y miogénico.
3. Determinar los perfiles epigenéticos de metilación de ADN de las células madre mesenquimales de tejido adiposo y de las diferenciaciones a linaje osteogénico y miogénico.
4. Determinar si los genes con un patrón de metilación diferente en células madre mesenquimales y diferenciadas están implicados en el proceso de diferenciación osteogénica y miogénica.
5. Determinar la estabilidad de la inducción osteogénica y miogénica obtenidas al someterlas a la privación de los factores de inducción.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. OBTENCIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (hASCs).

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (hASCs) fueron aisladas de muestras de grasa obtenidas de liposucciones realizadas por la Dr. Carmen Huertas en la Clínica de la Salud de Granada (Figura 1). Las muestras de grasa obtenidas fueron sometidas a un proceso de aislamiento y caracterización, para, posteriormente, utilizarlas en ensayos de diferenciación osteogénica y miogénica.



Figura 1. La técnica de lipoaspirado requiere el uso de una cánula que se introduce en las diferentes zonas a tratar (previamente marcadas) (1) (tomada de es.wikipedia.org) lo que permite la inyección de una solución que contiene anestesia,

drogas vasoconstrictoras y una solución salina que ayuda a desprender y licuar la grasa. Posteriormente, una bomba de aspiración permite, a través de la cánula, permite la recolección de la grasa en recipientes estériles (2).

1.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE GRASA.

El lipoaspirado de grasa se procesó en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar vertical (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italy) (Figura 2).



Figura 2. Imágenes representativas de las diferentes fases del procesamiento de los lipoaspirados de grasa. El lipoaspirado fue procesado en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar (1), repartido en tubos de polycarbonato (2, 3 y 4) y centrifugado (5) para obtener un sobrenadante lípido de restos de sangre (6).

Para el lavado de la grasa, esta fue repartida en volúmenes de 20 ml en tubos de policarbonato de 50mL y diluidas con Hank's Balanced Salt Solution (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) hasta un volumen final de 50 ml. Se mezcló por agitación y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4° C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante con una pipeta pasteur y con cuidado de no retirar restos de sangre. El sobrenadante fue lavado siguiendo el anterior procedimiento hasta que quedó totalmente limpio (color blanco) (Figura 2).

La muestra obtenida se transfirió a un nuevo tubo y se le añadió igual volumen de solución de disgregación de tejido para ser incubada durante 1 hora a 37° C con agitación. Transcurrido este tiempo la digestión es neutralizada añadiendo 2 ml de suero bovino fetal, FBS (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) y centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos a 4° C. Se retiró el sobrenadante, añadiendo 1ml de NH₄Cl 160 mM al pellet, con el propósito de lisar los eritrocitos, y se incubó durante 10-15 minutos a 4° C. Posteriormente se volvió a centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4° C. El botón celular fue sembrado en frascos de cultivo de 75 cm² (Nunc, Thermo Fisher Scientific) a una densidad de 2x10⁶ células/frasco (Figura 3).



Figura 3. Imágenes representativas de las diferentes fases del procesamiento de los lipoaspirados de grasa. El sobrenadante obtenido fue incubado en solución de

digestión en agitación continua (1). El resultado (2) fue centrifugado (3). Tras la lisis de los eritrocitos las células fueron puestas en frascos de cultivo (4).

Solución de disgregación de tejido: Hank's solution (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), 10% BSA (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), 1% Colagenasa IA (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA).

1.2. CULTIVO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO.

Las células obtenidas y sembradas en frascos de 75 cm² (Nunc, Thermo Fisher Scientific) fueron expandidas con el correspondiente medio de cultivo, en una estufa (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Electron Corporation, USA) a 37° C, 90% de humedad y 5% de CO₂. Todas las manipulaciones de los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italy), utilizando siempre materiales y soluciones estériles.

Medio de cultivo:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Chemical co).
- Suero bovino fetal, FBS al 10% (Fisher Scientific, Lonza BioWhittaker), previamente descomplementado a 56° C durante 30 minutos.
- Penicilina – Estreptomycina (Penicillin – Streptomycin 100X (10000U/ml Penicillin-G y 10mg/ml Streptomycin) al 1% (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)
- Ciprofloxacino 10 µg/ml al 1% (Normon).

El cambio de medio de cultivo se realizó cada 3 ó 4 días, de acuerdo con su acidificación (color amarillo).

Las células fueron lavadas con el objetivo de retirar los restos de medio de cultivo especialmente cuando fueron sometidas a algún experimento posterior como la extracción de ácidos nucleicos o proteínas, antes de la congelación o antes de su división en el proceso de expansión celular. El lavado se realizó añadiendo 5 ml de PBS en el frasco de cultivo.

Los cultivos fueron sometidos a división cuando alcanzaron un estado de confluencia del 80% (Figura 4). Las células adheridas al plástico del frasco de cultivo se despegaron añadiendo una solución de PBS-EDTA 0,02% (el EDTA secuestra el Ca^{++} que es necesario para la adhesión celular). Las células se incubaron 10 min en la estufa a 37 °C, transcurridos los cuales se golpeó ligeramente el frasco para que las células se despegaran. Seguidamente la suspensión celular es centrifugó a 1500 rpm durante 5 min y se procedió a su lavado con PBS. El sobrenadante se desechó y el botón de células re suspendió en un medio de cultivo nuevo que se pasó a dos o más frascos de cultivo, consiguiendo así su duplicación.

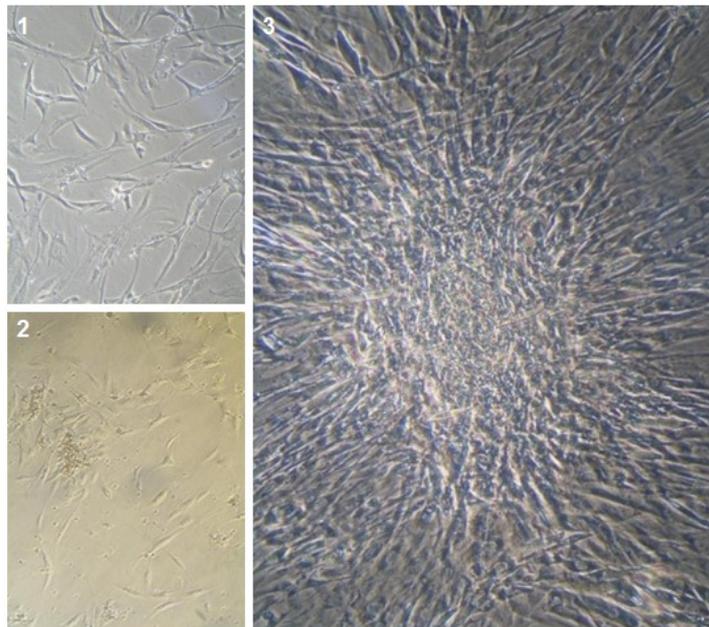


Figura 4. Imágenes representativas de células madre mesenquimales derivadas de tejido graso en cultivo durante 1 día (1), 4 días (2) y 8 días (3), en el que se observa estado confluyente.

1.3. CONTAJE CELULAR.

Para el conteo celular, las células fueron despegadas (ver anteriormente) y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en medio DMEM (volumen conocido). La densidad del cultivo será determinada con ayuda de una celda de conteo o cámara de Neubauer. Se tomo un alícuota (volumen conocido) de la suspensión y se le añadió igual volumen de azul tripán al 0'4%. El análisis mediante microscopio permitió determinar las células inviables (de color azul por alteración de la membrana), contando sólo las células vivas (Figura 5).

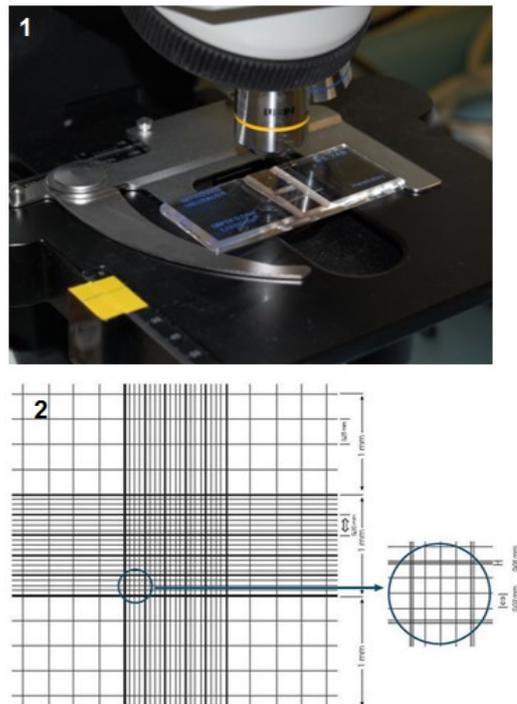


Figura 5. Utilización de la cámara de Neubauer. Visualización con microscopio y cuadrantes para el conteo celular (tomada de es.wikipedia.org y commons.wikimedia.org) (explicación en el texto).

$$\text{N}^{\circ} \text{ células / ml} = (\text{n}^{\circ} \text{ células / n}^{\circ} \text{ cuadrantes}) * 10^4 * \text{Factor de dilución}$$

** Factor de dilución = 2 (dilución anterior 1:1)

1.4. CONGELACIÓN Y DECONGELACIÓN CELULAR.

Las células fueron despegadas de la superficie de los Falcons mediante una solución de PBS-EDTA (0.02%), centrifugadas a 600 x g durante 5 min y lavadas 2 veces con PBS. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron a razón de 0.5×10^6 células por ml de medio de congelación. El elemento esencial del medio de congelación es el DMSO, un solvente bipolar, hidrosoluble, de bajo peso molecular, que posee una acción crioprotectora ya que previene la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelación y por tanto la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana. A continuación, las células fueron dispensadas en criotubos e introducidas inmediatamente en congelador a -80°C donde permanecieron 24 h, siendo posteriormente almacenadas definitivamente en nitrógeno líquido.

Medio de congelación:

93% Suero bovino fetal (FBS, Fisher Scientific, Lonza BioWhittaker)

7% Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)

**El DMSO interactúa con los fosfolípidos lo que es crítico para la crioprotección de la membrana. Por esta razón es considerado tóxico a temperatura ambiente.

Para la descongelación celular, el criotubo fue sacado del nitrógeno líquido y rápidamente, una vez descongelado, se vertió su contenido en un tubo tipo universal con PBS para diluir el DMSO el cual es altamente tóxico para las células a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió 3 veces. El botón celular fue resuspendido en medio de cultivo celular DEMEN en un frasco de cultivo y mantenido tal y como se ha descrito previamente.

1.5. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA.

1.5.1.- Microscopía óptica.

Las células fueron observadas mediante microscopio invertido de contraste de fase Nikon TM Phase Contrast-2, ELWD 0.3 mediante el cual se realizó seguimiento directo y a través de la toma de microfotografías.

1.5.2. Microscopía de transmisión electrónica.

Las células a analizar fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilato sódico 0.1M a pH 7.4 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio al 1% en buffer de cacodilato 0.1M durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las muestras fueron deshidratadas en alcohol. Las células fueron separadas de los frascos de cultivo rápidamente con un tratamiento con óxido de propileno e incluidas en Epon 812. Tras la polimerización, se retiró el plástico y las secciones ultrafinas se cortaron de forma paralela y perpendicular con respecto a la superficie del frasco de cultivo. Las células se contrastaron con acetato de uranio y citrato de plomo y se examinaron en el microscopio de transmisión electrónica Hitachi H7000.

1.5.3 Microscopía de barrido.

Los diferentes cultivos celulares fueron analizados mediante microscopía de barrido con el objeto de determinar las modificaciones a nivel de la membrana celular. El proceso se llevó a cabo siguiendo los protocolos del Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y observadas bajo el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-800.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE

TEJIDO ADIPOSO (hASCs) MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO (FACScan).

La caracterización de las hASCs del cultivo celular se realizó mediante citometría de flujo (BD FACS Canto II, Flor Citometry System), permitiendo analizar diferentes marcadores específicos de la hASCs.

Las células fueron despegadas con PBS-EDTA 0.04%, lavadas 2 veces con PBS y centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. El pellet fue resuspendido en 100 µl de PBS frío y se añadió 900 µl de etanol 70% frío mediante vortex para fijar las células.

Se incubaron 5 min a 4° C tras los cuales se centrifugaron y lavaron con 2 ml de PBS frío. A continuación se incubó en 1 ml de PBS-SBF 10% durante 15 min a T^a ambiente. Posteriormente las células fueron centrifugadas (1500 rpm durante 10 min), eliminándose el sobrenadante e incubando las células con el anticuerpo correspondiente, durante 20 min a T^a ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron lavadas 2 veces con PBS, resuspendidas en 500 µl de PBS y analizadas en citómetro de flujo.

MARCAJE CELULAR – CITOMETRÍA FLUJO		
TUBO	PBS (µl)	SUERO AB (µl) /mAb (µl)
Control	100	
Isotipo	95	4/1
Anticuerpo	86	4/10

ISOTIPOS Y ANTICUERPOS		
mAb	CASA COMERCIAL	TIPO DE mAb
Anti-CD105-APC	eBioscience	Mesenquimático
Anti-CD90-FITC	Santa Cruz Biot.	Mesenquimático
Anti-CD73-PE	BD Pharmigen	Mesenquimático
Anti-CD45-FITC	Miltenyi Biotec	Hematopoyético

Anti-CD34- FITC	Miltenyi Biotec	Hematopoyético
Anti-CD133-PE	Miltenyi Biotec	Hematopoyético

El Suero AB es utilizado como bloqueante para evitar uniones inespecíficas.

3. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (hASCs).

Tras la caracterización de las hASCs mediante citometría de flujo, se procedió a su diferenciación a osteocitos y miocitos.

3.1. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA.

Para conseguir una diferenciación osteogénica se hicieron dos tipos de siembras: 15×10^5 célula/frasco de cultivo de 25 cm^2 y 5×10^4 células/pocillo en placas de 6 pocillos (Nunc, Thermo Fisher Scientific), en los cuales se había colocado previamente un cubreobjetos.

Las células fueron expuestas a un medio de diferenciación osteogénico, siguiendo una modificación del protocolo de Zuk y cols. (2002). Pocillos sin medio de diferenciación fueron usados como control. El medio de cultivo fue renovado cada cada 3 ó 4 días dependiendo de la acidificación del medio, momento en el que las células fueron sometidas a lavados con PBS (ver anteriormente).

MEDIO DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICO	
REACTIVOS	CASA COMERCIAL
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, US
Suero Bovino Fetal 10%	Fisher Scientific, Lonza, BioWhittaker
Penicilina -Estreptomicina 1%	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, US
Ciprofloxacino 1%	Normon

Dexametasona 10 nM	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, US
Ácido Ascórbico 150 µM	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA
Glicerol – fosfato 10 mM	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, US

La diferenciación osteogénica de las hASCs se prolongó durante 28 días, durante las cuales, diariamente se hizo un seguimiento morfológico mediante microscopio óptico y un registro fotográfico para observar la evolución del proceso de diferenciación.

El proceso de diferenciación osteogénica fue valorado mediante tinción con Alizarina Red S.

La Alizarina Red S, se utiliza para identificar depósitos de calcio, por la interacción del calcio con los grupos sulfónicos y/o hidroxílicos de ésta. La reacción no es estrictamente específica para el calcio, ya que magnesio, manganeso, bario, hierro y estroncio pueden interferir, pero estos elementos difícilmente se encuentren en la muestra, y además se necesitaría una concentración muy alta para que interfirieran con la tinción.

La tinción se realiza en base al siguiente protocolo: las células diferenciadas a linaje osteogénico en placas de 6 pocillos, fueron teñidas con rojo de alizarina (Figura 6). Para ello el medio de cultivo de cada pocillo fue aspirado teniendo cuidado de no aspirar las células. Posteriormente las células fueron fijadas con 2 ml de etanol 70% frío (Panera) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se aspiró el etanol y las células se lavaron 2 veces con agua bidestilada (cada lavado de 10 minutos). Seguidamente se procedió a la tinción añadiendo la cantidad suficiente de Alizarin Red 0,1% (Fluka), pH igual a 6.5, para cubrir los pocillos y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se eliminó la alizarina y los pocillos fueron lavados 4 veces con agua bidestilada. Finalmente se añadió 1ml de agua bidestilada a cada pocillo para evitar que se sequen las células y se procedió a la visualización en el microscopio óptico.

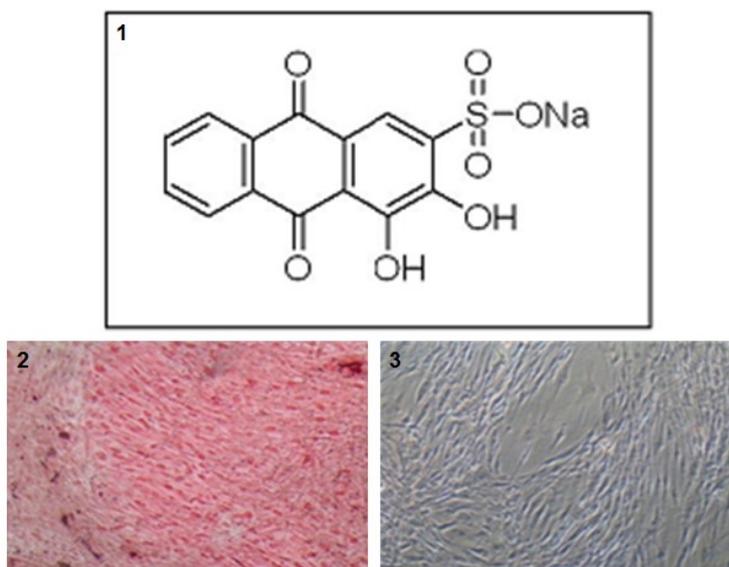


Figura 6. Estructura química de la alizarina red (1) (tomada de es.wikimedia.org) Imagen representativa del marcaje de alizarina (2) de células mesenquimales de grasa inducidas a diferenciación osteogénica (3).

3.2. DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA (MIM).

Para inducir una diferenciación miogénica, se hicieron dos tipos de siembra con las célula obtenida: 15×10^5 célula/frasco de cultivo de 25 cm^2 y 5×10^4 células/pocillo en placas de 6 pocillos (Nunc, Thermo Fisher Scientific), en los cuales se había colocado un cubreobjetos. Las células se cultivaron con medio de diferenciación miogénico siguiendo un protocolo modificado de Zuk y cols. (2002).

MEDIO DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICO	
REACTIVOS	CASA COMERCIAL
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA
Suero Bovino Fetal 10%	Fisher Scientific, Lonza, BioWhittaker
Penicilina – Estreptomicina 1%	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA
Ciprofloxacino 1%	Normon
Suero de Caballo 5%	Fisher Scientific, Lonza, BioWhittaker

Hidrocortisona 50 μ M	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA
---------------------------	--

La diferenciación miogénica de las hASCs se prolongó durante 5 semanas, durante las cuales se hizo un seguimiento diariamente de su morfología mediante microscopio óptico con captación de fotografías que permitieron valorar la diferenciación. Para determinar la diferenciación miogénica se realizó un estudio inmunohistoquímico mediante diferentes marcadores. No obstante, en algunos casos se ensayó tinción de oil red para determinar el origen de estructuras vesiculares.

3.2.1. Estudio de Inmunofluorescencia.

Las células diferenciadas a linaje miogénico en placas de 6 pocillos fueron analizadas mediante inmunofluorescencia. Para ello el medio de cultivo de cada pocillo fue aspirado teniendo cuidado de no aspirar las células. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído (Panreac) al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se aspiró el paraformaldehído y se añadió Tritón X-100 (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) al 0.1% en PBS (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente, para permeabilizar las células. Después de la incubación, el Tritón X-100 fue aspirado y las células se lavaron lavar 3 veces con PBS (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA). Se procedió a la incubación con 1 ml de la solución del anticuerpo primario (Troponina T, α -actinina, actina y desmina) correspondiente a 4° C durante toda la noche y en agitación. Tras la incubación el anticuerpo fue retirado, se hicieron 3 lavados con PBS (cada lavado de 15 minutos y en agitación), y se procedió a incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con 1 ml de la solución del anticuerpo secundario correspondiente. A partir de este paso se procederá en oscuridad, debido a que el anticuerpo secundario va marcado con un fluorocromo. El anticuerpo fue retirado y se procedió a lavar 3 veces con PBS (15 minutos cada lavado, en agitación y manteniendo la oscuridad). Finalmente los núcleos celulares fueron teñidos con una solución de 4,6- diamino-2 fenilindol (DAPI) (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) diluida 1/1000 en PBS (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

La muestra fue lavada 3 veces con PBS (durante 15 minutos cada lavado) en agitación y manteniendo la oscuridad y visualizada al microscopio de fluorescencia.

ANTICUERPOS PRIMARIOS		
ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	Blocking Buffer al 2%
Troponina T, goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/200
α - Actinina, mouse IgG	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, US	1/800
Actina, mouse IgG	Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA	1/500
Desmina, mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/500

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ANTICUERPO Primario	ANTICUERPO Secundario	CASA COMERCIAL	PBS
Troponina T, goat IgG	Donkey anti goat IgG - FITC	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/200
α - Actinina, mouse IgG	Goat anti mouse IgG - PE	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/200
Actina, mouse IgG	Goat anti mouse IgG - FITC	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/200
Desmina, mouse IgG	Goat anti mouse IgG - FITC	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/200

3.2.2. Tinción con Oil Red O.

Excepcionalmente, en una inducción miogénica se observó la presencia de vesículas refringentes similares a adipocitos. Con el objetivo de determinar las características de estas estructuras vesiculares, se procedió a una tinción con Oil Red (Figura 7). Este compuesto es un lisocromo lipófilo que tiñe de rojo los lípidos y los aceites minerales.

Solución: 60% Solución Stock de Oil red y 40% isopropanol

****Estabilidad:** 2 horas a temperatura ambiente

Solución Stock: Oil Red O al 0.3% en isopropanol

****Estabilidad:** 2 meses a 4°C

Las células diferenciadas a linaje miogénico en placas de 6 pocillos fueron sometidas a tinción con Oil Red O. Como en los casos anteriores, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se fijaron las células con paraformaldehído (Panreac) al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se aspiró el paraformaldehído y las células se lavaron 3 veces con PBS (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) (cada lavado de 10 minutos) y posteriormente 2 veces con agua bidestilada. Seguidamente se procedió a la tinción añadiendo la cantidad suficiente de Oil Red O Solución para cubrir los pocillos y se incubó durante 50 min a temperatura ambiente.

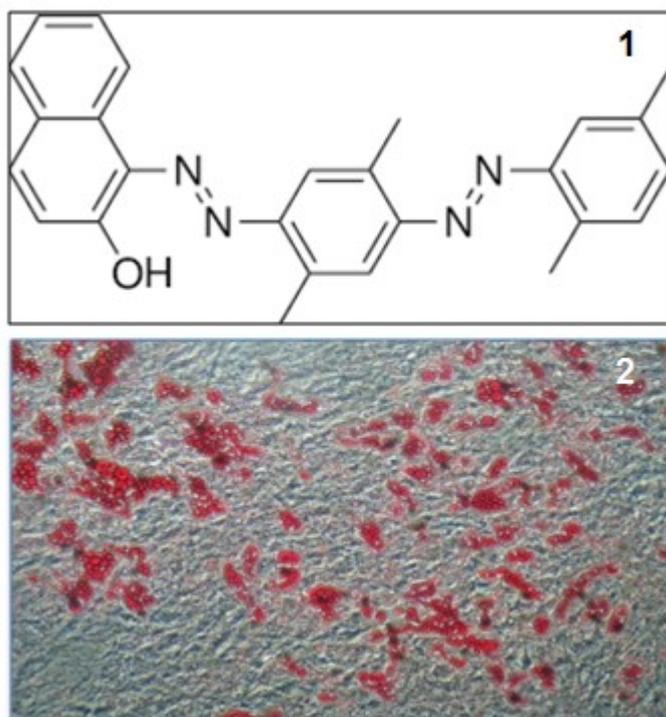


Figura 7. Estructura química del oil red (1) (tomada de es.wikimedia.org). Imagen representativa de una tinción con oil red de células adiposas (2).

Transcurrido este tiempo se eliminó el oil red y los pocillos fueron lavados 3 veces con agua bidestilada. Finalmente se añadió 1ml de agua bidestilada a cada

pocillo para evitar que se sequen las células y se procedió a la visualización en el microscopio óptico.

4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS: ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.

4.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Las células en cultivos (hASCs basal y diferenciadas), fueron despegadas como se ha descrito anteriormente. 10^6 - 10^7 células se centrifugaron para obtener un pellet celular que fue resuspendido en 70 μ l de Solución de Extracción de Proteínas y sonicado 3 veces (15 segundos en hielo). Las muestras fueron conservadas a -20°C .

Solución de Extracción de Proteínas

- 0.302 g de Trizma–Base
- 4.27 g de Sacarosa
- 0.073 g de EDTA
- 250 μ L Tritón X/100 ([]= 0.5%)
****ajustar el pH a 7.4
- Agua MiliQ hasta alcanzar los 50 ml

4.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

La concentración proteica fue determinada por la reacción colorimétrica de Bradford. Para ello, en una placa de 96 pocillos se realizó una curva patrón de 1-10 mg/ml de Albúmina Bovina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)

El esquema empleado para realizar la cuantificación fue el siguiente:

1	2	3		4	5	6		7	8	9	
A	B	C	D	E	F	G					
A	B	C	D	E	F	G					

Los reactivos colocados en los pocillos para llevar a cabo la determinación fueron los siguientes:

REACCIÓN BRADFORD		
POCILLO	REACTIVO	CANTIDAD (µL)
1-2-3	Bradford/ Proteínas MSC	185/5
4-5-6	Bradford/ Proteínas MIO	185/5
7-8-9	Bradford/ Proteínas MIM	185/5
A	Bradford/ Albúmina [0.5 mg/ml]	185/5
B	Bradford/ Albúmina [1 mg/ml]	185/5
C	Bradford/ Albúmina [2 mg/ml]	185/5
D	Bradford/ Albúmina [3 mg/ml]	185/5
E	Bradford/ Albúmina [5 mg/ml]	185/5
F	Bradford/ Albúmina [10 mg/ml]	185/5
G	Bradford	190

En dos pocillos adicionales, además de los 280 µl de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.), añadiremos 5 µl de agua.

La reacción fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, midiéndose en un colorímetro (Multiskan Ex Thermo Electron Corporation, Usa) a una longitud de onda de 570 nm. Tras obtener la curva patrón se procedió a medir la absorbancia de nuestras muestras, conociendo así la concentración de proteínas correspondiente

4.3. SDS-PAGE.

4.3.1. Preparación de las muestras.

Las proteínas fueron disueltas en tampón de carga obteniendo una concentración final de 1µg/µl. Una vez se obtuvo una mezcla homogénea tampón-extracto, se calentaron las muestras durante 5 minutos a 95 °C para facilitar la acción del SDS.

4.3.2. Preparación del gel y carga de las muestras.

Se preparó el gel inferior a la concentración del 12% debido a que las proteínas que se iban a identificar tenían tamaños comprendidos entre 20 – 100 KDa. Los reactivos se añadieron en el orden establecido (ver tabla), adicionando en último lugar el APS y el TEMED, que son los iniciadores de la reacción de gelificación. El Acris/Bis, el agua destilada, el Buffer Tris 4X y la muestra deben encontrarse en hielo antes de su uso.

GEL INFERIOR "LOWER" 12%	
REACTIVOS	CANTIDAD
Acris/Bis 30%	3.2 ml
Agua Destilada	2.8 ml
Buffer Tris Lower 4X pH=8.8	2 ml
APS 10%	40 µL
TEMED	4 µL

Buffer TRIS LOWER 4X: Tris 1.5M, SDS 10%, Agua Bidestilada (hasta 100ml). pH= 8.8

El gel inferior se añadió mediante una pipeta de 1000 µl entre los dos cristales de forma constante y lenta hasta llegar a la marca del soporte, enrasándose a continuación con agua bidestilada hasta el borde de los cristales.

Una vez gelificado, eliminamos el agua y añadimos el Gel Superior o “Upper”. Colocamos los peines y esperamos a que gelidifique para retirarlos y obtener así los pocillos donde cargar las muestras.

GEL SUPERIOR “UPPER”	
REACTIVOS	CANTIDAD
Acris/Bis 30%	0.64 ml
Agua Destilada	3.05 ml
Buffer Tris Upper 4X pH=6.8	1.25 ml
APS 10%	25 μ L
TEMED	5 μ L

Buffer TRIS UPPER 5X: Tris (9gr), Glicerina (43,2 gr), SDS (3gr), Agua Bidestilada (hasta 600ml).

A continuación sacamos los cristales del soporte con mucho cuidado y los ponemos en el soporte de la cubeta de electroforesis. Llenamos la cubeta hasta la mitad con Buffer 1X por la cara externa de los cristales y por la cara interna (hueco entre pares de cristales) hasta la altura de los pocillos. Para preparar el Buffer 1X, tomamos 200 ml del Buffer 5X y le añadimos 800 ml de agua bidestilada.

Para nuestro estudio cargaremos 25 μ g de proteína de cada muestra, a las que añadimos 4 μ l de Tampón de carga, completando con agua bidestilada hasta los 24 μ l. Las muestras se introdujeron en el gel utilizando una jeringa Hamilton (24 μ l por pocillo). Un pocillo se destino a cargar de 3 μ l de Peso Molecular (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, Bio-Rad Laboratoires, SA) al que se le añadió agua bidestilada hasta los 24 μ l. Ningún pocillo debe quedarse sin muestra. Los pocillos vacíos se cargarán 20 μ l de PBS + 4 μ l de Tampón de carga.

TAMPÓN DE CARGA 6X	
REACTIVOS	CANTIDAD
Agua Bidestilada	1.15 ml
Tris-Cl 1M pH= 6.8	3.75 ml

SDS	1.2 g
β – mercaptoetanol	3 ml
Glicerol	2 ml
Azul de Bromofenol	100 μ l

4.3.3. Electroforesis.

La electroforesis se realizó a voltaje constante de 120V durante 90 min en una cubeta Mini Protean II \ddot{O} (Bio-Rad) (Figura 8).

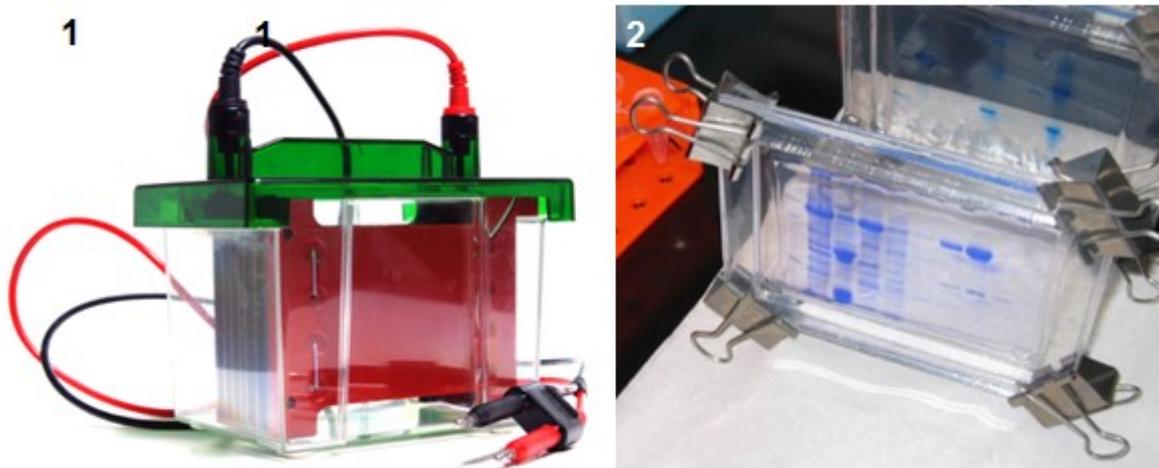


Figura 8. Imagen representativa del sistema utilizado para la electroforesis. Las muestras cargadas en los pocillos del gel acrilamida fueron colocadas en la cubeta de electroforesis (1) donde tras someterlas a un a voltaje constante durante 90 min pudieron ser separadas en base a su peso molecular (2) (tomada de de.wikipedia.org).

4.4. TRANSFERENCIA: INMUNOBLOTING.

El inmunobloting o western-blot se realizó por modificación de la técnica descrita por Towbin y cols. (1997) y Leiva y cols. (1989). Finalizada la electroforesis, a los geles se les cortó el gel concentrador del separador y fueron equilibrados en tampón

de transferencia durante 15 min. Se cortó el papel Whatman (Sigma, SL) y una membrana de nitrocelulosa (poro 0.45 μm) (Millipore, Fr), siguiendo las dimensiones del gel y se equilibraron durante 15 min en tampón de transferencia. A continuación, se procedió a la elaboración del sandwich de transferencia, colocando seriadamente y del polo negativo al positivo los siguientes componentes: papel Whatman, gel, membrana de nitrocelulosa, papel Whatman.

El montaje se introdujo en la cubeta de transferencia y se cubrió con tampón de transferencia. La transferencia se realizó a 15 V durante 20 min, tras la se tiñó el gel con rojo Ponceau durante unos 10 segundos para determinar si la transferencia fue correcta. Se lavó la membrana con agua destilada para eliminar el exceso de tinción del rojo Ponceau y se acabó de desteñirla con PBS.

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA SEMISECA	
REACTIVOS	CANTIDAD
Tris Base	5.8 g
Glicina	2.9 g
Metanol	200 ml
SDS 20%	1.75 ml
Agua Bidestilada	Completar hasta 1000 ml

4.5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue sometida a tres lavados de 5 min (solución de lavado), se procedió al bloqueo de los sitios de unión inespecíficos mediante una solución de bloqueo (1 h en agitación) y, posteriormente, la membrana fue sometida a tres lavados de 5 min (solución de lavado).

Solución de bloqueo: Leche en Polvo Semidesnatada (2.5 gr); PBS – Tween 20 0.1% (50 ml)

La membrana fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C toda la noche en agitación. A continuación la membrana fue sometida de nuevo a

tres lavados de 5 min y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, marcado con peroxidada, durante 1 h en agitación. Los anticuerpos fueron preparados de la siguiente forma:

ANTICUERPOS PRIMARIOS	
REACTIVOS	CANTIDAD
Leche en Polvo Semidesnatada	1 ml
PBS – Tween 20 0.1%	9 ml
Anticuerpos primarios Fosfatasa Alcalina (1:300) Mouse IgG 90 KDa Osteocalcina (1:300) Mouse IgG 12 KDa Osteopontina (1:200) Mouse IgG 66KDa PIWIL2 (1:200) Rabbit polyclonal IgG 110 KDa	33.3 µl

INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS SECUNDARIOS	
REACTIVOS	CANTIDAD
Leche en Polvo Semidesnatada	1 ml
PBS – Tween 20 0.1%	9 ml
Anticuerpos Secundarios Anti Mouse IgG – HRP (1:2500) Anti Rabbit IgG – HRP (1:2500)	4 µl
Anticuerpo β -actina (1:1000) Directa 41 KDa	10 µl

Tras tres lavados más de 5 min, se procedió al revelado mediante ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences, USA) y analizados los resultados usando el Fuji LAS-4000 imaging system (Japan).

5. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ARN.

5.1. EXTRACCIÓN DE ARN.

Se realizó utilizando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN) modificado, a partir de cultivos de 10^5 - 10^6 células. Las células fueron lavadas con PBS 2 veces y despegadas con 1 ml de Trizol (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) y la ayuda de un scraper celular. Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet celular en Trizol. A continuación las células fueron pasadas 15 veces por una jeringa de insulina e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para continuar disociando los complejos nucleoproteicos, como son ribosomas. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 263 μ l de Cloroformo (Panreac) y se mezcló mediante vórtex durante 15 segundos, incubando nuevamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 4° C y a menos de 12.000 x g, obteniéndose 3 fases: en la superior, que es la acuosa, se encontrará el ARN y el ADN, por ser solubles en agua; en la interfase y en la fase inferior se encuentran las proteínas y restos celulares. La fase acuosa fue recogida y traspasada a tubo de 1.5 ml en cantidades 200 μ l, a los que se le añadieron 700 μ l de la mezcla Buffer RLT – β -mercaptoetanol (10 μ l β -mercaptoetanol por cada 1 ml de Buffer RLT) 500 μ l de etanol (Panreac) 96-100%, y se mezcló por inversión. Dicha mezcla fue transferida a la columna Mini Column RNeasy en cantidades máximas de 600 μ l. Las columnas fueron centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm a 4° C. El filtrado fue eliminado, y en el caso de tener más volumen de muestra, añadir de nuevo otros 600 μ l, volver a centrifugar y descartar el filtrado. Este paso se repetirá hasta agotar el volumen de la muestra. Seguidamente se añadieron 700 μ l de Buffer AW1 y se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 rpm a 4° C, eliminándose nuevamente el filtrado. Se añadieron 500 μ l de Buffer RPE y se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 rpm a 4° C, eliminándose nuevamente el filtrado. Este paso se repitió una vez más. Para secar la columna se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 rpm a 4° C. La columna fue transferida a un nuevo tubo de 1.5 ml y se le añadió entre 30-50 μ l de H₂O libre de RNAsa. Tras incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 rpm a 4° C. El eluido (ARN) fue recogido y conservado a – 80° C.

5.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

La cuantificación y pureza del ARN total se realizó mediante un espectrofotómetro (Ultrospec 2000 UV/visible spectrophotometer, Pharmacia Biotech). Sólo se consideraron muestras con una concentración superior a 0'5µg/µl, y con una ratio entre 1'8-2. Se desecharon las muestras con valores inferiores que pueden indicar contaminación con proteínas y muestras con valores superiores que pueden indicar la presencia de alcoholes en la muestra.

5.3. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

5.3.1. Preparación del gel de agarosa.

Para el chequeo de los ácidos nucleicos fueron usados geles de agarosa del 1,8%. Para la preparación de 250 ml de gel, se pesaron 4,5 g de agarosa y se le añadieron 5ml de TAE 50 X y se enrasó hasta 250ml con agua bidestilada. Dicha disolución se calentó hasta ebullición, y a continuación se dejó enfriar hasta una temperatura de 65°C, momento en el que se añadió Añadir RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution. Posteriormente se vertió despacio sobre el soporte del gel, previamente preparado y con el peine, y se dejó solidificar. Una vez que la agarosa estuvo gelificada, retiramos el peine, dejando visibles los pocillos de carga.

5.3.2. Electroforesis.

El gel fue introducido en una cubeta de electroforesis llenado con tampón TAE 1X hasta que fue cubierto totalmente. Seguidamente, se cargó el marcador de peso molecular y las muestras (1 µg de ARN) junto con el tampón de carga, cada una en un pocillo. Se sometieron a una diferencia de potencial de 50-100 V. la electroforesis se detuvo en el momento en el que el frente alcanzó la mitad del gel.

Solucii3n TAE 50X: 2M Tris-Acetato pH=8'0, 0'05M E.D.T.A. (esterilizado mediante autoclave). Durante la electroforesis se emplea TAE 1X, para lo cual se diluye 50 veces el tamp33n preparado anteriormente

5.3.3. Visualización.

El gel fue visualizado y analizado en un densitómetro con lámpara ultravioleta (BIO-RAD), donde podemos comparar las bandas de ARN con el marcador de peso molecular para conocer el tamaño de nuestras muestras (Figura 9).

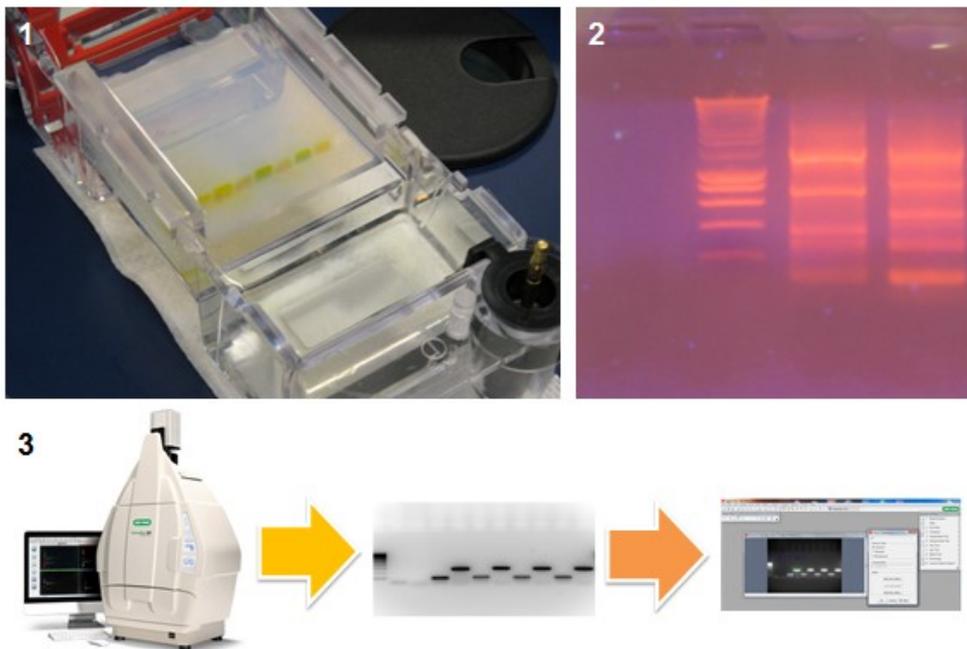


Figura 9. Imágenes representativas del proceso de electroforesis (1 y 2) (tomado de es.wikipedia.org) y visualización de geles mediante el sistema de documentación de geles BioRAD y el software Quantityone.

5.4. TRANSCRIPTASA REVERSA (RT).

Utilizando el ARN total obtenido previamente, se realizó la transcriptasa reversa mediante kit Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI).

Esta técnica se realizó con 1.5 µg de ARN en un tubo, que fue a 70° C durante 10 minutos, eliminando las estructuras secundarias del ARN. A continuación a cada

tubo se le añadieron las siguientes cantidades de reactivos, teniendo en cuenta que el volumen final de la muestra será de 20 μ l

REACTIVOS RT	
REACTIVOS	CANTIDAD (μ L)
MgCl ₂	4
Buffer RT 10X	2
dNTP (10mM)	2
Inhibidor Ribonucleasa	0.5
Oligo d(T)	1
AMV RT	1
H ₂ O libre RNAsa	Hasta un volumen total de

Los tubos con la mezcla de reactivos fueron colocados en un termociclador con el siguiente programa: 70° C 10 minutos; 95° C 15 minutos; 4° C tiempo indefinido. Finalizado el programa, los productos de RT (ADNc) se llevan hasta un volumen de 50 μ l. Para ello añadimos 30 μ l de H₂O libre de RNAsa y, finalmente, se conservarán a -20° C.

5.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La PCR se realizó utilizando el Kit PCR Core System II (Promega):

REACTIVOS PCR (Promega)	
REACTIVOS y CONCENTRACIONES	CANTIDAD (μ L)
MgCl ₂	1.2
Buffer PCR 10X	2.5
dNTP (10mM)	0.2
Primer 1 (50 μ M)	0.25
Primer 2 (50 μ M)	0.25
Muestra de ADNc	10
Taq Polimerasa (5U/ μ l)	0.625

H₂O libre RNAsa hasta un volumen final de 25 µl

Añadimos todos los reactivos en tubos de 200 µl, con excepción de la enzima Taq Polimerasa. Introducimos el tubo en el termociclador para iniciar la reacción con un tratamiento denominado “Hot Start” que consiste en tener la mezcla a 94° C durante 9 minutos para desnaturalizar el ADNc. A continuación, añadimos la Taq Polimerasa y se inicia el siguiente programa:

94° C durante 10 minutos (9 minutos HOT START)
 94° C durante 30 segundos
 Tm durante 20 segundos
 72° C durante 30 segundos
 GO TO Step 2, 31 Times
 72° C durante 7 minutos
 4° C FOREVER

La Tm es la *Melting Temperatura* de los primers, es decir, la temperatura óptima de unión de los primers. Dichas Tm se recogen en la siguiente Tabla:

GENES	PRIMERS R y F/Tm(°C)	FRAGMENTO AMPLIFICADO
-------	----------------------	-----------------------

GENES Y PRIMERS DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

Osteonectina (ON)	R:tcaggacgttcttgagccagt // 54	400 pb
	F: tgtgggagctaatacctgtcc // 51	
Osteopontina (OP)	R:gtcaatggagtcctggctgt // 51	270 pb
	F:gctctagaatgagaattgcactg // 50	
Osteocalcina (OC)	R:gcgatatcctagaccgggccgtag //63	320 pb
	F: F:gctctagaatggccctcacactc //56	

GENES Y PRIMERS DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA

Desmina	R:tgtgtcctgtagccactg // 51	600 pb
	F:ggtggaggtgctcactaacc // 51	
Cadena Pesada de Miosina (CHM)	R:gtggagctgggtatccttga // 51	750 pb
	F:tgtgaatgccaatgtgctt // 51	
Proteína Reguladora Miogénica (MyoD1)	R:gcgcccttatttgcacc // 52	500 pb
	F:aagcgccatctcttgagta // 52	

Los productos obtenidos fueron chequeados mediante electroforesis como se describió anteriormente. Como marcador utilizamos HyperLadder I de Boline.

6. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ADN.

Con el objeto de comparar las posibles modificaciones de metilación del DNA en las líneas células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (hASCs) y las inducidas a estirpe miogénica u osteogénica, se procedió a la extracción y análisis del DNA.

6.1. Extracción de DNA.

Para la obtención de DNA se uso el kit de QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Iberia, España) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Las células en cultivo se despegaron utilizando PBS-EDTA al 0,04%, durante 2-3 minutos tal y como se ha descrito anteriormente y fueron lavadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, recogiendo el pellet en un tubo eppendorff. Al pellet se le adicionó 200 µl de PBS, 20µl de proteinasa K junto y 200 µl buffer de lisis, incubándose durante 15 minutos a 56°C. A continuación, se añadieron 200 µl de etanol absoluto para precipitar los ácidos nucleicos y que puedan posteriormente quedar retenidos en la membrana de la columna del kit de extracción. La mezcla obtenida se depositó en la comuna que fue centrifugada durante un minuto a 8000 rpm. Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente. Tras eliminar el filtrado se comenzaron los lavados, primero con 500 µl del buffer AW1 (Qiagen) y tras centrifugar en las mismas condiciones anteriores se repitió el lavado con 500 µl del buffer AW2 (Qiagen). Tras centrifugar durante tres minutos a máxima velocidad (14000 rpm) se eliminó el filtrado y se realizó una centrifugación adicional sin nada gracias a la cual se eliminaron los posibles restos de alcohol de la columna. Para la elución del DNA, se utilizaron 25 µl de agua libre de DNAsas. Tras centrifugar un minuto a 10000 rpm el eluido que contiene el DNA de la muestra se cuantificó y se almacenó a -20°C.

6.2 Cuantificación del DNA.

El DNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech) en dilución 1.100, obteniendo datos de densidad óptica a 280, 260 y 320 así como la ratio de la muestra. En todos los casos se trabajó con muestras con una ratio comprendida entre 1,8 y 2.

6.3. Chequeo del DNA mediante electroforesis.

Para comprobar la calidad del RNA y ver que no quedaban restos de DNA en la muestra se procedió a cargar 100ng de DNA en un gel de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich) que posteriormente fue visualizado en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories, S.A.). Se siguió un protocolo similar al descrito previamente.

6.4. Estudios de metilación.

Los estudios de metilación del ADN, junto a los análisis de secuenciación, array de expresión y estudios de silenciamiento génico que se describen a continuación fueron realizados por el Grupo de Investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) dirigido por Dr. Manel Esteller y con especial colaboración y participación de la Dra. Maria Berdasco

Para realizar el estudio de los perfiles de metilación de ADN basado en microarrays se utilizó el sistema HumanMethylation2 BeadChip Infinium Metilación Arrays (Illumina, Inc.) que fue aplicado a todas las muestras.

El panel de estudio fue diseñado para comparar el estado de la metilación del DNA de las diferentes muestras, analizando 27.578 islas CpG lo que implica el estudio de 14.495 genes con una resolución de la metilación de un solo nucleótido. Esto permitiría un posterior estudio de tipificación mediante la técnica de bisulfito

aplicado a ADN. Las secuencias incluidas en el panel proceden de las bases de datos del National Cancer for Biotechnology Information: “consensus coding sequence (CCDS) database”. (Genome Build 36).

El array de metilación fue realizado de la siguiente forma: 1 μ g de ADN genómico obtenido de las diferentes muestras fue convertido mediante la técnica del bisulfito usando el CpGenomic™ DNA Modification Kit (Intergen Company, Compra, NY). Después del tratamiento con bisulfito, los siguientes ensayos se realizaron utilizando la tecnología Infinium (Illumina Inc, San Diego, CA), previamente descrito para ser usado en el genotipado de polimorfismo de nucleótidos simples (Steemers y cols., 2006) y siguiendo todas las instrucciones y reactivos del fabricante.

La PCR fue realizada con una etapa corta de desnaturalización (16 ciclos a 95°C durante 30 segundos, seguido de 50°C durante 1 hora) para mejorar el rendimiento de la conversión por Bisulfito. Después de la conversión de bisulfito, cada muestra fue amplificada y fragmentada enzimáticamente. El genoma completo convertido en bisulfito fue purificado y aplicado al sistema BeadChips (Illumina Inc, San Diego, CA). Durante la hibridación, las moléculas de ADN amplificadas del genoma fueron reconocidas por sondas ADN-específicas, existiendo dos sondas capaces de reconocer el estado metilado y no metilado de cada locus CpG. La unión alelo específica fue seguida de una fase de extensión simple utilizando dinitrofenilo y DNTPs marcados con biotina. Después de la fase de extensión, el array fue escaneado para determinar las intensidades de las señales de zonas con metilación y sin metilación.

Los valores de metilación del ADN (β -valor) fueron registradas para cada locus de cada muestra mediante el Software BeadStudio (Illumina Inc). El valor β de la metilación del ADN es una variable continua entre 0 (completamente no metilado) y 1 (completamente metilado). Los datos del microarray de metilación del ADN están disponibles en el National Cancer for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; número GSE33896).

6.5. Análisis de agrupamientos jerárquicos y definición de diferencias de metilación de CPG.

Se realizó agrupamiento jerárquico en todas las muestras estudiadas, utilizando la herramienta Cluster Analysis de la Versión 3.2 del software BeadStudio (Illumina Inc).

6.6. Secuenciación para la determinación del grado de metilación de clonos seleccionados.

Se determinó el estado de metilación de las islas CpG de los genes seleccionados, usando análisis por PCR de DNA modificado por bisulfito.

Después de esta PCR, se procedió a secuenciar 10 clones de cada secuencia y muestra para determinar su grado de metilación. Las secuencias correspondieron a los siguientes genes:

GENES	PRIMERS R y F	Tm(°C)
GENES Y PRIMERS		
CD79B	R:GGGGTAAGTATAGATAGAGGGGA	54
	F: AATAAAAACAAACCCCAACAAAC	
CDKL1	R: CAAAATCATCTTCTAATTCCAAA	59
	F: TTAGTTTTTTGAGTTGTTGGGA	
PIWI-like 2	R: GTAGGTTGGGTTTTTGTTTAAGT	58
	F: TAACCAAAAACAAAACCC	

Receptor-type tyrosineprotein phosphatase S (PTPRS)	R: TGTGGGGGAGATATTTAATTT	58
	F: CCTTCTACTACACAACCTCCAA	
Serum amyloid A1 (SAA1;	R: GTTTTGAGTGAGGTTTTGTTGT	58
	F: ATTTTCCCAATTTATCAAATC	
Solute carrier family 44 member 2 (SLC44A2)	R: GGGTTTTTTAGTTTGGGTAGTT	58
	F: TATTCTCTCAAACCCCCTC	
Transmembrane channel-like 8 (TMC8)	R: ACTCCRACACCCCAAAAA	62
	F: GTGTGTTTTTTTGAGAGTTGGAG	

7. MICROARRAYS DE EXPRESIÓN.

7.1. Extracción de ARN y Proceso de Microarray.

Se utilizó microarray de expresión para ver las diferencias en ARNm entre las células hASCs basales y las hASCs inducidas a la diferenciación. Para ello, se obtuvo ARN total (ver Apartado 5.1) y se prepararon ARN diana biotinilados a partir del mismo (200 ng de ARN total) siguiendo el protocolo de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Utilizando el kit de expresión Ambion WT se preparó ADNc bicatenario. El ARN complementario resultante se fragmentó aleatoriamente usando Uracil DNA

glicosilasa y endonucleasaapurínica/apirimidica 1, marcada con la transferasa terminal (kit de marcaje terminal de WT, Affymetrix) y se hibridó en el array de ST 16 de Human Gene 1.1 (Affymetrix). Las reacciones de hibridación fueron procesadas y escaneadas de acuerdo con el protocolo GeneTitan (Affymetrix), Todos los arrays fueron escalados en relación a un valor de intensidad de 100. Se usó la Consola (AGCC 2.0) y Consola de expresiones (EE 1.1) (Affymetrix, High Wycombe, Reino Unido) para los cálculos (fondo, ruido etc). Los valores indicativos de la cantidad de expresión (valor absoluto) se sometieron a un estudio estadístico (Affymetrix) usando datos de tres repeticiones biológicas.

Los datos del microarray nos permitieron identificar genes con expresión significativamente diferente entre las células hASCs basales y las hASCs inducidas a la diferenciación. El estudio estadístico fue realizado mediante la plataforma Affymetrix Human Gene 1.1 ST. Se consideraron genes diferencialmente expresados a aquellos con al menos un 20% de aumento de la expresión (fold change > 1.2) o un 20% de disminución de la expresión (fold change > 0.8) después de la inducción.

7.2. RT-QPCR de genes diferencialmente expresados.

Para corroborar la diferente expresión de genes entre células hASCs basales e inducidas a la diferenciación, se realizó RT-QPCR. ARN total (2µgr) se convirtieron en cDNA usando ThermoScript™ RT-PCR (Invitrogen) que incluye un oligo-dT como cebador, usando 0,20 µgr de CDNA y 5 pmol de cada primer y SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se realizaron tres mediciones usando Prism 7700 Sequence Detection (Applied Biosystems) Los genes analizados y los primers usados fueron:

GENES	PRIMERS R y F (5'-3')
Receptor-type tyrosineprotein phosphatase S (PTPRS)	R: ACTCGGCCAACTACACCTG F: GGCTGTGTTCTCAGTCACCA

Serum amyloid A1 (SAA1)	R: AGCCGAAGCTTCTTTTCGTT F: TTAGTTTTTTGAGTTGTTGGGA
PIWI-like 2	R: GTGGGTTGAGCTCGGTCTT F: TAACCAAAAACAAAACCCC
Osteopontin	R: CGCAGACCTGACATCCAGTA F: ATTCAACTCCTCGCTTTCCA
Alkaline phosphatase	R: TGAAATATGCCCTGGAGCTT F: GCCGATGTAATTGGCTTCTC
Desmin	R: TGATGGAATACCGACACCAG F: GCCTCATCAGGGAATCGTTA
Myocyte enhancer factor 2A	R: TGATGCGGAATCATAAAATCG F: GGCTGGTCACTGGAAGTGTG

8. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN.

Las células diferenciadas a linaje osteogénico y miogénico fueron analizadas mediante inmunohistoquímica. El medio de cultivo de las placas de 6 pocillos fue aspirado. Posteriormente las células fueron fijadas con formaldehído (Panreac) al 4% a pH 7.4 durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación se retiró el formaldehído y se lavó con H_2O_2 al 3% durante 20 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Se retiró el H_2O_2 y se procedió a la incubación en solución de suero bloqueante (Sigma, Saint Louis, MO, USA) durante 30 minutos. Se retiró la solución de suero bloqueante y se incubó con los anticuerpos primarios que fueron: 1) para la diferenciación osteogénica anticuerpos que reconocen a los antígenos PIWIL2 y amiloide sérico A1 (SAA1) y 2) para la diferenciación miogénica anticuerpos que reconocen a los antígenos PIWIL2 y el receptor-type tyrosine-protein phosphatase S (PTPRS). La incubación se mantuvo durante toda noche a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS (Sigma, Saint Louis,

MO, USA) una vez durante 5 minutos y se incubaron con Streptavidina-Peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución de Streptavidina-Peroxidasa y se añadieron 50 μ L de diaminobenzidina al 0.01% en peróxido de hidrógeno, DAB, incubando hasta que apareció, bajo control microscópico, la tinción deseada. Se lava nuevamente con PBS una vez durante 5 minutos y se prepara para la contracoloración con Hematoxilina de Mayer durante 3 minutos. Posteriormente se lava con agua bidestilada hasta que el agua salga sin coloración y finalmente se procede a observarse en el microscopio óptico.

ANTICUERPOS PRIMARIOS		
ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN: Blocking Buffer al 2%
PIWIL2	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/500
SAA1	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/500
PTPRS	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/800

9. RNA DE INTERFERENCIA.

Los estudios para determinar la relevancia del gen PIWIL2 en los procesos de diferenciación, se realizaron a través de la tecnología de RNA de interferencia diseñando tres siRNA para este gen. Los oligonucleótidos siRNA fueron clonados en un pLVX-shRNA2 Lentivirus (Clontech, Mountain View, CA). El silenciamiento de la expresión de PIWIL2 fue confirmado mediante inmunoblotting (ver Apartado 4). Los siRNA fueron específicos para las siguientes regiones del gen (expresados como 5'-3'):

GEN	PRIMERS R y F (5'-3')
PIWI-like 2	R:GTGGCCACAAGCTTCTAAACTTCAAGAGAGTTT AGAAGCTTGTGGCCATTTTTTACGCGT
	F:ACGCGTAAAAAATGGCCACAAGCTTCTAAACT CTCTTGAAGTTTAGAAGCTTGTGGCCAC
PIWI-like 2	R:GTGCTAATCTGGTACGCAAGTTCAAGAGACTT

	GCGTACCAGATTAGCATT TTTTACGCGT
	F:ACGCGTAAAAAATGCTAATCTGGTACGCAAGT CTCTTGA ACTTGCGTACCAGATTAGCAC
PIWI-like 2	R:GCCTACAAGTGCTATGGTACTTCAAGAGAGTA CCATAGCACTTGTAGGTT TTTTACGCGT
	F:ACGCGTAAAAAACCTACAAGTGCTATGGTACTC TCTTGAAGTACCATAGCACTTGTAGGC

Como control negativo, los siguientes cebadores fueron usados:

Secuencia del Cebador
R:GCGCAGAACA AATTCGTCCATTCAAGAGATGGACGAATTTGTTCTGCG TTTTTTAC
F:ACGCGTAAAAACGCGAGAACA AATTCGTCCATCTCTTGAATGGACGAA TTTGTTCTGCGC

10. REVERSIÓN DE LOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN.

Las células diferenciadas a linaje miogénico y osteogénico fueron analizadas después de someterlas a un proceso de reversión de la diferenciación. El proceso consistió en mantener los cultivos en ausencia de los respectivos factores de inducción. En el caso de la diferenciación miogénica la privación se mantuvo durante 21 días, y en el caso de la diferenciación osteogénica de 14 días. Tras este periodo, las células volvieron a ser sometidas a los estudios de diferenciación previamente descritos (morfológico, de metilación y expresión génica).

IV. RESULTADOS.

1. AISLAMIENTO DE (hASCs) A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO.

Tras el proceso de aislamiento celular a partir de lipoaspirado de grasa, se realizó un conteo celular para sembrar 500.000 células en falcons se 25 cm², que fueron incubados a 37°C con el 5% de CO₂ y observados al microscopio óptico de forma periódica cada 3 días (Figura 1).

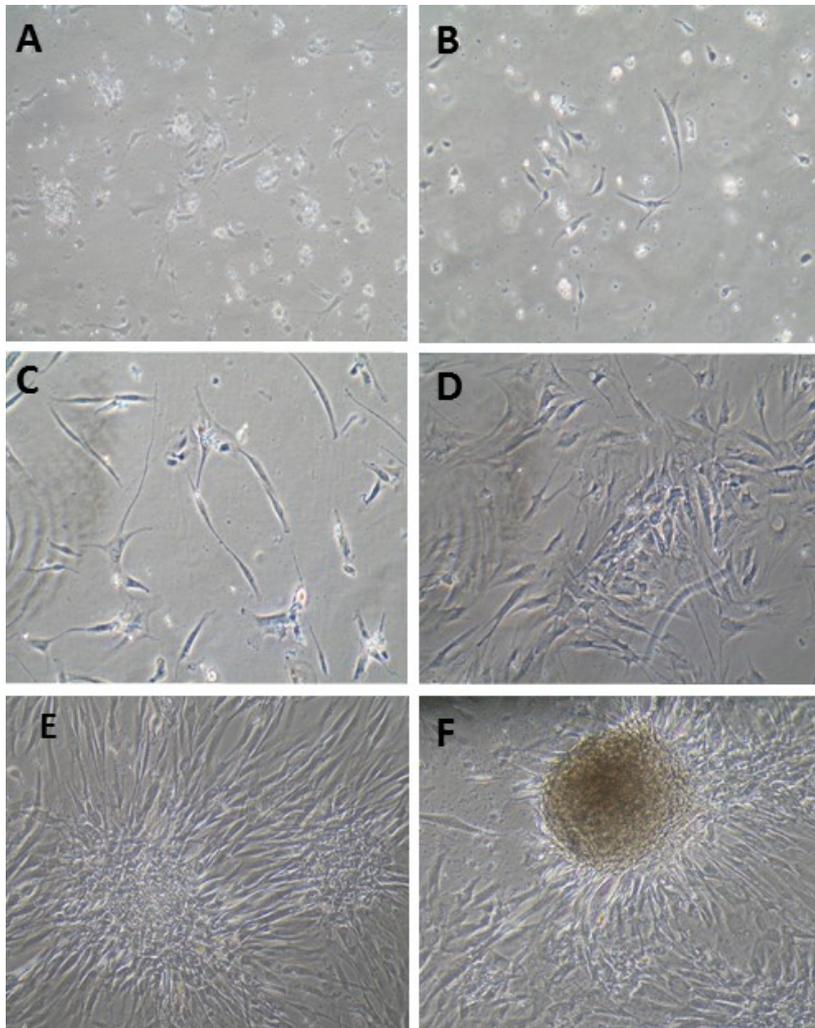


Figura. 1. Microscopía óptica de las células obtenidas tras el procesamiento del lipoaspirado. (A) 3 días en cultivo. (B) 5 días en cultivo. (C) 8 días en cultivo. (D) 10 días en cultivo. (E) 13 días en cultivo. (F) 16 días en cultivo. Magnificación 10X.

En los cultivos obtenidos pudimos observar que hasta los 5 días permanecían gran cantidad de células sanguíneas no adheridas al material plástico, que fueron muriendo y desapareciendo tras sucesivos lavados con PBS (Figura 1). Adherida al plástico, durante este periodo se observaron pequeñas células de morfología fusiforme similar a la de los fibroblastos, que fueron proliferando hasta generar núcleos de proliferación a partir de los 13 días de cultivo.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS hASCs.

2.1. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS hASCs.

El análisis inmunofenotípico (Figura 2), se realizó a los 20 días de cultivo y de mostró que más del 95% de las células eran positivas para los marcadores mesenquimáticos CD90, CD73 y CD105 y que menos del 5% expresaban marcadores los hematopoyéticos CD34, CD45 y CD133 cumpliendo por tanto uno de los criterios la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT International Society for Cellular Therapy) establecida en 2006.

3. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS hASCs.

Para este estudio, las células hASCs fueron cultivadas durante 28 días en medio de cultivo suplementado con dexametasona, ácido ascórbico, glicerol fosfato y suero fetal bobino al 10%. Las células obtenidas fueron analizadas para determinar el grado de consecución del proceso de diferenciación hacia un linaje osteogénico.

3.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.

El análisis morfológico por microscopía óptica se realizó durante todo el proceso de inducción, a intervalos de 3 días. La Figura 3, muestra una representación de las

modificaciones morfológicas más relevantes que se observaron que fueron evidentes a los 7 días de inducción.

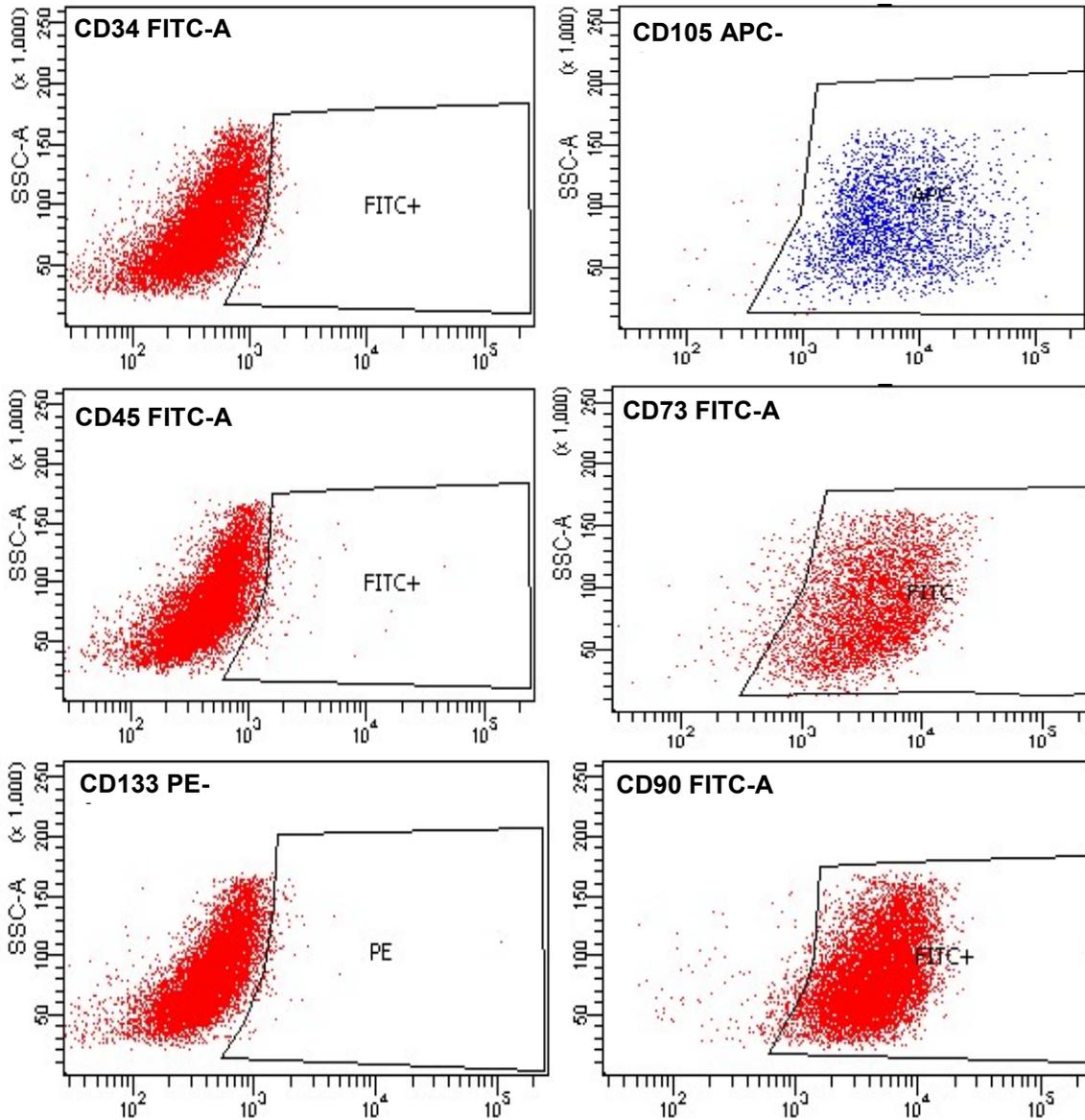


Figura 2. Caracterización mediante citometría de flujo de las hASCs. Los anticuerpos primarios estaban marcados con FITC en el caso de CD34, CD45, CD73 y CD90, con ficoeritrina (PE) el CD133 y con alofococianina (APC) el CD105.

Como se puede observar en la Figura 3, a partir del día 7 disminuyó el tamaño celular, perdiendo su morfología fibroblastoide típica y formando nódulos de mineralización a partir del día 12 (Figura 3C), que fueron incrementando progresivamente hasta el día 28 (Figura 3F).

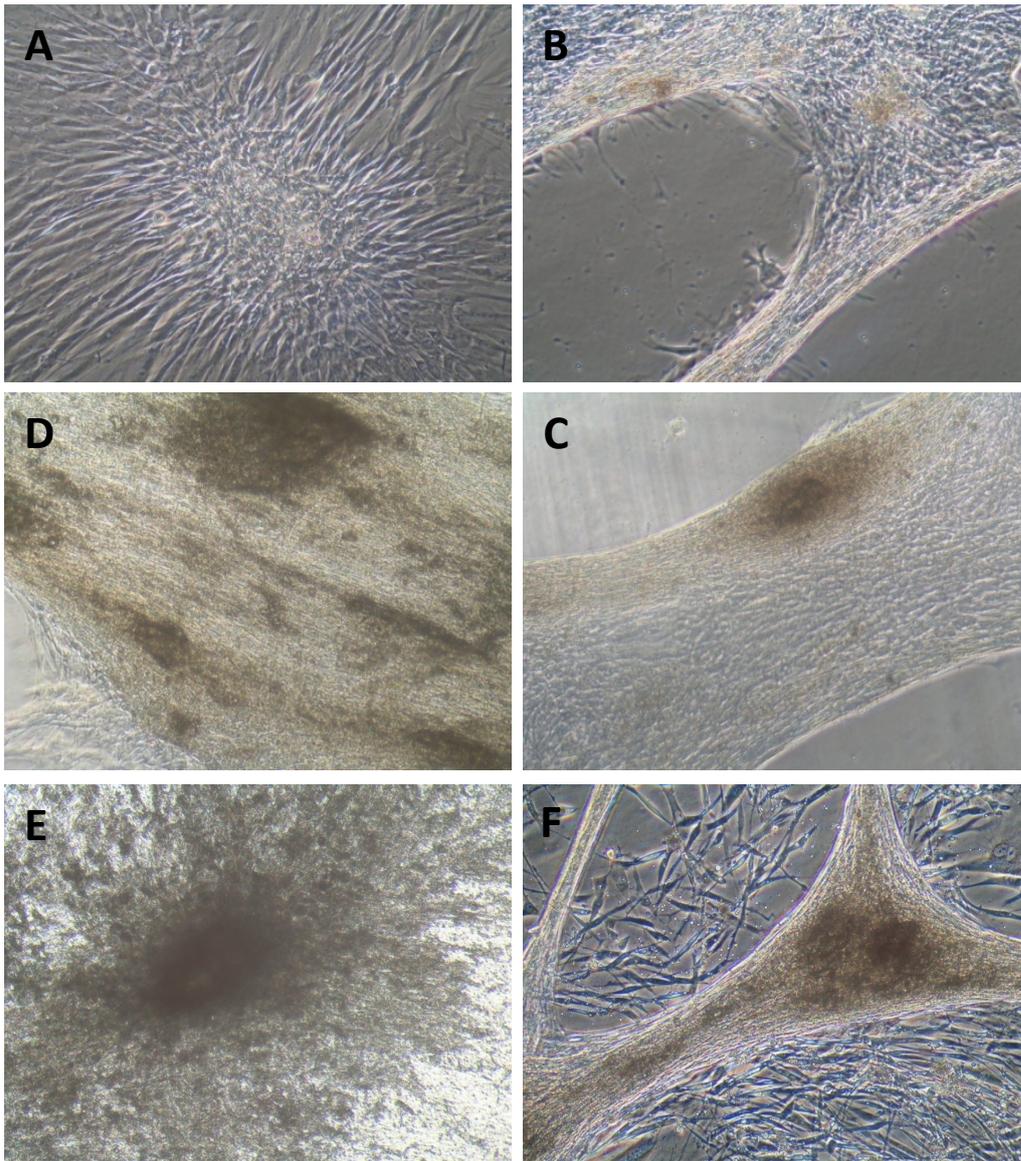


Figura 3. Microscopía óptica de las hASCs inducidas a diferenciación osteogénica. A) Día 1; B) Día 7; C) Día 12; D) Día 15; E) Día 20 y F) Día 28. Magnificación 10X.

El estudio realizado mediante microscopía electrónico de transmisión demostró la presencia de células de morfología fusiforme de gran tamaño, con voluminosos núcleos redondeados y escaso retículo sarcoplásmico rugoso (Figuras 4A y 4B). Tras el proceso de inducción osteogénica, podemos observar un incremento de las fibras de colágeno (Figuras 4C y 4D), de las interacciones celulares y del retículo sarcoplásmico rugoso (Figuras 4E y 4F).

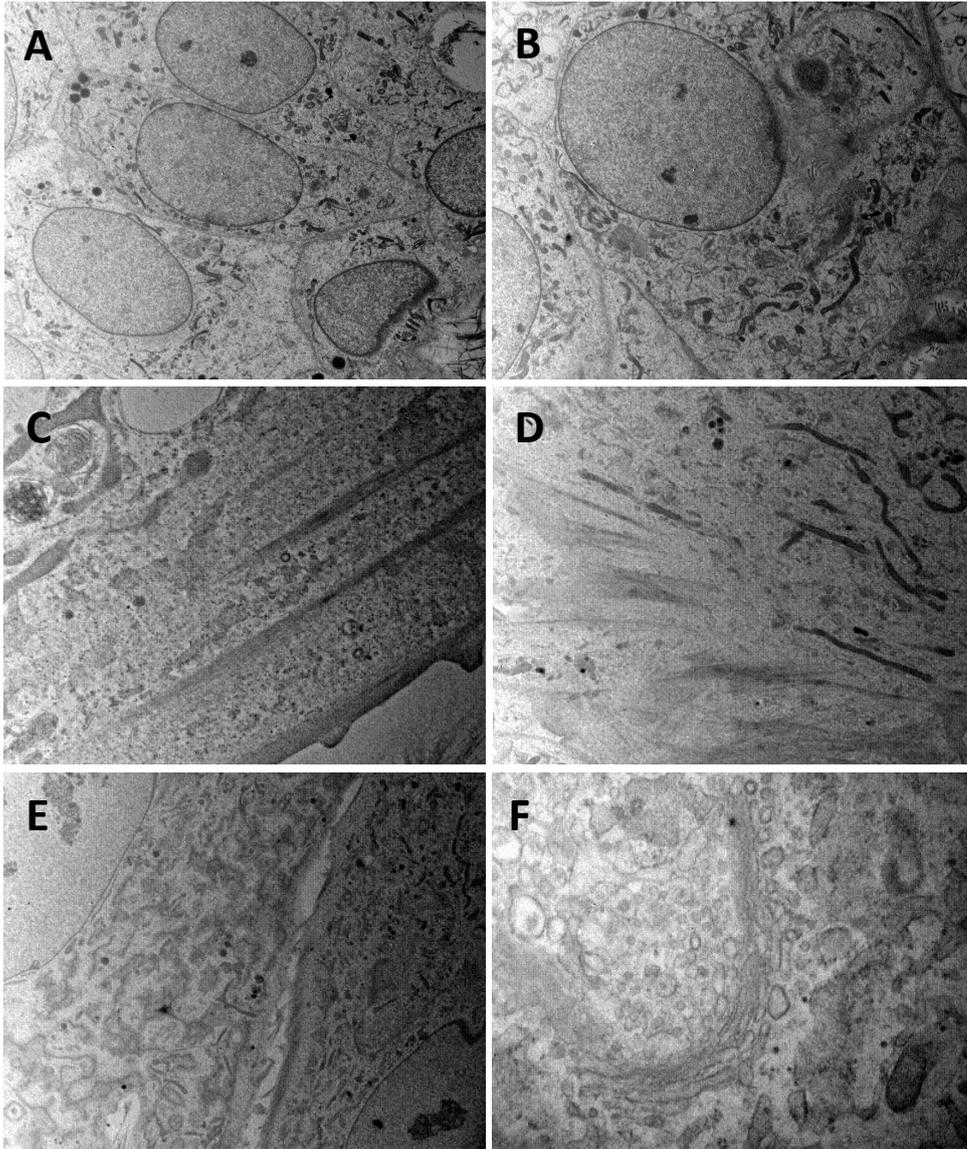


Figura 4. Microscopía Electrónica de Transmisión de las hASCs inducidas a diferenciación osteogénica. A y B, son imágenes representativas de hASCs control; C, D, E y F, hASCs tras la inducción osteogénica.

Finalmente, la microscopía electrónica de barrido (SEM), nos permitió observar una desestructurada red trabecular (Figura 5) que podría ser el inicio de la organización del cultivo para formar tejido óseo esponjoso. El análisis de dispersión de energía por rayos X realizado por el SEM nos permitió detectar la presencia de picos de calcio, demostrando que se estaba produciendo una mineralización del tejido (Figura 5C).

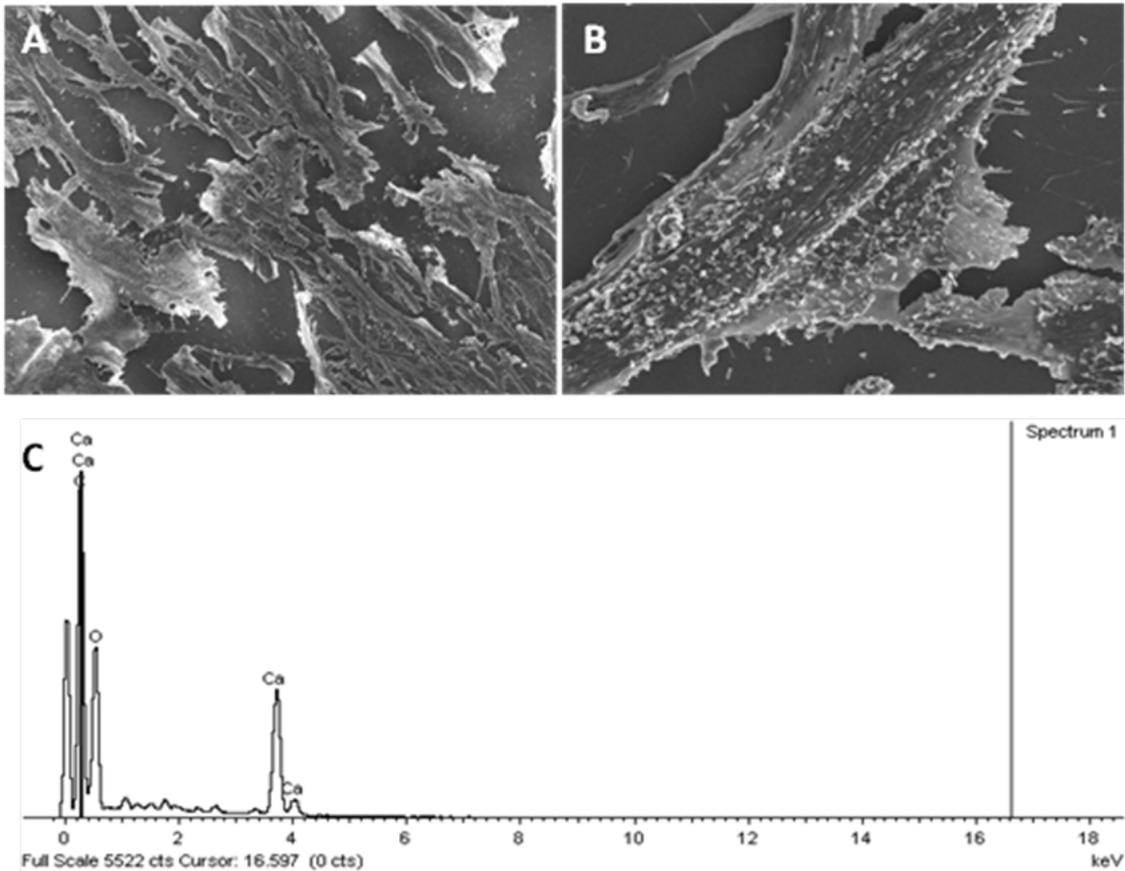


Figura 5. Microscopía Electrónica de Barrido de las hASCs inducidas a diferenciación osteogénica (A y B) análisis de difracción de rayos X del SEM. A, Magnificación 823 X; B, Magnificación 7000 X.

3.2. TINCIÓN CON ROJO DE ALIZARINA.

Para determinar el grado de diferenciación osteogénica alcanzado, se realizó una tinción con rojo de alizarina, colorante que es utilizado para determinar la presencia de depósitos de calcio y por tanto la mineralización de la matriz, necesaria para la constitución de la matriz extracelular del tejido óseo.

La tinción fue negativa para las hASCs utilizados como control (Figura 6), y de gran intensidad, mostrando amplios depósitos de calcio, al final del proceso de inducción (28 días). Los estudios realizados también demostraron que incluso en la fase media de la inducción (14 días) ya podían observarse marcaje intenso en pequeños núcleos distribuidos por el cultivo celular.

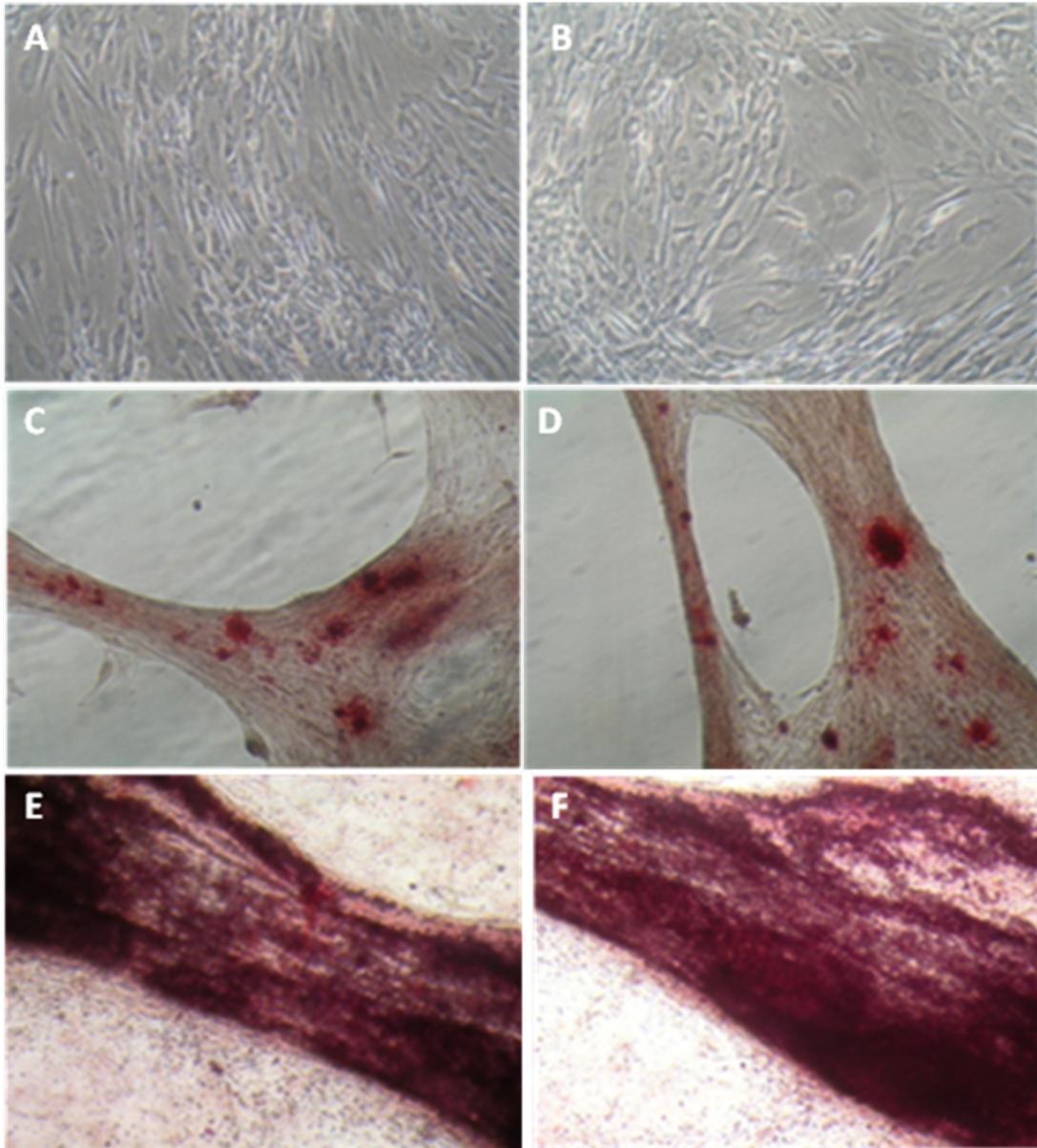


Figura 6. Tinción con Rojo de Alizarina de las hASCs tras el proceso de inducción osteogénica. A y B, hASCs control; C y D, 14 días de inducción; E y F, 18 días de inducción. Magnificación 10 X.

3.3. ANÁLISIS POR WESTERN-BLOT DE MARCADORES OSTEOGÉNICOS.

Los resultados obtenidos en el análisis por western blot, demostraron que tanto los cultivos de hASCs como los obtenidos tras el proceso de inducción osteogénica (hASCs-MIO) presentaban una expresión diferencial de marcadores tempranos y tardíos de diferenciación osteoblástica. Los resultados demuestran que en las hASCs existe una pequeña expresión de los marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica como fosfatasa alcalina, que incrementa tras el proceso de inducción osteogénica (Figura 7). Sin embargo, no existe expresión de osteocalcina, marcador tardío de la diferenciación osteoblástica u osteopontina en las hASCs, que si puede ser observada en las hASCs-MIO.

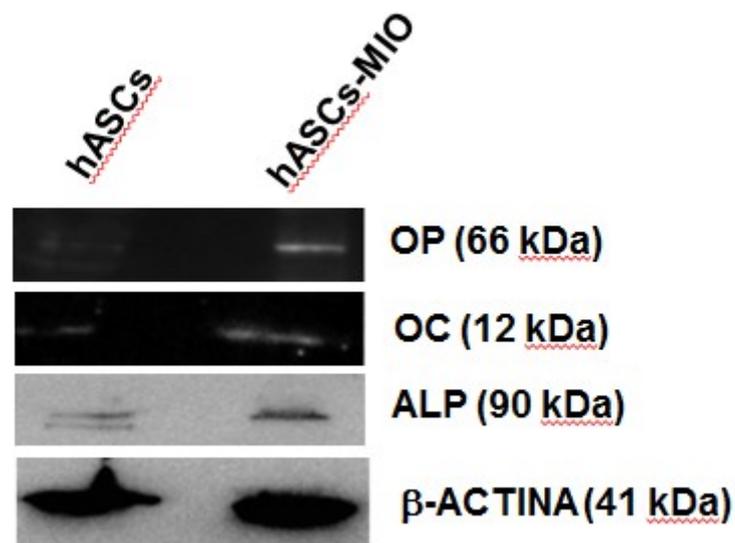


Figura 7. Análisis de los niveles de proteínas osteogénicas mediante Western Blot: Osteopontina (OP); Osteocalcina (OC); Fosfatasa Alcalina (ALP). β-actina fue utilizada como control.

3.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES OSTEOGÉNICOS.

El estudio mediante RT-PCR de los marcadores osteogénicos confirmó los obtenidos mediante western blot, no existiendo expresión de osteocalcina y osteopontina en hASCs. Por el contrario, si encontramos bajos niveles de expresión

de osteonectina en dichas células. En los tres casos, la expresión incrementó en las hASCs-MIO (Figura 8).

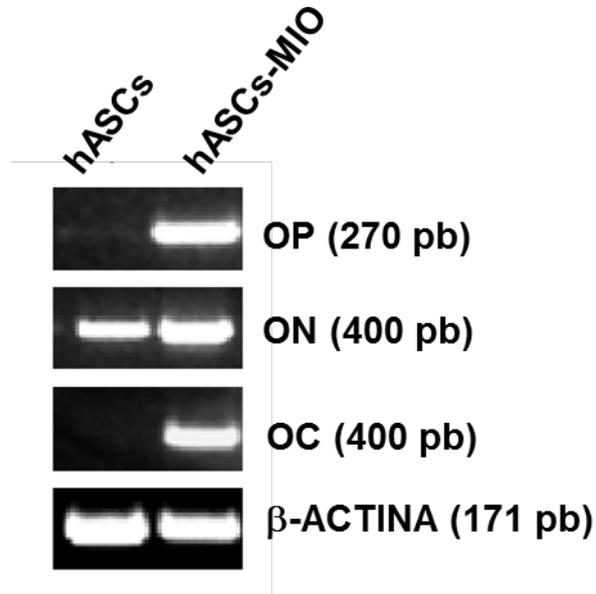


Figura 8. Análisis mediante RT-PCR de los marcadores de diferenciación osteogénica. Osteopontina (OP); Osteocalcina (OC); Osteonectina (ON). β -actina fue utilizada como control.

3.4. ESTUDIOS DE MICROARRAY EN hASCs-MIO.

Se analizó mediante arrays Infinium 27K Illumina el estado de metilación del ADN de 27578 sitios CpG del genoma humano en cuatro muestras de hASCs y tres muestras de hASCs-MIO. Las distintas muestras de cada uno de los tipos celulares presentaban gran homogeneidad como ilustra la Figura 9A, y una gran similitud en sus patrones de metilación.

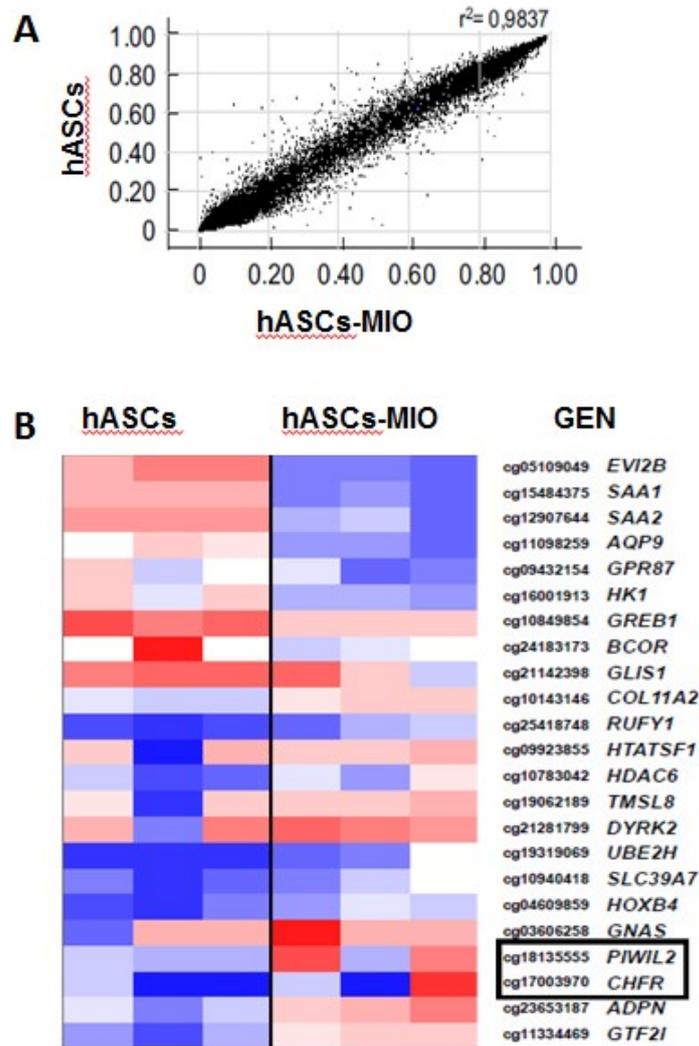


Figura 9. Estudio de la metilación específica de promotores durante el proceso de diferenciación osteogénica. **A)** Representación bidimensional de la metilación en hASCs frente a hASCs-MIO; **B)** Genes con CpG diferencialmente metilados en hASC y HASCs-MIO.

No obstante, se encontraron 23 genes que mostraron diferencias en el patrón de metilación de sus CpG tras el proceso de diferenciación (Figura 9B). Estos datos de metilación observados en los microarrays fueron corroborados mediante la secuenciación genómica con bisulfito de múltiples clones de los genes *SAA1* que presentaba un promotor con escasas CpG, y *PIWIL2* con un extremo 5' asociado a la isla CpG. El resultado del bisulfito demostró la hipermetilación de las islas CpG del promotor del gen *SAA1* en las hASCs, mientras que se encontró hipometilado en hASCs-MIO (Figura 10). Por el contrario, los resultados obtenidos en el gen *PIWIL2*

mostraron la hipometilación de las islas CpG del promotor en las hASCs y su hipermetilación en las sometidas al proceso de diferenciación osteogénica (Figura 11).

Estos datos fueron corroborados por el estudio de expresión de ambos genes mediante RT-qPCR. La disminución de un 45% de la metilación de las CpG del promotor del gen *SAA1* en las hASCs-MIO respecto las hASCs se tradujo en un gran incremento en la expresión de dicho gen como se muestra en la Figura 11.

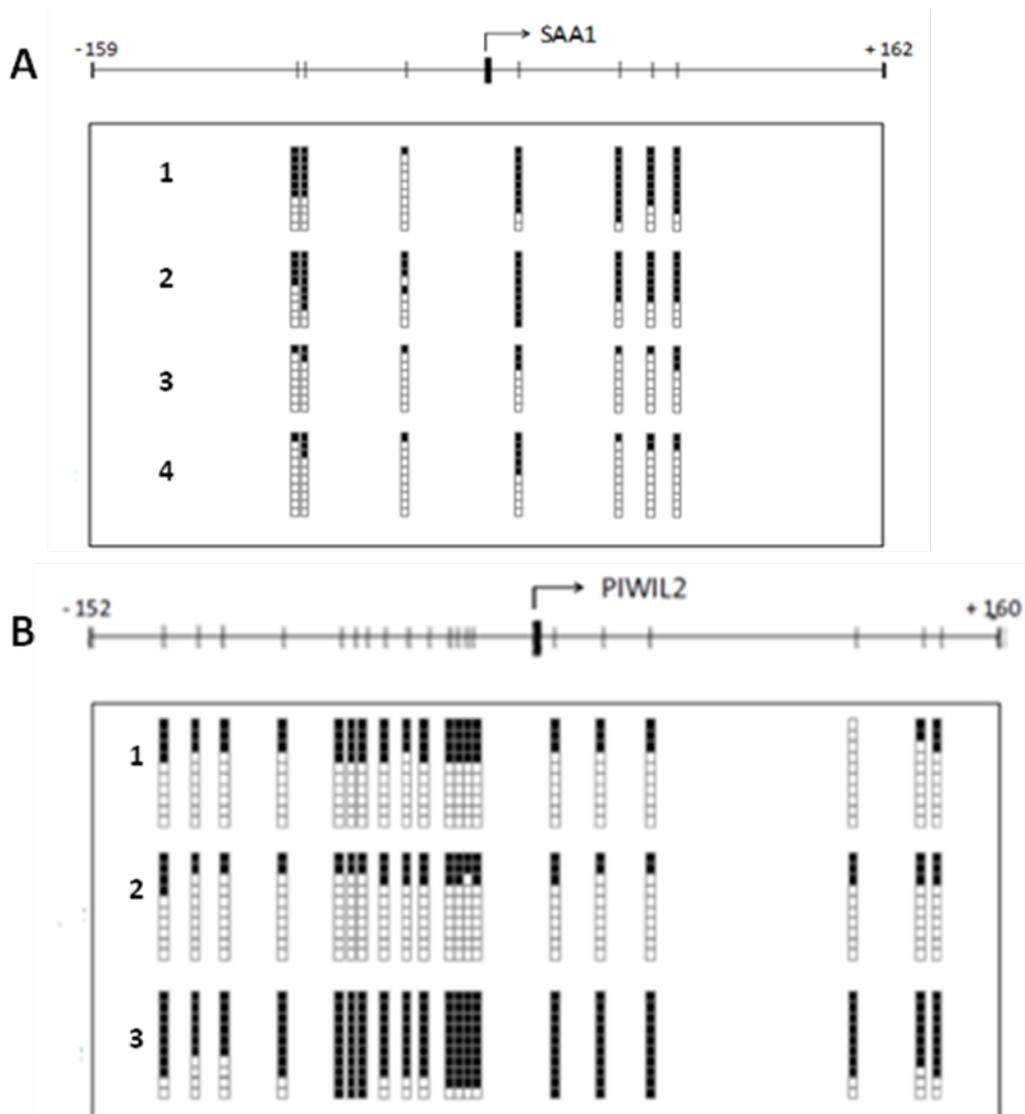


Figura 10. Análisis del estado de metilación por secuenciación genómica con bisulfito de las CpG del promotor de los genes *SAA1* (A) y *PIWIL2* (B) tras la inducción osteogénica de las hASCs. Los dinucleótidos CpG se representan mediante cortas líneas verticales y mediante los cuadros blancos y negros se indica

la presencia de citosinas metiladas y no metiladas, respectivamente. hASCs (1 y 2), hASCs-MIO (3 y 4).

En contraste, el incremento en la metilación de las CpG del promotor de PIWIL2 en las hASCs-MIO provocó una drástica disminución de su expresión respecto a las hASCs (Figura 11).

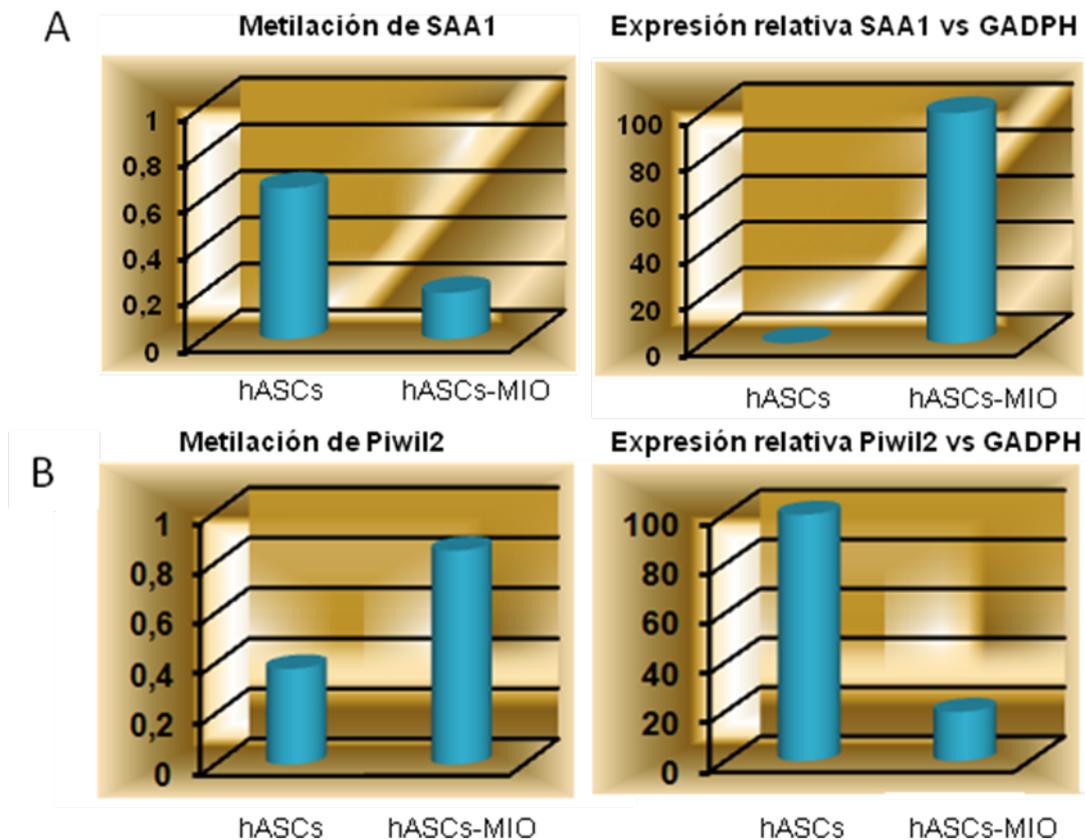


Figura 11. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de SAA1 (A) y PIWIL2 (B) tras la inducción osteogénica de las hASCs.

3.5. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN DE SAA1 Y PIWIL2.

Finalmente, para completar el estudio de la modificación de la expresión de los genes que han cambiado su estado de metilación como consecuencia de la inducción osteogénica de las hASCs, realizamos un estudio inmunohistoquímico

para determinar si la hipometilación de SAA1 en hASCs-MIO se correspondía con un incremento de su expresión protéica. Como se puede observar en la Figura 12, mientras que la tinción con SAA1 es muy débil en hASCs, es de gran intensidad en hASCs-MIO, demostrando por tanto el incremento en su expresión. En contraste, en el caso de PIWIL2, su hipermetilación en hASCs-MIO debe corresponderse con una disminución de la expresión en relación a las hASCs. La Figura 12C, muestra el marcaje positivo para PIWIL2 en las hASCs que practicamente desaparece en las hASCs sometidas al proceso de inducción osteogénica (Figura 12 D).

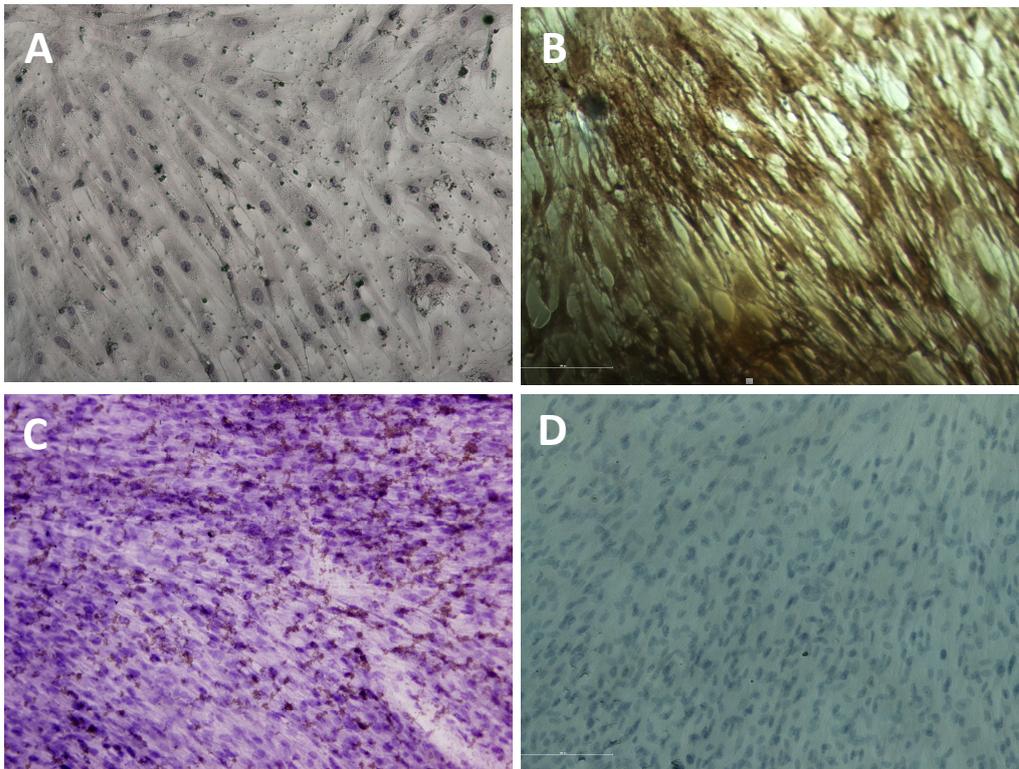


Figura 12. Expresión determinada mediante inmunohistoquímica de SAA1 y PIWIL2 de las hASCs sometidas al proceso de diferenciación osteogénica. A y B, representan el marcaje con el anticuerpo de SAA1 en hASCs y hASCs-MIO respectivamente; C y D, corresponden a la tinción con PIWIL2 en hASCs y hASCs-MIO respectivamente. Magnificación 10X.

3.6. REVERSIÓN DE hASCs DIFERENCIADAS A LINAJE OSTEOGÉNICO.

Para determinar la estabilidad de la inducción osteogénica obtenida y la influencia de la modificación de los perfiles epigenéticos y del microambiente circundante, analizamos los cambios que sufren las hASCs-MIO al someterlas a la privación de los factores de inducción osteogénica durante 14 días.

3.6.1. Estudios Morfológicos.

Como se muestra en la Figura 13A y 13B, el incipiente tejido óseo que se había desarrollado durante el proceso de diferenciación se va desorganizando, disminuyendo la densidad celular y desapareciendo los núcleos de mineralización del tejido. Las células adquieren de nuevo una morfología de tipo fibroblastoide, similar a la población de hASCs.

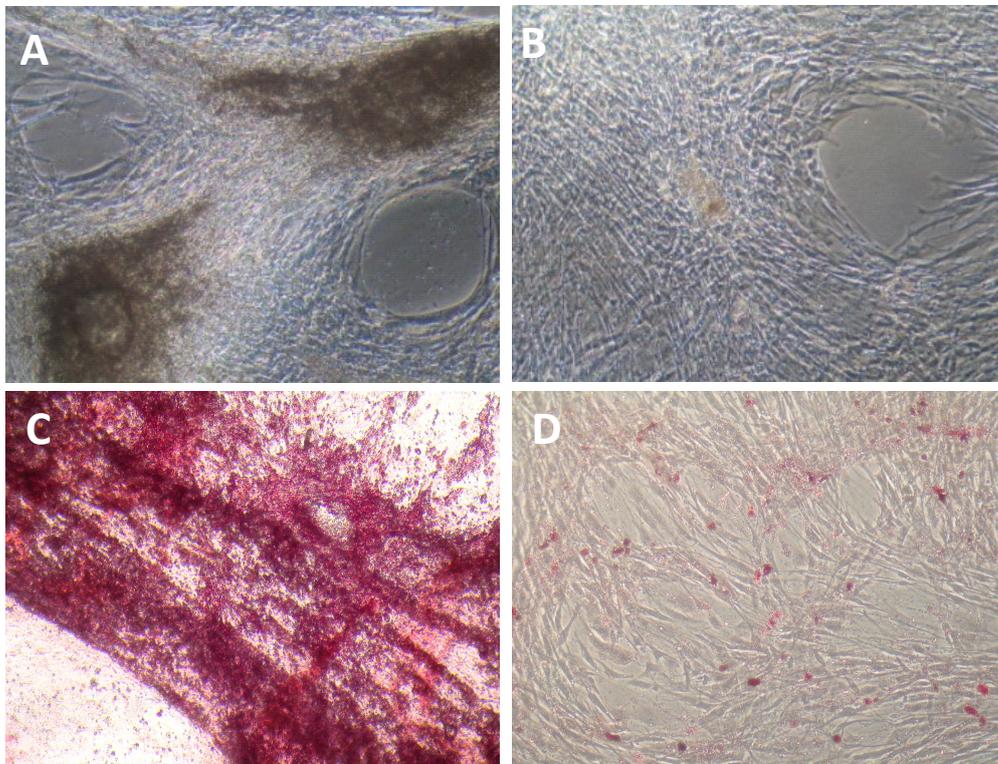


Figura 13. Microscopía óptica y tinción con alizarina de las hASCs-MIO cultivadas durante 14 días en ausencia de factores de inducción osteogénica. A y C,

morfología y tinción con alizarina de las hASCs-MIO; B y D, morfología y tinción con alizarina de las hASCs-MIO sin factores de inducción.

3.6.2. Tinción con Rojo De Alizarina.

La tinción con Rojo de Alizarina de las hASCs-MIO sometidas a un proceso de privación de factores de inducción osteogénico confirmó una drástica disminución de la tinción, que apareció de forma puntiforme distribuida por todo el cultivo, demostrando una clara disminución de los depósitos de calcio (Figura 13D).

3.6.3. Análisis de Metilación y Expresión de SAA1 y PIWIL2.

Para determinar si los cambios morfológicos y la disminución de los depósitos de calcio observados como consecuencia del cultivo de las hASCs-MIO en ausencia de factores de inducción osteogénico se relacionaba con el estado de SAA1 y PIWIL2, realizamos un estudio de metilación mediante la técnica de bisulfito. Los resultados obtenidos confirman una alteración completa de los perfiles de metilación, observándose de nuevo una hipermetilación de la isla CpG del promotor SAA1 y una hipometilación de la isla CpG de PIWIL2 (Figura 14).

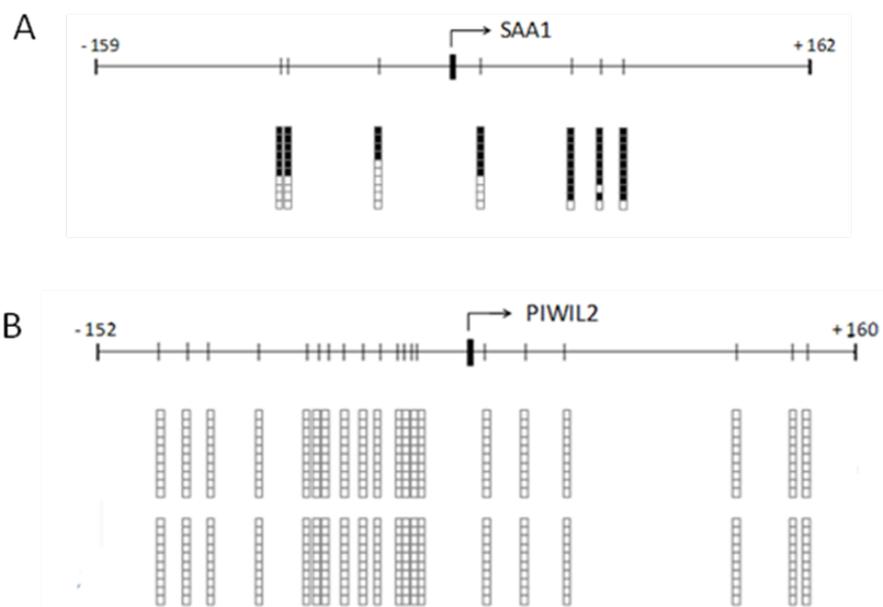


Figura 14. Análisis de secuenciación genómica con bisulfito de los promotores de los genes *PTPRS* y *PIWIL2* en células sometidas a privación de factores de inducción osteogénica durante 14 días. La presencia de citosinas metiladas o no

metiladas se indica mediante un cuadro negro o blanco, respectivamente. A, SAA1; B, PIWIL2.

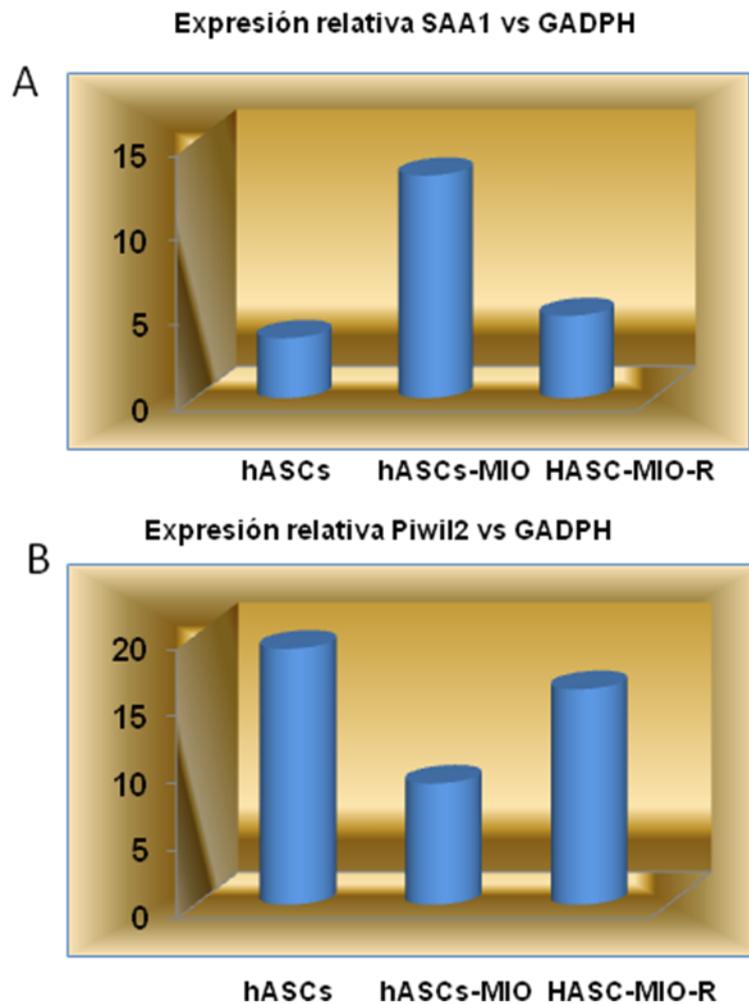


Figura 15. Determinación mediante RT-qPCR de la expresión de SAA1 y PIWIL2 tras someter a las hASCs-MIO a una privación de factores de inducción osteogénicos durante 14 días (hASCs-MIO-R). Como control positivo se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). A, SAA1; B, PIWIL2.

3.7. SILENCIAMIENTO DE PIWIL2.

Los resultados obtenidos indican el papel fundamental que desempeña PIWIL2 en el proceso de diferenciación osteogénica. Para confirmar dichos datos llevamos a cabo un proceso de silenciamiento de dicho gen en las hASCs utilizando tres

siRNA con dsintitas secuencias que reconocen PIWIL2. Como muestra la Figura 16, los tres RNA de interferencia permitieron silenciar la expresión de este gen cuando fue analizada mediante RT-PCR y western blot. Para determinar el efecto provocado por el silenciamiento génico, determinamos periódicamente a los 5, 10, 15, 20 y 25 día, la modificación en la expresión de marcadores osteogénicos como fosfatasa alcalina y osteopontina mediante RT-qPCR que incrementaron su expresión a los de 20 días del silenciamiento de PIWIL2 (Figura 16).

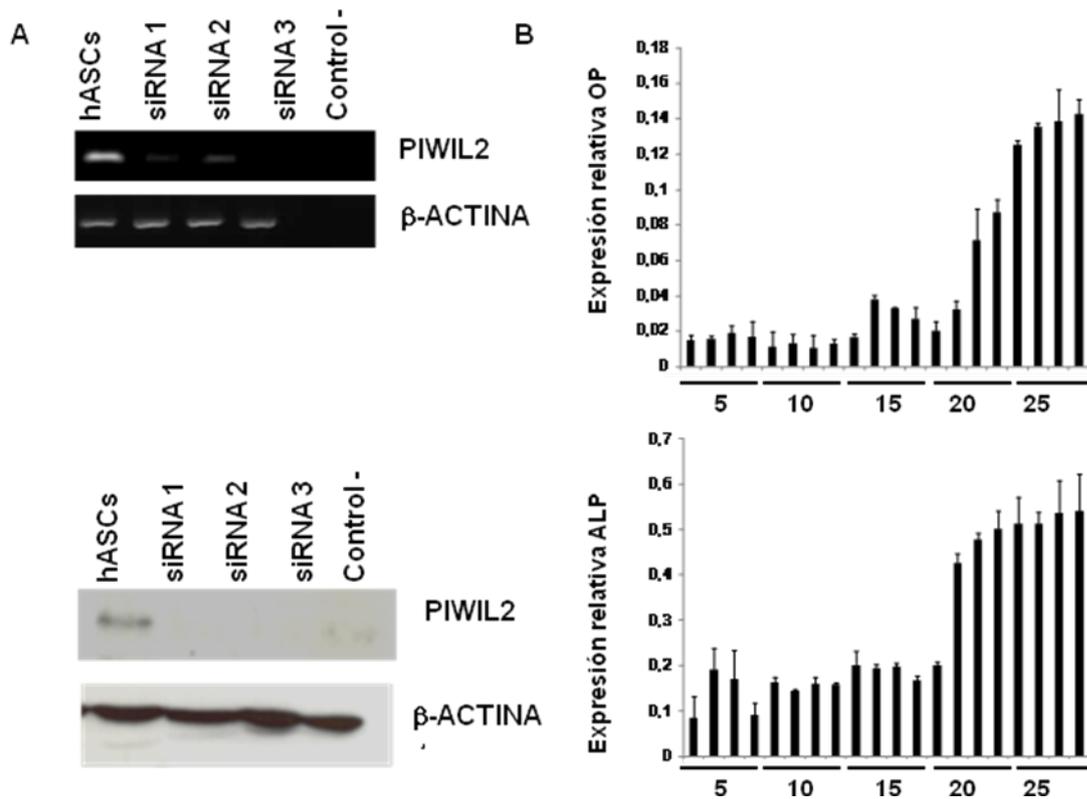


Figura 16. Silenciamiento génico de PIWIL2 en hASCs. A) Determinación del silenciamiento mediante RT-PCR y Western Blot; B) RT-qPCR de osteopontina (OP) y fosfatasa alcalina (ALP). Como control positivo se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para la RT-qPCR y β -actina para el western blot y la RT-PCR.

4. DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS hASCs.

Las hASCs fueron cultivadas durante 42 días en medio de cultivo suplementado con hidrocortisona y suero de caballo, El cultivo obtenido fue caracterizado mediante

el análisis morfológico e inmunohistoquímico de los principales marcadores de diferenciación miogénica.

4.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.

De forma espontánea, en una de las cinco inducciones miogénicas (hASCs-MIM) se observó la presencia de elementos restringente similares a los adipocitos, por lo que realizamos una tinción con Oil red, para confirmar la presencia de este tipo celular (Figura 17).

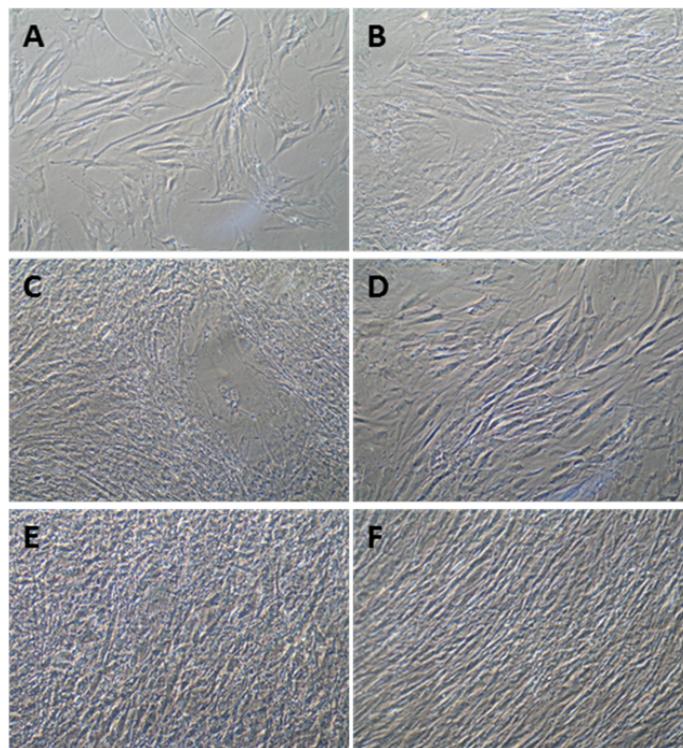


Figura 17. Morfología de las hASCs sometidas a inducción miogénica durante 42 días. A) hAscs control; B) a los 2 días; C) A los 10 días; y D) A los 20 días; E) A los 30 días; F) A los 42 días. Magnificación 10X.

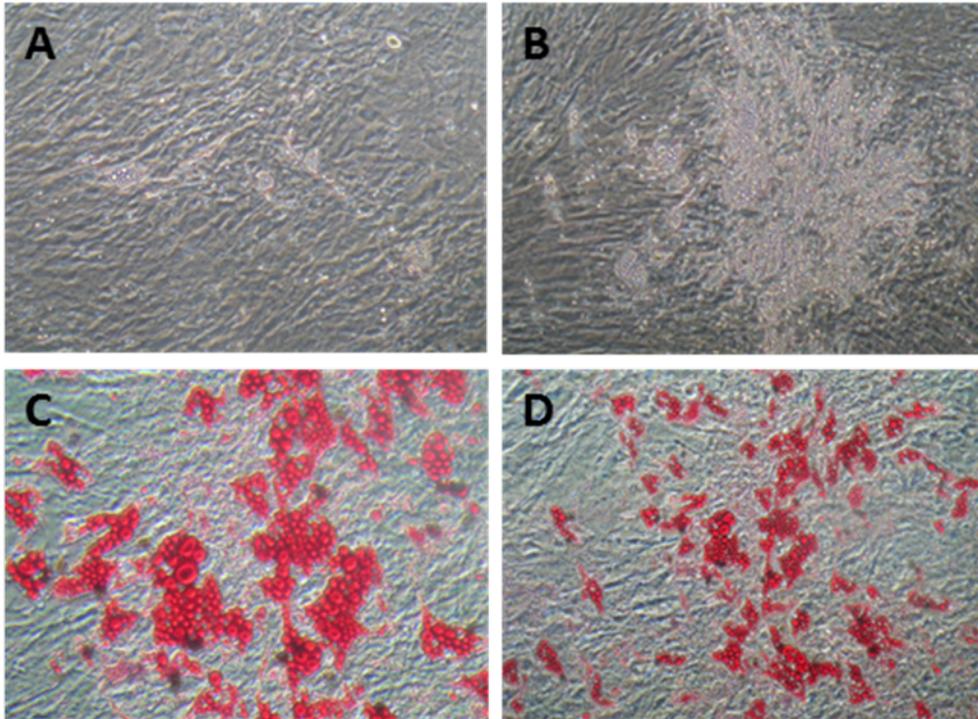


Figura 18. Tinción con Oil Red de las hASCs diferenciadas espontáneamente a adipocitos. A y B, Imagen representativa de las hASCs diferenciadas a adipocitos; C y D, tinción con Oil Red de los adipocitos. Magnificación 10X.

El análisis mediante microscopía electrónica (TEM), nos permitió observar la presencia de células fusiformes, típicas del tejido muscular.

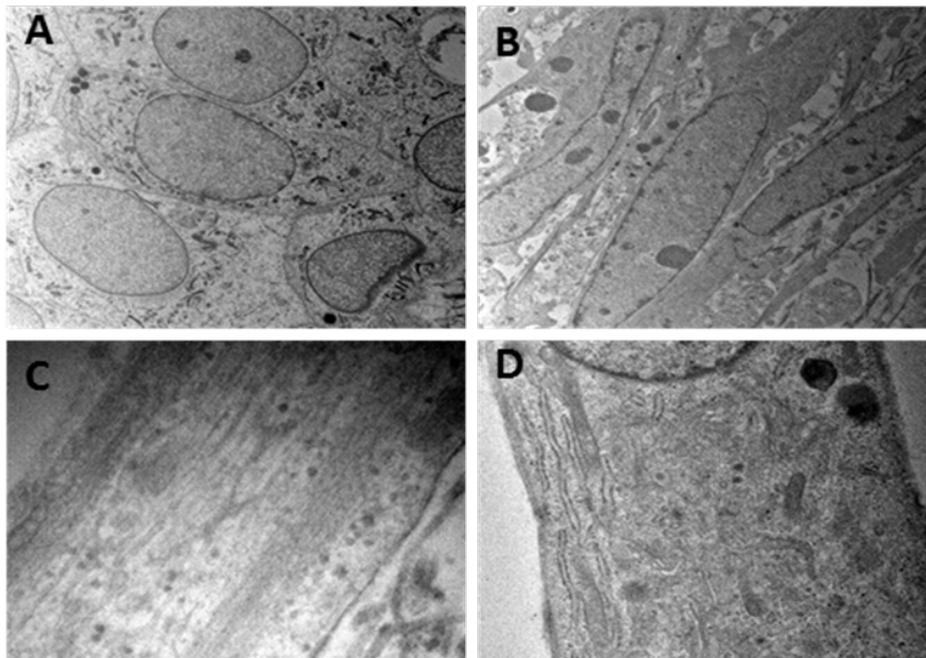


Figura 19. Microscopía Electrónica de Transmisión de las hASCs inducidas a diferenciación ostogénica. A, imagen representativa de hASCs control; B, C y D, hASCs tras la inducción miogénica.

Las células son multinucleadas y con abundantes filamentos proteicos pertenecientes al citoesqueleto celular, responsable del proceso de contracción. Además, se encontró un incremento de retículo endoplásmico rugoso en relación a las hASCs (Figura 19).

4.2. ANÁLISIS POR INMUNOFLOURESCENCIA DE MARCADORES MIOGÉNICOS.

Para determinar el grado de diferenciación miogénica alcanzado tras el proceso de inducción realizamos un estudio de expresión proteica de las principales proteínas de filamentos delgados, gruesos e intermedios típicos de la célula muscular estriada.

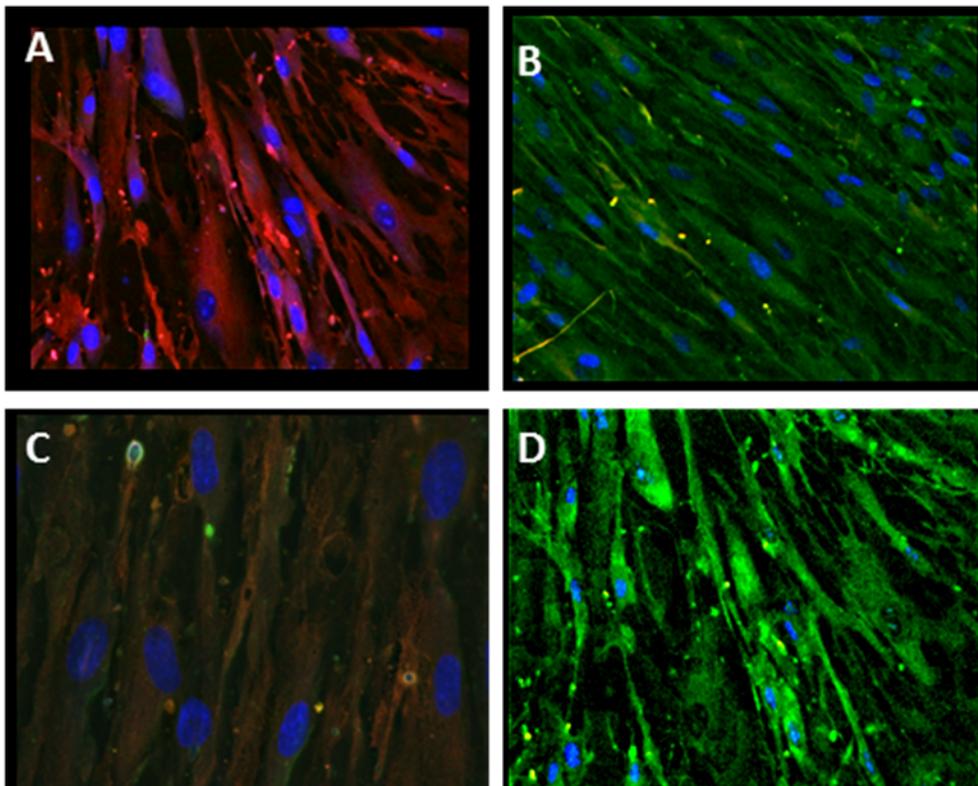


Figura 20. Inmunofluorescencia de hASCs sometidas durante 5 semanas al proceso de diferenciación miogénica. A) Actina-PE; B) Troponina-FITC; C) Actinina-PE; D) Desmina-FITC. Los núcleos fueron teñidos de azul con DAPI. Magnificación 10X (A, B y D) y 20X.

La actina, principal proteína de filamentos delgados, y la troponina fundamental para la interacción con el calcio y con el resto de proteínas de filamentos delgados en el proceso de contracción presentaron un intenso marcaje en las hASCs-MIM en contraste con las hASCs en las que el marcaje fue nulo. De igual forma, la actinina de filamentos gruesos también incrementó su expresión en las células sometidas al proceso de inucción miogénica. Finalmente, también pudimos observar un intenso marcaje en la desmina, proteína de filamentos intermedios (Figura 20).

4.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.

Para comprobar la correcta diferenciación, mediante la técnica de RT-PCR también se estudió la expresión de los marcadores específicos miogénicos: Como se puede observar en la Figura 21, tanto la cadena pesada de la miosina, de filamentos gruesos como la desmina de filamentos intermedios presentaron una elevada expresión en contraste con las hASCs. De igual forma, encontramos una elevada expresión de factores de transcripción, como MyoD1 en las hASCs-MIM.

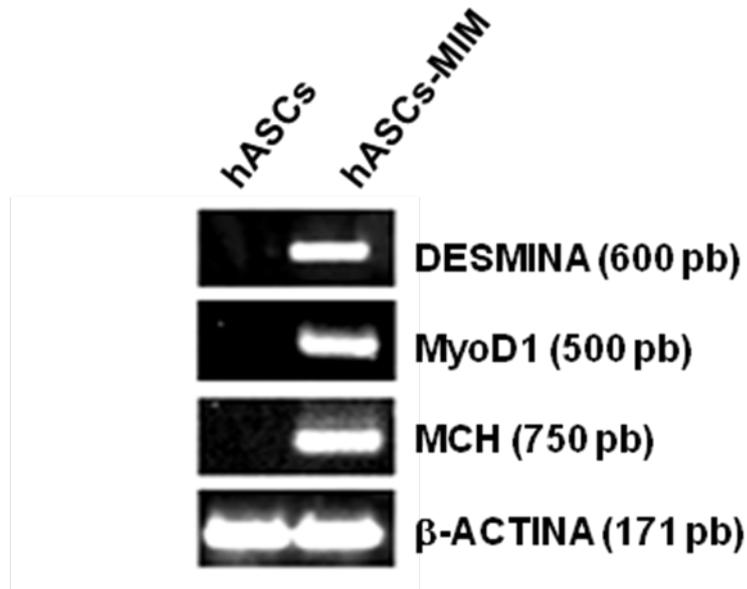


Figura 21. Análisis de expresión de marcadores de diferenciación miogénica mediante RT-PCR en hASCs y hASCs-MIM. El gen de la B-actina se usó control de RT-PCR.

4.4. ESTUDIOS DE MICROARRAY.

Al igual que durante la diferenciación osteogénico, con el objeto de determinar la influencia de los procesos epigenéticos de metilación en el proceso de diferenciación, llevamos a cabo un estudio de 27578 sitios CpG del genoma humano mediante arrays Infinium 27K Illumina, tanto de muestras de hASCs como de las hASCs-MIM. Ambas muestras mostraron una gran homología en sus patrones de metilación (Figura 22). No obstante, se encontraron 25 genes con alteración en sus promotores en la metilación de las CpG.

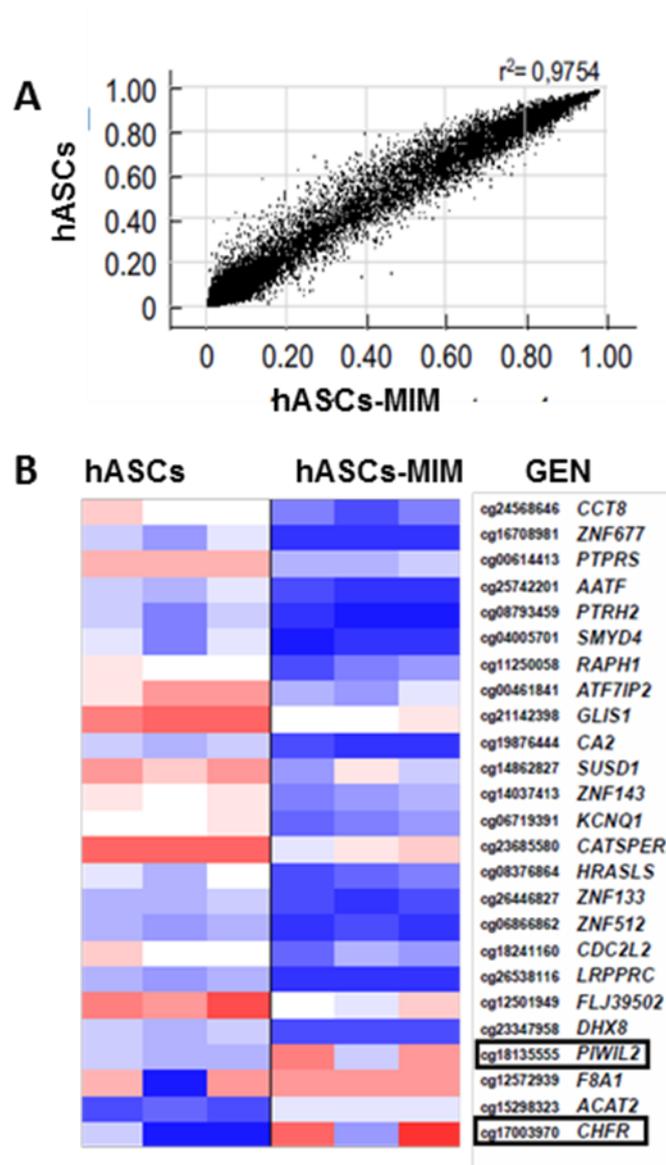


Figura 22. Estudio de la metilación específica de promotores durante el proceso de diferenciación miogénica. **A)** Representación bidimensional de la metilación en hASCs frente a hASCs-MIM; **B)** Genes con CpG diferencialmente metilados en hASC y HASCs-MIM.

Estos datos de metilación observados en los microarrays fueron corroborados mediante la secuenciación genómica con bisulfito de múltiples clones de los genes *PTPRS* (gen de una ruta establecida neuromuscular) y *PIWIL2* (marcador genético de característico de células madre pluripotentes ambos con islas CpG asociadas al extremo 5' (Figura 23).

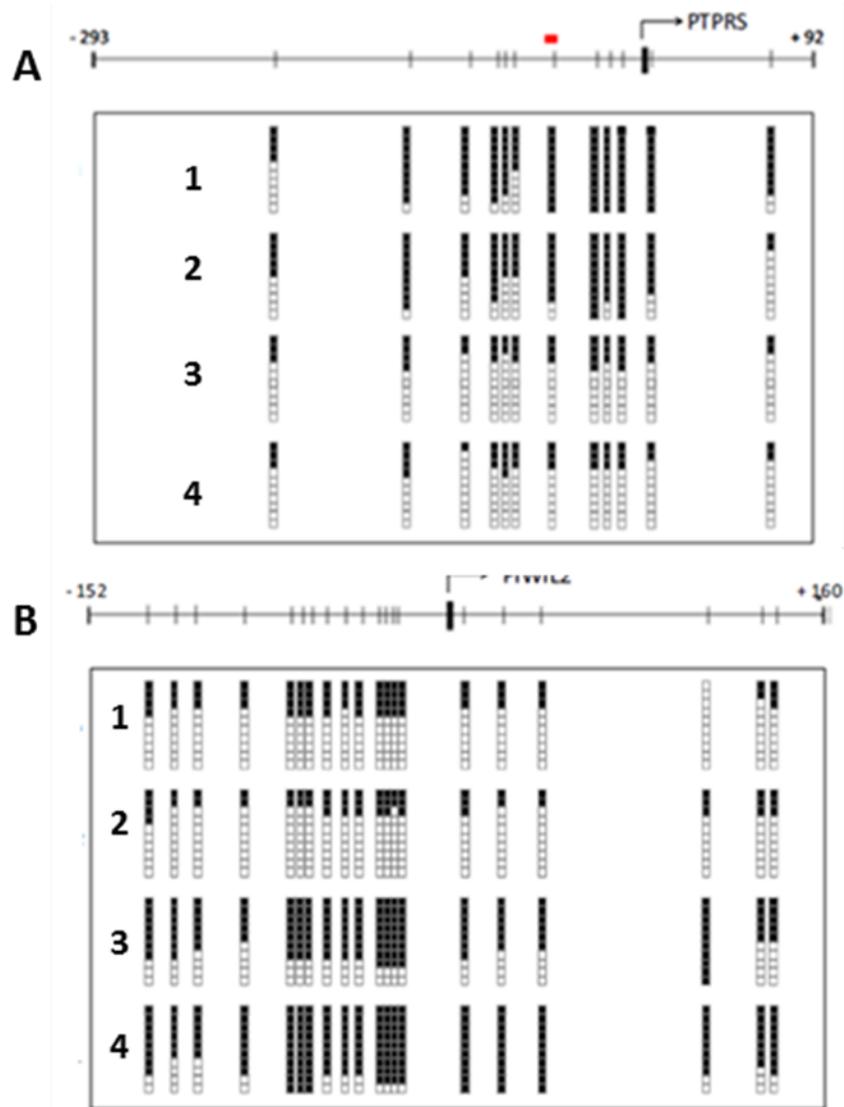


Figura 23. Análisis del estado de metilación por secuenciación genómica con bisulfito de las CpG del promotor de los genes *PTPRS* (A) y *PIWIL2* (B) tras la inducción miogénica de las hASCs. Los dinucleótidos CpG se representan mediante cortas líneas verticales y mediante los cuadros blancos y negros se indica la presencia de citosinas metiladas y no metiladas, respectivamente. hASCs (1 y 2), hASCs-MIM (3 y 4).

Los resultados obtenidos, nos permiten afirmar que mientras que las CpG del promotor de *PTPRS* se encontraban altamente metiladas en las hASCs, en las hASCs-MIM la mayoría de las CpG se encontraba demetiladas, disminuyendo la metilación en un 40% (Figura 23). Y de forma opuesta, exactamente igual que en la diferenciación osteogénica, las CpG del promotor del gen *PIWIL2* se encontraron hipermetiladas tras el proceso de inducción miogénica.

Estos datos fueron corroborados por el estudio de expresión de ambos genes mediante RT-qPCR. Como se muestra en la [Figura 24](#), la hipometilación del gen PTPRS permitió el incremento de su expresión en las hASCs-MIM. En contraste, la hipermetilación *PIWIL2* provocó una disminución significativa de expresión del mismo.

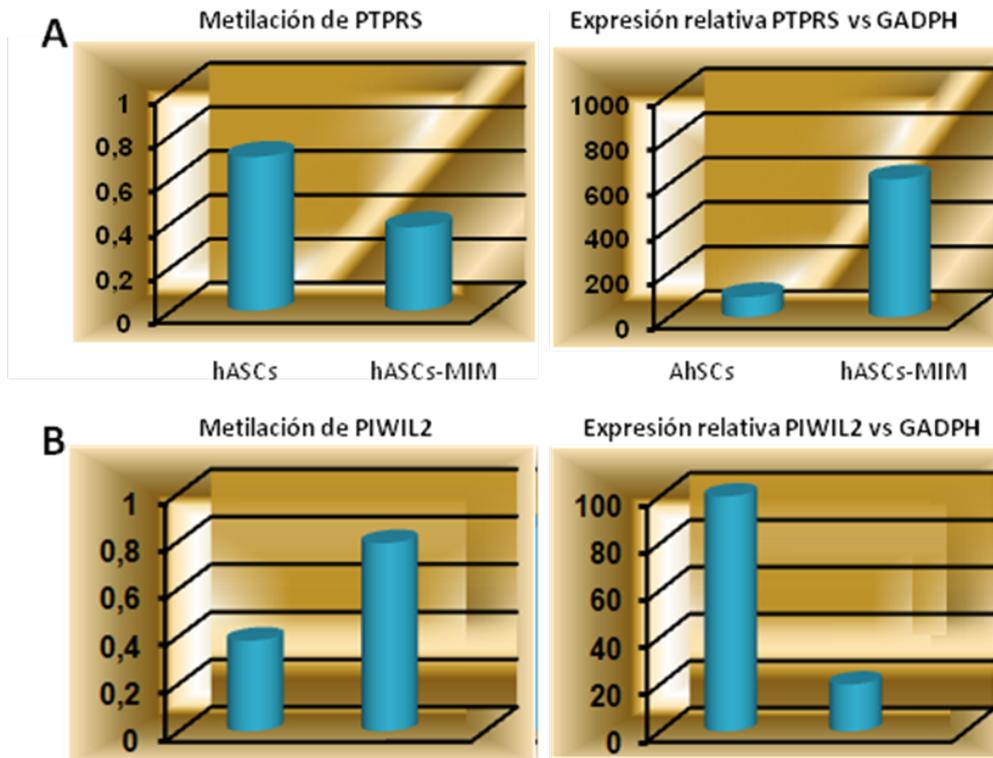


Figura 24. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de PTPRS (A) y PIWIL2 (B) tras la inducción miogénica de las hASCs.

4.5. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA EXPRESIÓN DE PTPRS Y PIWIL2.

Para caracterizar con más detalles la implicación de los genes PTPRS y PIWIL2 en el proceso de diferenciación miogénica realizamos un estudio inmunohistoquímico (Figura 25). Los resultados obtenidos confirman que la hipometilación de PTPRS en el proceso de diferenciación miogénica induce un

incremento de la expresión de PTPRS en las hASCs-MIM. En contraste, encontramos una drástica disminución de la expresión de PIWIL2, al igual que ocurría en la diferenciación osteogénica.

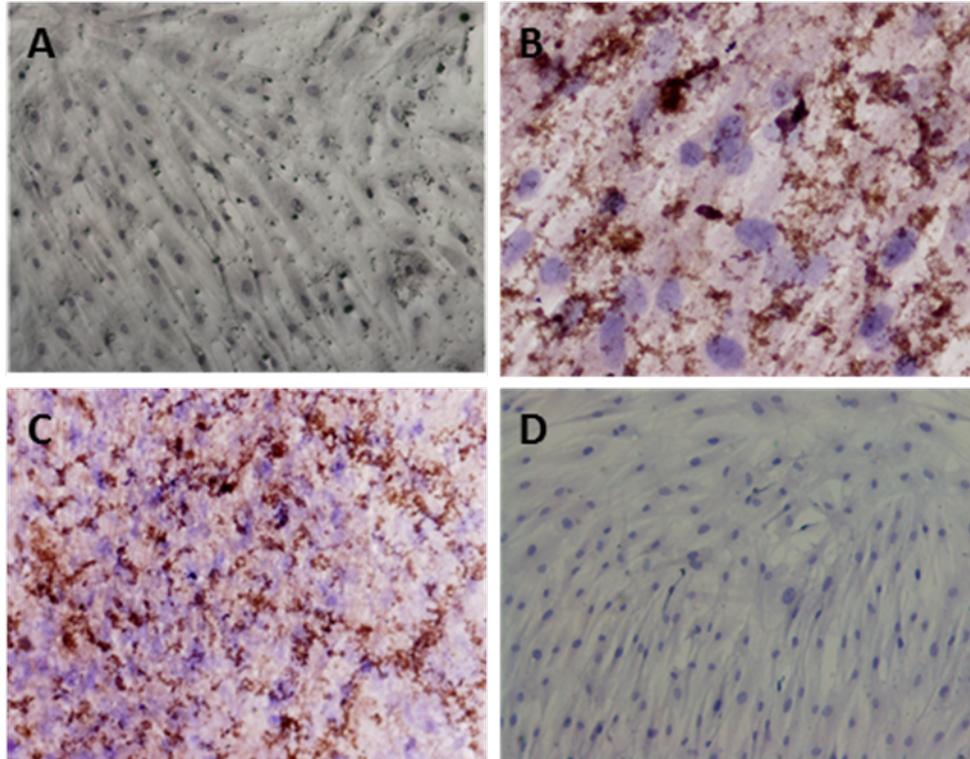


Figura 25. Expresión determinada mediante inmunohistoquímica de PTPRS y PIWIL2 de las hASCs sometidas al proceso de diferenciación miogénica. A y B, representan el marcaje con el anticuerpo de PTPRS en hASCs y hASCs-MIM respectivamente; C y D, corresponden a la tinción con PIWIL2 en hASCs y hASCs-MIM. Magnificación 10X (D) y 20X (A, B y C).

4.6. REVERSIÓN DE hASCs DIFERENCIADAS A LINAJE MIOGÉNICO.

Para determinar la estabilidad de la inducción miogénica obtenida y la influencia de la modificación de los perfiles epigenéticos y del microambiente circundante, analizamos los cambios que sufren las hASCs-MIM al someterlas a la privación de los factores de inducción durante 21 días.

4.6.1. Estudios Morfológicos.

Como se muestra en la Figura 26, las hASCs-MIM perdieron las características fenotípicas del linaje miogénico típico, como es el alineamiento de las células musculares, y se recuperaron parte de las características morfológicas de la hASCs originales, disminuyendo la densidad celular y aumentando el tamaño.

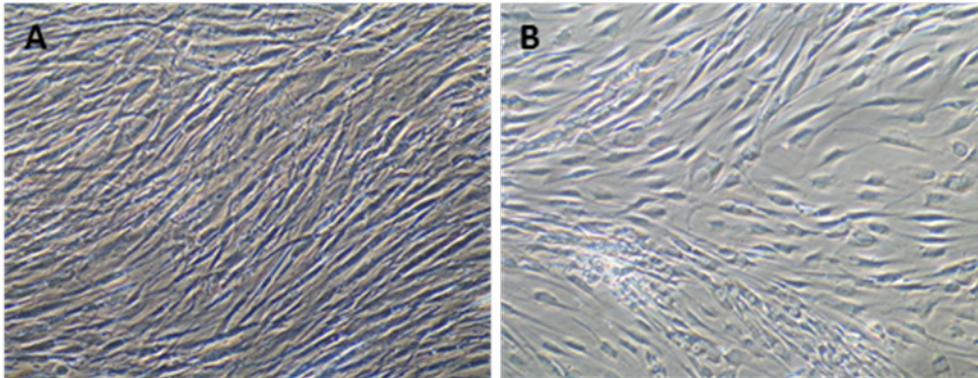


Figura 26. Microscopía óptica de las hASCs-MIM cultivadas durante 21 días en ausencia de factores de inducción miogénica. A, morfología de las hASCs-MMIM; B, morfología de las hASCs-MIM sin factores de inducción. Magnificación 10X.

4.6.2. Análisis De Metilación y Expresión Génica *PTPRS* *TPRS* *PIWIL2*.

Para determinar si los cambios morfológicos observados como consecuencia del cultivo de las hASCs-MIM en ausencia de factores de inducción miogénica se relacionaba con el estado de *PTPRS* y *PIWIL2*, realizamos un estudio de metilación mediante la técnica de bisulfito. Los resultados obtenidos confirman una alteración completa de los perfiles de metilación, observándose de nuevo una hipermetilación de las isla CpG del promotor *PTPRS* y una hipometilación de las isla CpG de *PIWIL2* (Figura 27). Estos datos se corresponden con la modificación de la expresión de estos genes determinada mediante RT-qPCR (Figura 28).

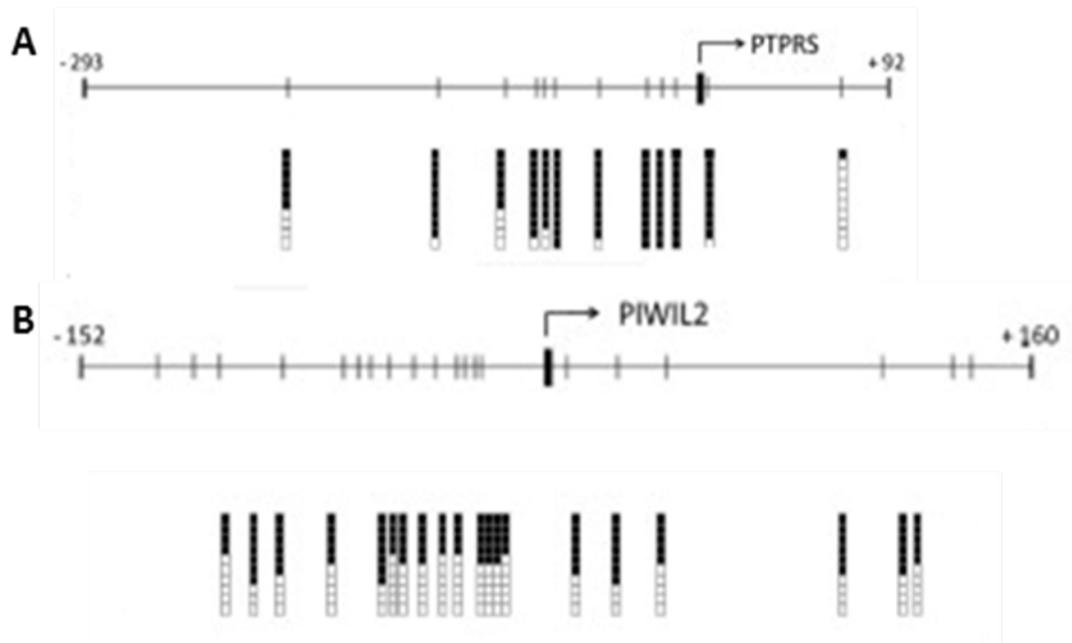


Figura 27. Análisis de secuenciación genómica con bisulfito de los promotores de los genes *PTPRS* y *PIWIL2* en células sometidas a privación de factores de inducción miogénica durante 21 días. Los dinucleóticos CpG se representan usando una línea corta y vertical. Se muestran los resultados de la secuenciación de 10 clones. La presencia de citosinas metiladas o no metiladas se indica mediante un cuadro negro o blanco, respectivamente. A, *PTPRS*; B, *PIWIL2*.

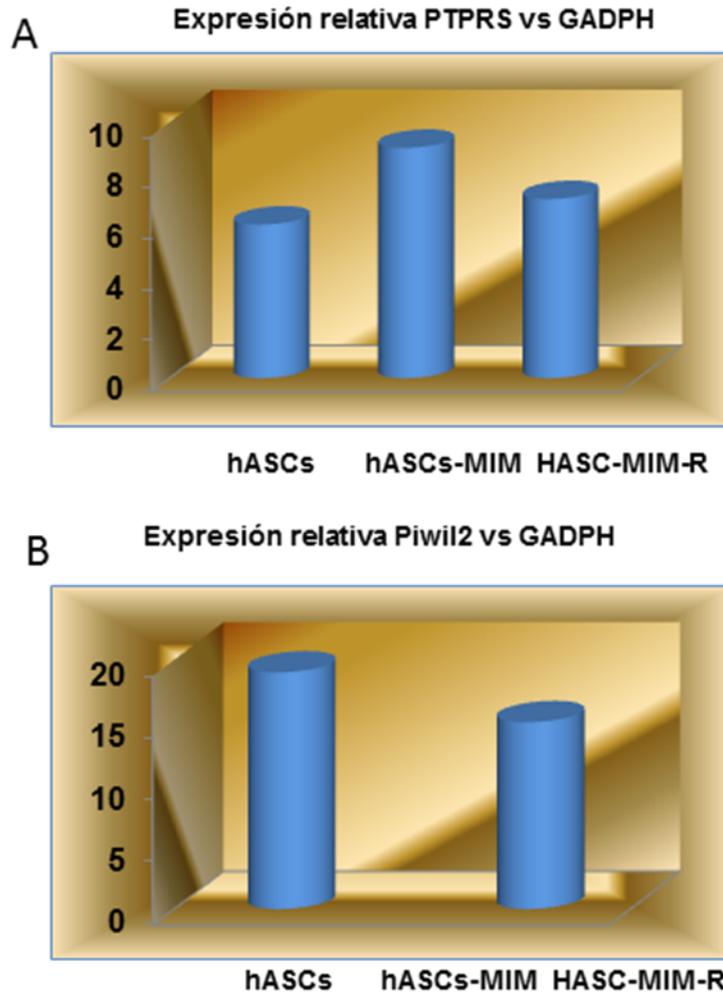


Figura 28. Determinación mediante RT-qPCR de la expresión de PTPRS y PIWIL2 tras someter a las hASCs-MIM a una privación de factores de inducción osteogénicos durante 21 días (hASCs-MIM-R). Como control positivo se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). A, PTPRS; B, PIWIL2.

4.7. SILENCIAMIENTO DE PIWIL2.

Los resultados obtenidos indican el papel fundamental que desempeña PIWIL2 en el proceso de diferenciación miogénica, al igual que en la diferenciación osteogénica. Para confirmar dichos datos llevamos a cabo un proceso de silenciamiento de dicho gen en las hASCs utilizando tres siRNA con distintas secuencias que reconocen PIWIL2. Como muestra la Figura 29, los tres RNA de interferencia permitieron silenciar la expresión de este gen cuando fue analizada mediante RT-PCR y western blot. Para determinar el efecto provocado por el

silenciamiento génico, determinamos periódicamente a los 7, 14, 21, 28 y 35 día, la modificación en la expresión de marcadores miogénicos como desmina y MEF2 mediante RT-qPCR que incrementaron su expresión a los de 35 días del silenciamiento de PIWIL2 (Figura 29).

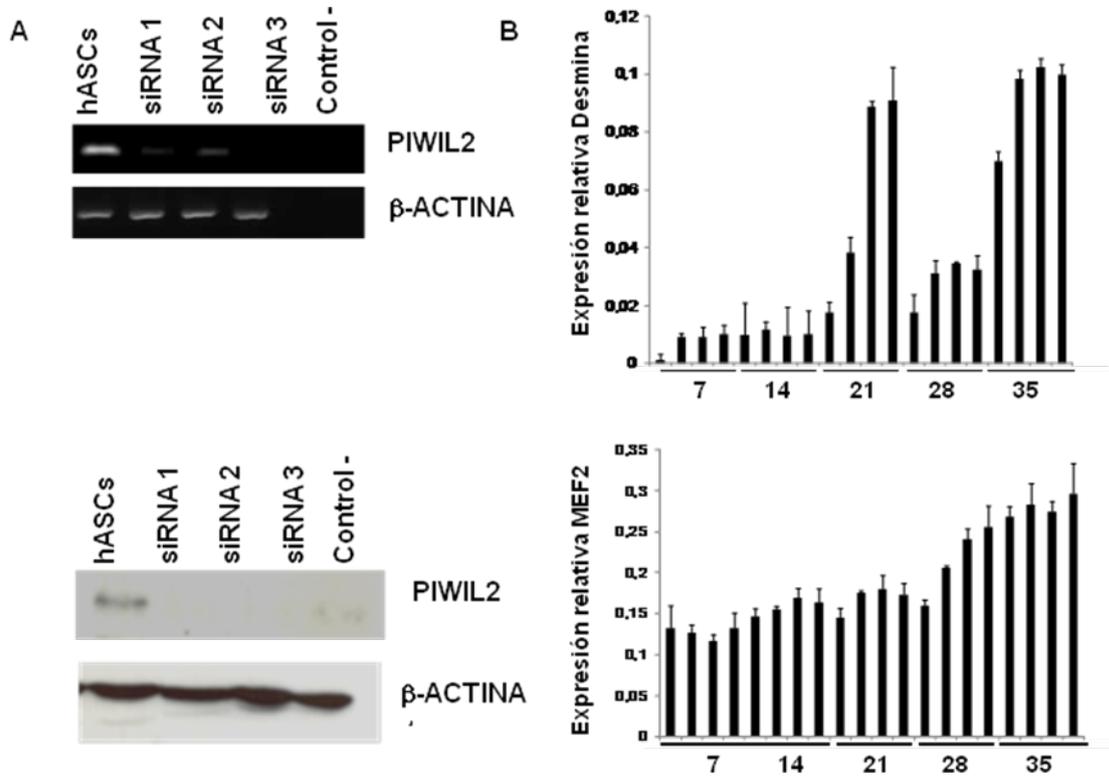


Figura 29. Silenciamiento génico de PIWIL2 en hASCs. A) Determinación del silenciamiento mediante RT-qPCR y Western Blot; B) RT-qPCR de desmina y MEF2. Como control positivo se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para la RT-qPCR y β -actina para el western blot y la RT-PCR.

V. DISCUSIÓN.

Las células madre mesenquimales humanas (MSC) se han convertido en los últimos años en una realidad como fuente de obtención de células terapéuticas que va a permitir avanzar decididamente en el campo de la Medicina Regenerativa. Aunque con una potencialidad más restringida que las células madre embrionarias (ESC), su uso evita muchos de los inconvenientes característicos de estas células. Sin embargo, existe un reto que es esencial afrontar para la posible aplicación clínica de las MSCs y que consiste en el desarrollo de protocolos precisos para dirigir la diferenciación celular hacia un linaje celular específico y la definición de ensayos que nos permitan garantizar la seguridad de su aplicación en los pacientes. Para alcanzar estos objetivos, es de vital importancia ser capaz de controlar el proceso de compromiso del linaje que requiere de la regulación de coordenadas de complejos eventos moleculares a nivel transcripcional, posttranscripcional y traslacional. En este contexto, sabemos que la activación y desactivación de diferentes conjuntos de genes se logra no sólo a través de reguladores transcripcionales, sino también a través de su interacción con moduladores epigenéticos que son capaces de decidir sobre el estado de metilación y por tanto de activar determinados genes. Hoy sabemos que la alteración de estos perfiles epigenéticos puede conducir a patologías diversas entre las que se encuentra la formación de tumores. Por lo tanto, el avance en los procesos de diferenciación de las MSCs y los cambios epigenéticos que ello conlleva, son esenciales para entender el control de compromiso de linaje y por tanto el desarrollo de controles de calidad que nos permitan aplicar estos tipos celulares en la terapia de los pacientes.

Dentro del tipo celular MSCs, las derivadas de tejido adiposo denominadas hASCs, poseen características especiales que las hacen especialmente versátiles y útiles para su aplicación en Medicina Regenerativa. Entre sus características destaca su fácil obtención con técnicas poco invasivas que permiten obtenerlas en cantidades abundantes. Su capacidad de diferenciación es similar a las MSCs pero muestran expresión de marcadores de células madre específicos (Woo y cols., 2016) y poseen características específicas en cuanto a sus mecanismos de auto-renovación, proliferación y diferenciación y de diferenciación hacia linajes de las tres

capas germinales (Prochazkovay cols., 2015; Pavydey cols., 2016). Varios estudios describen que la capacidad de proliferación parece ser mayor en las hASCs que en las MSCs obtenidas a partir de médula ósea o de cordón umbilical (Rebelatto y cols., 2008; Choudhery y cols., 2013). La posibilidad de reprogramar estas células mediante señales microambientales y dirigir su diferenciación hacia un tejido específico ha generado una enorme expectación e interés como alternativa terapéutica. Desde hace algunos años, se ha demostrado que las hASCs presentan un enorme potencial clínico (Mokry y cols., 2015).

Células hASCs y su compromiso con el linaje osteogénico

Una de las más prometedoras aplicaciones de la hASCs es la posibilidad de comprometerlas en su diferenciación hacia el linaje óseo con la consiguiente formación/regeneración de hueso y su posible aplicación a patologías de gran prevalencia como son las relacionadas con nuestro sistema esquelético (fracturas, lesiones óseas degenerativas, etc). En 2002, Wakitani y cols., realizaron un ensayo con 24 pacientes con rodillas osteoarthriticas en las que se había practicado una intervención de osteotomía tibial alta. De los 24 pacientes, 12 fueron usados como control, y a los otros 12 pacientes se les inyectó las MSCs suspendidas en gel de colágeno en el defecto articular del cóndilo femoral. Aunque el examen artroscópico reveló mejores resultados en los sujetos tratados en comparación con los controles, dichos resultados no fueron clínicamente significativos aunque demostraron la no generación de efectos secundarios mediante esta tecnología. Posteriormente, el mismo grupo examinó los beneficios clínicos después de 6 meses del transplante de células MSCs. En este tiempo los resultados fueron satisfactorios incluyendo una mejoría en la sensación de dolor un aumento de la movilidad y hallazgos artroscópicos de reparación mejorada del cartílago por MSCs trasplantadas (Wakitani y cols., 2004).

El presente trabajo utiliza MSCs procedentes de tejido adiposo (ASCs) obtenido mediante liposucciones. El rendimiento de esta metodología de extracción fue muy alto, lo que coincide con otros estudios que determinaron la abundante presencia de hASCs en el tejido de origen (Leong y cols., 2006; De Ugarte y cols., 2003) y la facilidad de obtención mediante esta técnica que es de cómoda realización y poco

invasiva (Londoño y cols., 2007). Por otra parte, algunos estudios indican que las MSCs obtenidas de tejido adiposo poseen una capacidad de aislamiento similar en comparación con las MSCs obtenidas a partir de médula ósea y de la sangre de cordón umbilical. Además de su morfología, sus características fenotípicas determinadas mediante citometría de flujo y su potencial de diferenciación no muestran diferencias significativas *in vitro* con las obtenidas de otros tejidos (Rebelatto y cols., 2008). Por tanto y en base a estos estudios, las ASCs procedentes de liposucciones no presentan ninguna desventaja en relación a las de otras fuentes de obtención y sin embargo, se obtienen en mayor cantidad. La resección de tejido graso para la obtención de hASCs parece dar resultados similares al lipoaspirado (Duscher y cols., 2016). Estudios relacionados con su aplicación clínica, han demostrado que estas células son seguras y eficaces tras su trasplante en huésped autólogo o alogénico (Gimble y cols., 2007). Además, aun no siendo pluripotentes, presentan una gran plasticidad, y la ventaja frente a las embrionarias de poder ser expandidas en cultivo, así como de poder ser obtenidas del propio paciente permitiendo su reintroducción posterior, y evitando así el problema de la incompatibilidad y la administración de fármacos inmunosupresores (Weissman y cols., 2001; Rutenberg y cols., 2004; Prósper y cols., 2006)

En nuestro trabajo, las hASCs fueron sometidas a un proceso de aislamiento y caracterización de entre 15-20 días, en los cuales presentaron adherencia al frasco de cultivo y una morfología fibroblástica uniforme lo que coincide con resultados obtenidos previamente por otros autores como Younesi y cols. (2015). La positividad para los marcadores mesenquimales CD90, CD73 y CD105 y el marcaje negativo para los hematopoyéticos CD45, CD34 y CD133, permitieron identificar esta población como hASCs (Wankhade y cols., 2016; Huang y cols., 2015; Falah y cols., 2015; Ishida y cols., 2015; Gazit y cols., 2014). Estos resultados indican que tras el proceso de obtención, su procesamiento y su cultivo, las células que permanecen adheridas a plástico, y que serán utilizadas en los experimentos posteriores de diferenciación, son MSCs.

Tras su caracterización, las hASCs fueron sometidas a un proceso de diferenciación osteogénica durante 28 días para obtener células diferenciadas (hASCs-MIO). En base a diferentes estudios previos, nuestro medio de cultivo fue

suplementado con dexametasona, ascorbato, fosfato, β -glicerofosfato y 10% de suero bovino fetal (Yamaguchi, 2014). La dexametasona promueve la diferenciación de las MSCs *in vitro* a través de la regulación de la proteína Runx2, que a su vez regula la expresión y activación de los genes de osteocalcina y xialoproteína y aumenta la fosfatasa alcalina y las acumulaciones de calcio (Phillips y cols., 2006). El β -glicerofosfato es un sustrato de la fosfatasa alcalina ósea que estimula el proceso de mineralización (Hamade y cols., 2003) mientras que el ácido ascórbico estimula la hidroxilación de aminoácidos y el procesamiento de procolágeno. Finalmente, se ha comprobado que el suero bovino fetal induce la diferenciación osteogénica en comparación con el uso de suero humano o de un medio libre de suero que parecen ser más adecuados para una diferenciación adipogénica (Lindroos y cols., 2010). La utilización de estos factores de inducción de la osteogénesis produce la transformación de las hASCs en osteoblastos, que producen matriz extracelular compuesta principalmente por colágeno tipo I y osteocalcina (OC), marcador tardío del proceso de diferenciación osteogénica, y aumenta la expresión de proteínas como la fosfatasa alcalina (ALP) y osteopontina (OP), marcadores de expresión temprana del proceso de diferenciación osteogénica (Calabrese y cols., 2016; Lindroos y cols., 2010). En los estadios finales se forman depósitos de calcio los cuales pueden ser detectados por técnicas como la tinción con Rojo de Alizarina (Park y cols., 2016; Daniunaite y cols, 2015).

La observación continua durante 28 días, mediante microscopio óptico, del proceso de diferenciación osteogénica de nuestras células, nos permitió la pérdida progresiva, a partir del día 7, de su típica morfología fibroblastoide original. A partir del día 12 aparecieron los primeros núcleos de mineralización que fueron incrementando progresivamente con el transcurso de los días de cultivo. La tinción del calcio mediante rojo de alizarina es una prueba ampliamente aceptada para refrendar la capacidad de las hASCs para diferenciarse hacia tejido óseo tras estimulación o inducción por diferentes métodos ya sean mecánicos (depósitos sobre plataformas), químicos (inductores de la diferenciación) o celulares (co-cultivo con otras células) (Gurumurthy y cols., 2016; Song y cols., 2016; Wang y cols., 2015; Choron y cols., 2015; Zang y cols., 2014). Por tanto, nuestro marcaje de alizarina con el transcurso del proceso de diferenciación, ratificó la presencia de depósitos de calcio y la inducción de las hASCs hacia tejido óseo.

Mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM), demostramos cambios en las hASCs, que consistieron en un incremento de las fibras de colágeno, de las interacciones celulares y del retículo sarcoplásmico rugoso, así como una desestructurada red trabecular que podría ser el inicio de la organización del cultivo para formar tejido óseo esponjoso. Un hallazgo que confirmó la diferenciación hacia linaje osteogénico y la puesta en marcha de los mecanismos celulares de generación de hueso, fue la presencia de picos de calcio mediante el estudio de dispersión de energía por rayos X realizado por el SEM. Este proceso es parecido al desarrollado por el hueso en el proceso de mineralización.

Además de la caracterización morfológica, otras técnicas moleculares permitieron comprobar la correcta diferenciación de las hASCs hacia linaje osteogénico o células hASCs-MIO. Así, mediante western blot, se detectó una mínima expresión de fosfatasa alcalina (ALP) en las hASCs, la cual fue muy superior en las hASCs-MIO. La osteocalcina (OC), un marcador tardío de la diferenciación osteoblástica, y la osteopontina (OP) también fueron detectadas en las hASCs-MIO, no mostrando marcaje en las hASCs. Los niveles de expresión de los marcadores específicos de hueso como OP, osteonectina (ON) y OC, fueron estudiados mediante RT-PCR. Todos ellos, salvo la ON, que se expresa de forma constitutiva en las hASCs, mostraron expresión en las células hASCs-MIO y no en las hASCs sin diferenciar. Por tanto, todos estos resultados son indicativos de la correcta diferenciación osteogénica. Similares resultados han sido detectados en estudios de diferenciación osteogénica. Lindroos y cols. (2010), estudió también la diferenciación de las hASCs a linaje osteogénico, detectando la expresión de la ALP mediante RT-qPCR e inmunohistoquímica en las hASCs-MIO y no en las hASCs sin diferenciar. Sus estudios confirmaron mediante RT-qPCR los niveles de expresión de los marcadores génicos específicos de hueso como *RUNX2*, factor de transcripción asociado con la diferenciación de los osteoblastos, *colágeno I*, *OC* y *OP*. Así, *RUNX2* mostró un aumento de expresión en las hASCs-MIO frente a las hASCs sin diferenciar. Sin embargo *OC* mostró valores muy bajos mientras que la expresión fue nula para *ON* y *colágeno I*. Estudios recientes mediante RT-PCR demuestran que la inducción a la diferenciación osteogénica de hASCs mediante medios de inducción similares a los nuestros (incluyendo el uso de dexametasona) producen un notable

cambio de expresión de ALP, runx2A, DLX5, colágeno tipo I y OC (Kyllönen y cols., 2013). Sin embargo, una reducción en las concentraciones de dexametasona parece mejorar la diferenciación osteogénica con valores de expresión de mRNA de ALP y OC más cercanos al hueso basal.

Células hASCs y su compromiso con el linaje miogénico

Las hASCs son una fuente ideal para la generación de células musculares que puede ser aplicada en diferentes patologías relacionadas con este tejido. Así, el trasplante de hASCs en ratones con distrofia conduce a la diferenciación miogénica de estas células, observándose a partir del día 10 la expresión de distrofina en hasta el 50% de las miofibrillas analizadas. Dicha expresión aumentó en el tiempo, localizándose su expresión a partir del día 6 en la mayoría de fibras musculares, lo que sugiere migraciones desde la zona del trasplante hacia otras con daño muscular no trasplantadas (Rodríguez y cols., 2005). En relación al tejido muscular cardíaco, Choi y cols. (2010), indujeron la diferenciación de las hASCs hacia miocardiocitos mediante su co-cultivo con células cardíacas de rata durante 6 semanas. De esta forma, las hASCs fueron diferenciadas a cardiomiocitos (hASCs-rCM), células de músculo liso y adipocitos humanos observándose también estructuras vasculares en su proceso de diferenciación. Las hASCs-rCM presentaron mayor número de contracciones y de volumen vascular que los cultivos aislados de rCM. En el estudio *in vivo*, dichas hASCs-rCM demostraron su alta plasticidad para diferenciarse a tejido cardíaco, contribuyendo además a la vascularización del tejido y promoviendo el crecimiento de nuevo tejido cardíaco.

En nuestro caso y tras la caracterización de las hASCs, estas fueron sometidas también a un proceso de diferenciación miogénica. Este proceso se produce en varios estadios y tiene como resultado la formación de tejido muscular. Para ello es necesario la proliferación de mioblastos, la secreción de fibronectina en la matriz extracelular, el alineamiento de los mioblastos formando miotubos multinucleados y, por último, la fusión celular (Vlahopoulos y cols., 2005). En el proceso en el que las hASCs se transforman en miocitos, éstas producen α -actina sarcomérica, desmina, proteína 1 de diferenciación miogénica (MyoD) y cadena de miosina pesada (MHC) (Bitto y cols., 2013; Wu y cols., 2012), y en estadios más avanzados producen

depósitos lipídicos, que pueden ser detectados por tinción con Oil Red O, un lisocromo lipófilo que tiñe de rojo los lípidos y los aceites minerales (Wu y cols., 2012; Yuan y cols., 2010; Park y cols., 2016).

Las hASCs diferenciadas a linaje miogénico (hASCs-MIM) fueron obtenidas tras cultivar las hASCs durante 42 días en medio de cultivo con factores de inducción miogénica. Diferentes estudios han modificado el sistema de diferenciación y los factores necesarios para llevarlo a cabo (Li y cols., 2012; Chen y cols., 2004; Wu y cols., 2012; Desai y cols., 2014; Park y cols., 2016; Mizuno y cols., 2002). Nuestro medio de diferenciación estuvo suplementado con 50 μ M de hidrocortisona y suero de caballo 5%. La hidrocortisona es un glucocorticoide necesario para el mantenimiento a largo plazo de los cultivos de las MSCs (Shipunova y cols., 2013). Además, inhibe la expresión de marcadores osteogénicos como son OP y OC, aumentando la de marcadores de diferenciación de adipocitos como FABP4 y PPAR α (Shipunova y cols., 2013) y marcadores de diferenciación miogénica como MRF4, MEF2C, Myf5, MHC (Ramírez-Espinosa y cols., 2016). Un aspecto muy importante es que no parece influir en el proceso de inmunomodulación mediado por las MSCs (Shipunova y cols., 2013). Por otra parte, el suero de caballo se utiliza en los cultivos celulares para recubrir las superficies de plástico donde crecerán dichos cultivos y para potenciar la proliferación y diferenciación de las hASCs a linaje miogénico (Keire y cols., 2013).

Durante los 42 días de diferenciación, las células fueron observadas de forma continúa bajo microscopio óptico, observándose a partir de la primera semana un alargamiento de las células, que continuó durante todo el proceso de inducción. Mediante microscopía electrónica de transmisión pudimos observar características típicas del tejido muscular, como fueron la presencia de células fusiformes, multinucleadas y con abundantes filamentos proteicos pertenecientes al citoesqueleto celular. Además, se encontró un significativo incremento de retículo endoplásmico rugoso en relación a las hASCs basales o sin diferenciar.

Por otra parte, los estudios de inmunofluorescencia detectaron un significativo aumento en la expresión de las proteínas específicas de músculo como α -actina sarcomérica, desmina, troponina T y α -actinina en las hASCs-MIM en relación a las

basales sin diferenciar. Mediante la técnica de RT-PCR se estudió la expresión desmina y de otros marcadores específicos musculares como la miosina D1 (MyoD1) y cadena pesada de miosina (MCH). Todos ellos presentaron alta expresión en las hASCs-MIM y no pudo ser detectado en las células hASCs sin diferenciar. Precisamente MyoD, parece ser un factor decisivo en la inducción hacia estirpe miogénica de las hASCs. Recientemente, Sung y cols. (2013) ha conseguido obtener células miogénicas en forma de huso largo con expresión de cadenas pesadas de miosina mediante la transfección de MyoD lo que proponen como un método seguro y clínicamente aplicable. No obstante, nuevos estudios apuntan hacia factores de transcripción como RAD21 y especialmente a microRNA como hsa-miR-1 como elementos reguladores del proceso que deberán ser estudiados ampliamente para su posible uso como inductores de la diferenciación miogénica (Quan y cols., 2016). Todos estos resultados sugieren que el proceso de diferenciación miogénica mediante nuestro sistema específico de inducción originó una correcta entrada en el linaje miogénico de las células hASCs. Similares resultados han sido detectados en los estudios de diferenciación miogénica realizados por Bitto y cols. (2013) quien corroboró mediante el análisis de inmunofluorescencia la expresión de los marcadores específicos musculares α -actina sarcomérica y MCH en MSCs sometidas a diferenciación. Además se pudo observar la orientación estriada cruzada espacial de estas proteínas, característica del tejido muscular.

Células hASCs y estudios epigenéticos: metilación de genes en el compromiso de diferenciación

A pesar del amplio uso de las células madre, todavía quedan por cubrir amplios conocimientos sobre los mecanismos que gobiernan su biología. Se ha sugerido que además de la regulación transcripcional, las células madre en general poseen un complejo mecanismo epigenético tanto durante el desarrollo embrionario como en el adulto (Reik, 2007). La alteración de la estructura de la cromatina, inducida por la metilación del ADN, tiene un papel clave en el control del patrón de expresión génica (Lunyak y Rosenfeld, 2008). Por ejemplo, Schmittwolf y cols. (2005) demostró como la combinación de la acetilación y la desmetilación del ADN indujo cambios en las células madre neuronales (NSCs) que las llevaron a transformarse en células

hematopoyéticas superando la barrera de su compromiso y de diferenciarse hacia un linaje alternativo. Por tanto, la identificación de los mecanismos epigenéticos que rigen las células madre es un instrumento importante para futuras investigaciones con el objetivo de obtener un marco más completo para comprender la determinación del destino de células madre (Wutz, 2013). En los últimos años, la investigación de la regulación epigenética de células madre se ha centrado en las ESCs (Lagarkova y cols., 2006; Fouse y cols.; 2008; Bibikova y cols., 2006; Hawkins y cols., 2010) conociéndose muy poco sobre el control epigenético de las células madre adultas y en concreto de las MSCs. Hoy sabemos que la acetilación de las histonas, la metilación del ADN y la expresión del miARN son esenciales en este proceso y serán necesarios futuros estudios para descifrar las claves epigenéticas de estas células.

En nuestro estudio, tanto las hASCs-MIO como las hASCs-MIM mostraron una gran similitud en sus patrones de metilación. Pudimos detectar 25 sitios CpG en las hASCs-MIM y 23 sitios CpG en las hASCs-MIO que modificaron su estado metilación tras el proceso de diferenciación. Diferentes estudios han descrito cambios en los estados de metilación de MSCs. Así, la diferenciación de hESCs a tejido neuronal produjo la hipermetilación de un 8% de islas CpG correspondientes a genes precursores de la diferenciación neuronal mientras que el 2% de las que estaban metiladas cambiaron su estado a hipometilado (Meissner y cols., 2008). Shao y cols. (2014) encontró cambios en el estado de metilación de hasta un 82.7% de las islas CpG en las MSCs sometidas a diferenciación a adipocitos. Estos cambios no son exactamente iguales ni en localización ni en cantidad en todos los procesos de diferenciación. Así, Daniunaite y cols. (2015) detectó 455 genes significativamente desregulados en las hASCs sometidas a diferenciación osteogénica. De ellos 229 presentaban regulación positiva (incremento de expresión) y 226 negativa (disminución de expresión), siendo en ambos casos genes relacionados con la regulación de señales o con la respuesta a estímulos de diferenciación osteogénica. El análisis de los genes concretos que sufrían modificaciones de expresión en base a los cambios epigenéticos ha arrojado luz sobre dicho proceso. Así en el caso de la diferenciación osteogénica, la mayor sobreexpresión se produce en genes como *RUNX2*, *AXIN2*, *PTGER4*, *ADRB2* y *P2RX7*, que son genes involucrados en la regulación de la osificación y la

mineralización de hueso y en *ALP*, fundamental para la formación de hidroxiapatita. Los niveles de expresión de genes de expresión de pluripotencialidad como *POU5F1*, *NANOG* y *SOX2* también fueron analizados. Así, las hASCs diferenciadas presentaron un aumento de la metilación en la región 5' de los genes *POU5F* y *NANOG*, mientras que *SOX2* presentaba su estado desmetilado. Esto fue correlacionado con la mayor expresión de *NANOG* y *POU5F*, el que mayor expresión presentó, y una menor expresión de *SOX2* en estas células. Buena prueba de los diferentes complejos génicos que son necesarios para activar la diferenciación en uno u otro sentido son los estudios de la inducción de MSCs al linaje condrogénico que necesita modular epigenéticamente mediante hipometilación de genes como *SOX9*, *RUN2*, *condromodulina-1* y *receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3)* (Ezura y cols., 2009). Por el contrario, la diferenciación de MSC al linaje adipogénico necesita de la modulación de genes como *PPAR γ* , *CEBPa*, *Adipsin*, *RUNX2*, *OC* y *OP* (Hemming y col., 2014).

Nuestros estudios de metilación mediante microarrays demostraron cambios de metilación en los promotores de genes *PTPRS* y *PIWIL2*, ambos con un extremo 5' asociado a la isla CpG, y el gen *SAA1*, con una región pobre en CpG en su promotor. *PIWIL2* pertenece a la familia de Argonauta (Sasaki y cols., 2003). Fue descrito originalmente en *Drosophila*, relacionándose su expresión con la espermatogénesis. Así, Ghasemzadeh-Hasankolaei y cols. (2015) compararon la capacidad de proliferación de las MSCs, procedentes de médula ósea de hembras y machos de ratón, observando que las MSCs procedentes de médula ósea masculinas parecían ser más propensas a diferenciarse en células germinales masculinos que las MSCs femeninas. La detección de mayores niveles de expresión de *PIWIL2* en las MSCs de los ratones masculinos que en los ratones femeninos se relacionó con esta tendencia. Este gen es todavía poco conocido aunque sabemos que protege el genoma de la línea germinal inhibiendo retrotransposones, estabilizando la estructura heterocromatina y regulando los genes diana durante la meiosis y la mitosis (Thomson y Lin, 2009). Se ha comprobado que ratones con mutaciones de *PIWIL2* acumulaban daños en el ADN lo que sugiere que *PIWIL2* es requerido para la reparación del ADN (Carmell y cols., 2007) y de hecho la expresión de *PIWIL2* y otros homólogos de su familia ha sido asociada con el aumento de oncogenicidad (Chen y cols., 2007; Leedham y Wrigh, 2008). Este gen

también ha sido relacionado con procesos de regulación del ciclo celular de las MSCs (Wu y cols., 2010) y su silenciamiento está asociado a la pérdida de capacidad de auto-renovación y de proliferación y a la inducción del proceso de diferenciación de las MSCs, considerándose por ello un marcador genético característico de células madre pluripotentes (Zhai y cols., 2016; Unhavaithaya y cols., 2009).

Por otra parte, el gen *PTPRS*, que también se modificó durante la diferenciación de nuestras células, participa en una ruta neuromuscular y está relacionado con la diferenciación miogénica (Sajnani-Pérez y cols., 2003; Xi y cols., 2012) mientras que el gen *SAA1*, participa en rutas osteogénicas (Kovacevic, 2008). Nuestros resultados mediante la técnica de bisulfito mostraron hipermetilación de las islas CpG del promotor de los genes *PTPRS* y *SAA1* en las hASCs, mientras que se observó una desmetilación de *PTPRS* en las hASCs-MIM y de *SAA1* en las hASCs-MIO. De manera opuesta, el promotor del gen *PIWIL2* presentó un estado desmetilado en las hASCs basales y, sin embargo, altamente metilado en las hASCs-MIM y las hASCs-MIO. Estos resultados fueron corroborados mediante el estudio de expresión de estos genes usando RT-qPCR, pudiéndose asociar los eventos CpG hipometiladores descritos anteriormente con un aumento de la expresión de *PTPRS* en las hASCs-MIM y de *SAA1* en las hASCs-MIO, mientras que los niveles de expresión de *PIWIL2* ocurrieron de manera opuesta en ambas líneas.

Por último y para completar el estudio de la modificación de la expresión de los genes que han cambiado su estado de metilación como consecuencia de la inducción osteogénica y miogénica de las hASCs, realizamos un estudio inmunohistoquímico para determinar si la hipometilación de *SAA1* en hASCs-MIO y *PTPRS* en hASCs-MIM se correspondía con un incremento de su expresión proteica, al igual que la hipermetilación de *PIWIL2* con un descenso de la expresión del gen. En ambos casos *PIWIL2* presentó marcaje en las hASCs que prácticamente desaparece tanto en las hASCs sometidas al proceso de inducción osteogénica como miogénica. De forma contraria, mientras que la tinción con *SAA1* y *PTPRS* es muy débil en hASCs, en hASCs-MIO y hASCs-MIM, respectivamente, es de gran intensidad, demostrando por tanto el incremento en su expresión. Dichos resultados corroboran el proceso de diferenciación de ambas líneas a sus respectivos linajes,

apoyando la hipótesis de que durante el proceso de reprogramación celular se producen unas series de modificaciones en las marcas epigenéticas de las células mediante mecanismos de metilación de ADN, y que dichos cambios podrían contribuir a la expresión de genes tejidos específicos y por tanto a la diferenciación. Hay pocos estudios que relacionen los cambios de metilación con la expresión de genes tejidos específicos, sin embargo son muchos los genes cuya expresión ha sido detectada específicamente de determinados tipos celulares (Imamura y cols., 2001; Futscher y cols., 2002; Rauch y cols., 2009). Un ejemplo son los genes *rSPHK1* y *hSAL6A8*, que presentan sus promotores hipermetilados en determinados tejidos, habiendo sido asociado dicho estado con su silenciamiento génico (Imamura y cols., 2001; Grunau y cols., 2000).

Células hASCs diferenciadas y procesos de reversión

Los perfiles epigenéticos de las células y los tejidos son capaces de adaptarse rápidamente a los cambios en el microambiente circundante (Faulk y Dolinoy, 2011). Sin embargo, pocos estudios hacen referencia a la estabilidad del compromiso de linaje adquirido por las hASCs con los medios de inducción osteogénica y miogénica. Para analizar esta estabilidad, en nuestro estudio nos propusimos analizar los cambios que sufren las hASCs-MIO y hASCs-MIM tras someterlas a un proceso de privación de los medios de inducción durante 14 días y 21 días respectivamente.

Tras la supresión de los medios de inducción, las hASCs-MIO fueron perdiendo las características fenotípicas del linaje osteogénico típico, desorganizándose el incipiente tejido óseo que se había desarrollado durante el proceso de diferenciación, disminuyendo la densidad celular y desapareciendo las acumulaciones que identificamos como depósitos de calcio. Las células adquirieron de nuevo una morfología de tipo fibroblastoide similar a la población de hASCs. Estas observaciones fueron correlacionadas una drástica disminución de la tinción con rojo de alizarina, que se mostraba ahora de forma puntiforme distribuida por todo el cultivo indicando una clara disminución de los depósitos de calcio. En el caso de las hASCs-MIM también se observó una pérdida de las características fenotípicas del linaje miogénico típico, como su alineamiento típico, y fueron recuperaron parte

de las características morfológicas de la hASCs originales, disminuyendo la densidad celular y aumentando el tamaño.

Al igual que en el proceso de diferenciación, durante el proceso de reversión también es posible observar modificaciones de los perfiles epigenéticos que hacen que las células se adapten rápidamente a los cambios en el microambiente circundante (Faulk y Dolinoy, 2011). En el microarray realizado pudimos observar que las hASCs-MIM sometidas al proceso de reversión, mostraron una hipermetilación de la isla CpG del promotor del gen *PTPRS*, al igual que sucedió con el promotor del gen *SAA1* en las hASCs-MIO. Por el contrario, ambos cultivos reflejaron una hipometilación de la isla CpG del promotor del gen *PIWIL2*. Estos estados de metilación fueron ratificados por el estudio de RT-qPCR, donde los eventos CpG hipometiladores descritos anteriormente fueron asociados con un aumento de la expresión de *PIWIL2* en ambos cultivos, mientras que los niveles de expresión de *PTPRS* y *SAA1* descendieron. Estos cambios de metilación también han sido observados en otros genes relacionados con las rutas de diferenciación miogénicas y osteogénica, como son los genes *PPAR* y *MyoD* cuyos niveles de metilación de las islas CpG son bajos en las hASCs y elevados en las células satélites musculares (Zhang y cols., 2015). Fan y cols. (2009) describió cómo la mutación en el correpresor *BCL6* (*BCOR*), un represor transcripcional de la activación de la proteína 2 AP2 α , inducía la osteogénesis a través de mecanismos de modificación de histonas. Revisando los niveles de metilación de *BCOR* se confirmó que se encuentra altamente metilado en hueso normal y hemimetilado en osteocitos.

Un último ensayo nos permitió determinar la relevancia *PIWIL2* en la diferenciación de las hASCs a los linajes osteogénicos y miogénicos. Siguiendo a otros autores, usaron siARN para tal fin, los cuales ya han demostrado ser una herramienta muy efectiva y sensible en el estudio de la función de determinados genes especialmente en células madre. Por ejemplo, Trohatou y cols. (2014), estudiando MSCs de médula ósea de sangre del cordón umbilical y de líquido amniótico fue capaz de determinar la relevancia de *Sox2* mediante su silenciamiento por siRNA, lo que provocó una clara diferenciación osteogénica de las MSCs. En relación a nuestros genes, Wu y cols. (2010) consiguió un silenciamiento de *PIWIL2*

mediante siARN en células MSCs de ratón obtenidas de médula ósea. Este bloqueo en la actividad de la proteína indujo un aumento de la proliferación celular y, significativamente, del número de células en las fases G1/S y G2/M. Por otra parte, este hecho pudo ser asociado al aumento de los niveles de expresión de los genes de ciclo celular *DDND1*, *CDK8*, varios genes de regulación de los microtúbulos, así como a la disminución de la expresión de los genes supresores de tumores como *Cables-1*, *LATS* y *Cxxc4*.

Nosotros usamos tres diferentes siRNA que reconocen tres secuencias distintas del gen *PIWIL2*. Los tres siARN fueron efectivos silenciando *PIWIL2*, lo cual condujo a su no expresión a nivel de mRNA y proteína. Como pudimos observar posteriormente, un incremento en la expresión de marcadores miogénicos como desmina y *MEF2* pudo ser observada tras el silenciamiento de *PIWIL2*, y un incremento de *OP* y *ALP* en la diferenciación osteogénica se observó a los 25 días. Estos hallazgos demuestran que *PIWIL2* podría actuar como una molécula clave que determina la diferenciación de las hASCs, participando en la regulación de determinados genes específicos de los procesos de diferenciación de estas células.

Por tanto podemos concluir que los datos acumulados de las investigaciones sobre la epigenéticas de las MSCs están contribuyendo al entendimiento de la regulación de la expresión génica y por tanto de su diferenciación. Estos resultados prometen tener profundas implicaciones en la investigación básica y aplicada aunque será necesario abordar investigaciones específicas como son los cambios dinámicos de la marcas epigenéticas durante el compromiso de linaje de las MSCs, cómo se mantiene el linaje y qué determina la senescencia y el envejecimiento de las MSCs. Estas futuras investigaciones aumentarán el potencial de estas células en la Medicina Regenerativa y en el tratamiento basado en ingeniería de tejidos.

VI. CONCLUSIONES.

1. Las células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo cumplen los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular expresando los marcadores mesenquimáticos CD90, CD73 y CD105 y siendo negativas para los marcadores los hematopoyéticos CD34, CD45 y CD133.
2. La inducción de células madre mesenquimales con dexametasona, ácido ascórbico y glicerol fosfato permite su diferenciación al linaje osteogénico presentando depósitos de calcio y un significativo incremento en la expresión de osteonectina, osteocalcina, osteopontina y fosfatasa alcalina.
3. La inducción de células madre mesenquimales con hidrocortisona y suero de caballo permite su diferenciación al linaje miogénico, presentando un significativo incremento en la expresión de proteínas de filamentos delgados (actina y troponina), filamentos gruesos (miosina y alpha-actinina) e intermedios (desmina).
4. La inducción al linaje osteogénico de las células madre mesenquimales provoca la hipometilación del promotor del gen *SAA1* que incrementó de su expresión y la hipermetilación del promotor del gen *PIWIL2* que fue silenciado.
5. La inducción al linaje miogénico de las células madre mesenquimales provoca la hipometilación de *PTPRS* que incrementó su expresión y, al igual que en la diferenciación osteogénica, la hipermetilación de *PIWIL2* y por tanto la pérdida de su expresión.
6. El silenciamiento génico de *PIWIL2* mediante siRNA en las células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo induce el incremento de expresión de osteopontina y fosfatasa alcalina, marcadores de diferenciación osteogénica; y desmina y factor potenciador de miocitos MEF2, marcadores de diferenciación miogénica; lo que demuestra la relevante implicación de este gen en el proceso de diferenciación de las células madre mesenquimales.

7. La privación de los factores de inducción osteogénicos induce la reversión del proceso de diferenciación con disminución de los depósitos minerales, hipermetilación y disminución de expresión del gen *SAA1* e hipometilación y aumento de expresión de *PIWIL2*.
8. La privación de los factores de inducción miogénicos provoca la reversión del proceso de diferenciación con hipermetilación y disminución de expresión del gen *PTPRS* e hipometilación y aumento de expresión de *PIWIL2*.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Aksu AE, Rubin JP, Dudas JR, Marra KG. (2008). "Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells." *Ann Plast Surg.* 60(3):306-22.
- Al Battah F, De-Kock J, Vanhaecke T, Rogiers V. (2011). "Current Status of Human Adipose-Derived Stem Cells: Differentiation into Hepatocyte-Like Cells." *ScientificWorldJournal.* 11:1568–81.
- Alfaro MP, Saraswati S, Young PP. (2011). "Molecular mediators of mesenchymal stem cell biology." *Vitam Horm.* 87:39-59.
- Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhata R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y. (2007). "New nomenclature for chromatin-modifying enzymes." *Cell.* 131(4):633-6.
- Arnsdorf EJ, Tummala P, Castillo AB, Zhang F, Jacobs CR. (2010). "The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation." *J Biomech.* 43(15):2881–2886.
- Ballestar E, Wolffe AP. (2001). "Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression." *Eur J Biochem* 268(1):1-6.
- Baron F, Lechanteur C, Willems E, Bruck F, Baudoux E, Seidel L, Vanbellinthen JF, Hafraoui K, Lejeune M, Gothot A, Fillet G, Beguin Y. (2010). "Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning." *Biol Blood Marrow Transplant.* 16:838–847.
- Bayati V, Hashemitabar M, Gazor R, Nejatbakhsh R, Bijannejad D. (2013). "Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone

marrow- and adipose-derived stem cells: a comparative study." *Anat Cell Biol.* 46(2):113-21.

Belogurov A Jr, Kudriaeva A, Kuzina E, Smirnov I, Bobik T, Ponomarenko N, Kravtsova-Ivantsiv Y, Ciechanover A, Gabibov A. (2014). "Multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein escapes control by ubiquitination during proteasomal degradation." *J Biol Chem.* 289(25):17758-66.

Bibikova M, Chudin E, Wu B, Zhou L, Garcia EW, Liu Y, Shin S, Plaia TW, Auerbach JM, Arking DE, Gonzalez R, Crook J, Davidson B, Schulz TC, Robins A, Khanna A, Sartipy P, Hyllner J, Vanguri P, Savant-Bhonsale S, Smith AK, Chakravarti A, Maitra A, Rao M, Barker DL, Loring JF, Fan JB. (2006). "Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature." *Genome Res.* 16(9):1075–83.

Bitto FF, Klumpp D, Lange C, Boos AM, Arkudas A, Bleiziffer O, Horch RE, Kneser U, Beier JP. (2013). "Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a newly developed neurotised AV-loop model." *Biomed Res Int.* 2013:935046.

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. (1999). "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo." *Science* 283(5401):534-7.

Brady MT, Hilchey SP, Hyrien O, Spence SA, Bernstein SH. (2014). "Mesenchymal Stromal Cells Support the Viability and Differentiation of Follicular Lymphoma-Infiltrating Follicular Helper T-Cells." *PLoS One.* 9(5): e97597.

Calabrese G, Giuffrida R, Fabbi C, Figallo E, Lo Furno D, Gulino R, Colarossi C, Fullone F, Giuffrida R, Parenti R, Memeo L, Forte S. (2016). "Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro." *PLoS One.* 11(3): e0151181. doi:10.1371/ journal.pone.0151181.

- Carén H, Pollard SM, Beck S. (2013). "The good, the bad and the ugly: epigenetic mechanisms in glioblastoma." *Mol Aspects Med* 34(4):849-62.
- Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ. (2007). "MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline." *Dev Cell*. 12(4):503-14.
- Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, Mönckeberg G, Figueroa FE. (2010). "Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients." *Lupus*. 19(3):317-22.
- Cavagnari BM. (2012). "Regulation of gene expression: how do epigenetic mechanisms work" *Arch Argent Pediatr*. 110(2):132-6.
- Champagne FA. (2012). "Interplay between social experiences and the genome: epigenetic consequences for behavior." *Adv Genet* 77:33-57.
- Chen HF, Yu CY, Chen MJ, Chou SH, Chiang MS, Chou WH, Ko BS, Huang HP, Kuo HC, Ho HN. (2015). "Characteristic expression of major histocompatibility complex and immune privilege genes in human pluripotent stem cells and their derivatives." *Cell Transplant*. 24(5):845-64.
- Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. (2004). "Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction." *Am J Cardiol*. 94(1):92-5.
- Chen XP, Chen XZ, Lin YF, Tian WD, Tang YC, Li SW. (2004). "A study on myogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells." *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 22(6):507-9.
- Chen Y, Pane A, Schüpbach T. (2007). "Cutoff and aubergine mutations result in retrotransposon upregulation and checkpoint activation in *Drosophila*." *Curr Biol*. 17(7):637-42.

- Cheng KH, Kuo TL, Kuo KK, Hsiao CC. (2011). "Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine." *Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences* 2(3): 53-62.
- Cho KS, Kim YW, Kang MJ, Park HY, Hong SL, Roh HJ. (2014). "Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cells on T Lymphocyte and Cytokine Expression in Nasal Polyps." *Otolaryngol Head Neck Surg.* 150(6):1062-70.
- Choi YS, Matsuda K, Disting GJ, Morrison WA, Dilley RJ. (2010). "Engineering cardiac tissue in vivo from human adipose-derived stem cells." *Biomaterials.* 31(8):2236-42.
- Choron RL, Chang S, Khan S, Villalobos MA, Zhang P, Carpenter JP, Tulenko TN, Liu Y. (2015). "Paclitaxel impairs adipose stem cell proliferation and differentiation." *J Surg Res.* 196(2):404-15.
- Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Harris DT. (2013). "Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue." *Cytotherapy* 15(3):330-43.
- Crawford AH, Stockley JH, Tripathi RB, Richardson WD, Franklin RJM. (2014). "Oligodendrocyte progenitors: Adult stem cells of the central nervous system?" *Experimental Neurology* 260:50-5.
- Daniunaite K, Serenaite I, Misgirdaite R, Gordevicius J, Unguryte A, Fleury-Cappellesso S, Bernotiene E, Jarmalaite S. (2015). "Epigenetic regulation of human adipose-derived stem cells differentiation." *Mol Cell Biochem* 410(1-2):111-20.
- De la Rosa O, Dalemans W, Lombardo E. (2012). "Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases." *Curr Opin Biotechnol.* 23(6):978-83.
- Desai VD, Hsia HC, Schwarzbauer JE. (2014). "Reversible modulation of myofibroblast differentiation stem cells." *PLoS One* 9 (1):e86865.

- De la Garza-Rodea AS, van der Velde-van Dijke I, Boersma H, Gonçalves MA, van Bekkum DW, de Vries AA, Knaän-Shanzer S. (2012). "Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources." *Cell Transplant*. 21(1):153-73.
- De Paepe C, Krivega M, Cauffman G, Geens M, Van de Velde H. (2014). "Totipotency and lineage segregation in the human embryo." *Mol Hum Reprod*. 20(7):599-618.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. (2003). "Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow." *Cells Tissues Organs*. 174: 101-109.
- Di Bernardo G, Squillaro T, Dell'Aversana C, Miceli M, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L, Galderisi U. (2009). "Histone deacetylase inhibitors promote apoptosis and senescence in human mesenchymal stem cells." *Stem Cells Dev*. 18:573–581.
- Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, Crea F, Capogrossi MC. (2006). "Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells." *J Cell Sci*. 119(Pt 14):2945-52.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8(4):315-7.
- Duscher D, Luan A, Rennert RC, Atashroo D, Maan ZN, Brett EA, Whittam AJ, Ho N, Lin M, Hu MS, Walmsley GG, Wenny R, Schmidt M, Schilling AF, Machens HG, Huemer GM, Wan DC, Longaker MT, Gurtner GC. (2016). "Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells." *J Transl Med*. 14(1):126.
- Edwards CA, Ferguson-Smith AC. (2007). "Mechanisms regulating imprinted genes in clusters." *Curr Opin Cell Biol* 19(3): 281-289.

- Eslaminejad MB, Fani N, Shahhoseini M. (2013). "Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture." *Cell J.* 15(1):1–10.
- Espada J, Esteller M. (2010). "DNA Methylation and the functional organization of the nuclear compartment." *Semin Cell Dev Biol.* 21:238-46.
- Ezura Y, Sekiya I, Koga H, Muneta T, Noda M. (2009). "Methylation status of CpG islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells." *Arthritis Rheum.* 60(5):1416–26.
- Falah MA, Rayan A, Srouji S. (2015). "Storage effect on viability and biofunctionality of human adipose tissue-derived stromal cells." *Cytotherapy* 17:1220-9.
- Fan Z, Yamaza T, Lee JS, Yu J, Wang S, Fan G, Shi S, Wang CY. (2009). "BCOR regulates mesenchymal stem cell function by epigenetic mechanisms." *Nat Cell Biol.* 11:1002–9.
- Farini A, Sitzia C, Erratico S, Meregalli M, Torrente Y. (2014). "Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases." *Stem Cells Int.* 2014:306573.
- Faulk C, Dolinoy DC. (2011). "Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals." *Epigenetics* 6(7):791-7.
- Feng YQ, Li Z, Chu WL, Yu YH, Ma L, Chai JK. (2016). "Study on culture, identification and differentiation of primary rat skeletal muscle satellite cells." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 96(12):971-4
- Fernández Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, Otaegui J, Chasseing NA. (2013). "Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved?" *Differentiation.* 85(1-2):1-10.
- Fouse SD, Shen Y, Pellegrini M, Cole S, Meissner A, Van Neste L, Jaenisch R, Fan G. (2008). "Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene

regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation." *Cell Stem Cell*. 2(2):160–9.

Frontera WR, Ochala J. (2015). "Skeletal muscle: a brief review of structure and function." *Calcif Tissue Int*. 96(3):183-95.

Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE. (2002). "Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression." *Nat Genet*. 31:175–179.

Gardin C, Bressan E, Ferroni L, Nalesso E, Vindigni V, Stellini E, Pinton P, Sivoletta S, Zavan B. (2012). "In vitro concurrent endothelial and osteogenic commitment of adipose-derived stem cells and their genetical analyses through comparative genomic hybridization array: novel strategies to increase the successful engraftment of tissue-engineered bone grafts." *Stem Cells Dev*. 21(5):767-77.

Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. (2009). "Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial." *Dis Colon Rectum*. 52(1):79-86.

Gazit Z, Pelled G, Sheyn D, Kimelman N, Gazit D. (2014). "Mesenchymal Stem Cells." In: *Essentials of Stem Cell Biology*. Edit Lanza & Atala, 19:255-66.

Gazit, Z, Pelled G, Sheyn D, Kimelman N, Gazit D. (2011). "Mesenchymal Stem Cells." In: *Principles of Regenerative Medicine*. Edit Atala, Lanza, Thomson & Nerem, 17:285-304.

Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Eslaminejad MB, Batavani R, Ghasemzadeh-Hasankolaei M. (2015). "Male and female rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells are different in terms of the expression of germ cell specific genes." *Anat Sci Int*. 90(3):187-96.

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." *Circ Res*. 100(9):1249-60.

- González S, Aguilera S, Urzúa U, Quest AF, Molina C, Alliende C, Hermoso M, González MJ. (2011). "Mechanotransduction and epigenetic control in autoimmune diseases." *Autoimmun Rev.* 10(3):175-9.
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M. (2000). "Regulation of contraction in striated muscle." *Physiol Rev.* 80(2):853-924.
- Griffith JS, Mahler HR. (1969). "DNA ticketing theory of memory." *Nature.* 223(5206):580-2.
- Grunau C, Hindermann W, Rosenthal A. (2000). "Large-scale methylation analysis of human genomic DNA reveals tissue-specific differences between the methylation profiles of genes and pseudogenes." *Hum Mol Genet.* 9(18):2651-63.
- Guha AK, Singh S, Kumaresan R, Nayar S, Sinha A. (2009). "Mesenchymal cell response to nanosized biphasic calcium phosphate composites." *Colloids Surf B Biointerfaces.* 73(1):146-51.
- Guilak F, Estes BT, Diekman BO, Moutos FT, Gimple JM. (2010). "2010 Nicolas Andry Award: Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering." *Clin Orthop Relat Res.* 468(9): 2530-40.
- Gurel PS, Hatch AL, Higgs HN. (2014). "Connecting the cytoskeleton to the endoplasmic reticulum and Golgi." *Curr Biol.* 24(14):R660-72.
- Gurumurthy B, Bierdeman PC, Janorkar AV. (2016). "Composition of elastin like polypeptide-collagen composite scaffold influences in vitro osteogenic activity of human adipose derived stem cells." *Dent Mater.* 32(10):1270-80.
- Hamade E, Azzar G, Radisson J, Buchet R, Roux B. (2003). "Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro." *Eur J Biochem.* 270(9):2082-90.
- Han DS, Chang HK, Kim KR, Woo SM. (2014). "Consideration of bone regeneration effect of stem cells: comparison of bone regeneration

- between bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells." *J Craniofac Surg.* 25(1):196-201.
- Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, Edsall LE, Kuan S, Luu Y, Klugman S, Antosiewicz-Bourget J, Ye Z, Espinoza C, Agarwahl S, Shen L, Ruotti V, Wang W, Stewart R, Thomson JA, Ecker JR, Ren B. (2010). "Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells." *Cell Stem Cell.* 6(5):479–91.
- Hemming S, Cakouros D, Isenmann S, Cooper L, Menicanin D, Zannettino A, Gronthos S. (2014). "EZHZ and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification." *Stem Cells.* 32(3):802–15.
- Hoffman RBE, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave PG, Livingstone C. (2013). "Growth factors, Cytokines, and the Control of Hematopoiesis." In: *Hematology: Basic principles and practice* Philadelphia, p 139-54. ISBN: 9781455740413.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." *Nat Med.* 5:309–313.
- Huang B, Li G, Jiang XH. (2015). "Fate determination in mesenchymal stem cells: A perspective from histone-modifying enzymes." *Stem Cell Res Ther.* 6:35.
- Huang GS, Tseng TC, Dai NT, Fu KY, Dai LG, Hsu S. (2015). "Fast isolation and expansion of multipotent cells from adipose tissue based on chitosan-selected primary culture." *Biomaterials* 65:154-162.
- Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. (2010). "MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation." *Stem Cells.* 28(2):357–364.
- Im GI, Shin KJ. (2015). "Epigenetic approaches to regeneration of bone and cartilage from stem cells." *Expert Opin Biol Ther.* 15(2):181-93.

- Imamura T, Ohgane J, Ito S, Ogawa T, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. (2001). "CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene: tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons." *Genomics*. 76(1-3):117-25.
- Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. (2002). "A stem cell molecular signature." *Science*. 298(5593):601-4.
- Ishida O, Hagino I, Nagaya N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y, Mori H, Yagihara T. (2015). "Adipose-derived stem cell sheet transplantation therapy in a porcine model of chronic heart failure." *Transl Res*. 165(5):631-9.
- Jeronimo C, Henrique R. (2014). "Epigenetic biomarkers in urological tumors: A systematic review." *Cancer Lett*. 342(2):264-274.
- Jung JW, Lee S, Seo MS, Park SB, Kurtz A, Kang SK, Kang KS. (2010). "Histone deacetylase controls adult stem cell aging by balancing the expression of polycomb genes and jumonji domain containing 3." *Cell Mol Life Sci* 67:1165–1176.
- Kaludov NK, Wolffe AP. (2000). "MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery." *Nucleic Acids Res*. 28(9): 1921–28.
- Kan CF, Singh AB, Stafforini DM, Azhar S, Liu J. (2014). "Arachidonic acid down regulates acyl-CoA synthetase 4 expression by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation." *J Lipid Res*. 55(8):1657-67.
- Kassen M, Abdallah BM. (2008). "Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases." *Cell Tissue Res*. 331(1):157-63.
- Kato K, Nakajima K, Ui A, Muto-Terao Y, Ogiwara H, Nakada S. (2014). "Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNAr repair pathway choice." *Mol Cell*. 53(4): 617-30.

- Kazama T, Fujie M, Endo T, Kano K. (2008). "Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro." *Biochem Biophys Res Commun.* 377(3):780-5.
- Keating A. (2006). "Mesenchymal stromal cells." *Curr Opin Hematol.* 13(6):419-25.
- Keire P, Shearer A, Shefer G, Yablonka-Reuveni Z. (2013). "Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells." *Methods Mol Biol.* 946:431-68.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue." *Stem Cells.* 24(5):1294-301.
- Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, Telkabadi M, Atashi A, Honardoost M, Zali MR, Soleimani M. (2009). "Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial." *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 21(10):1199-205.
- Kokai LE, Marra K, Rubin JP. (2014). "Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration." *Transl Res.* 163(4):399-408.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. (2007). "Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation." *Arthritis Res Ther.* 1(9):204-13.
- Kotobuki N, Hirore M, Takakura Y, Ohgushi H. (2004) "Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow." *Artif Organs.* 28(1):33-9.
- Kouzarides T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell.* 128(4):693-705.
- Kovacevic A, Hammer A, Stadelmeyer E, Windischhofer W, Sundl M, Ray A, Schweighofer N, Friedl G, Windhager R, Sattler W, Malle E. (2008).

- “Expression of serum amyloid A transcripts in human bone tissues, differentiated osteoblast-like stem cells and human osteosarcoma cell lines.” *J Cell Biochem.* 103(3):994-1004.
- Kunter U, Floege J. (2011). “Potential Risks of Stem Cells Therapies.” *Regenerative Nephrology Chapter 23*:361-387.
- Kyllönen L, Haimi S, Mannerström B, Huhtala H, Rajala KM, Skottman H, Sándor GK, Miettinen S. (2013). “Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro.” *Stem Cell Res Ther.* 4(1):17.
- LaBarge MA, Blau HM. (2002). “Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury.” *Cell.* 111(4):589-601.
- Lagarkova MA, Volchkov PY, Lyakisheva AV, Philonenko ES, Kiselev SL. (2006). “Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines.” *Cell Cycle.* 5(4):416-20.
- Lakshmipathy U, Verfaillie C. (2005). “Stem cell plasticity.” *Blood Rev.* 19(1):29-38.
- Lafforgue P. (2010). “Mesenchymal stem cells: a new biotherapy for bone disease?” *Joint Bone Spine.* 77(2):99-101.
- Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR Jr, Moseley AB, Bacigalupo A. (2005). “Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients.” *Biol Blood Marrow Transplant.* 11(5):389-98.
- Lee JH, Kemp DM. (2006). “Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions.” *Biochem Biophys Res Commun.* 341(3):882-8.
- Leedham SJ, Wright NA. (2008). “Expansion of a mutated clone: from stem cell to tumour.” *J Clin Pathol.* 61(2):164-71.

- Leiva A, Oliva W, Navas P. (2015). "Diferenciación de la célula madre derivada de tejido adiposo a estirpe ósea." *Rev S And Traum y Ort.* 33(2/2):31-40.
- Leong DT, Khor WM, Chew FT, Lim TC, Hutmacher DW. (2006). "Characterization of osteogenically induced adipose tissue-derived precursor cells in 2-dimensional and 3-dimensional environments." *Cells Tissues Organs.* 182(1):1-11.
- Levi B, James AW, Glotzbach JP, Wan DC, Commons GW, Longaker MT. (2010). "Depot-specific variation in the osteogenic and adipogenic potential of human adipose-derived stromal cells." *Plast Reconstr Surg.* 126(3):822-34.
- Li H, Xu Y, Fu Q, Li C. (2012). "Effects of multiple agents on epithelial differentiation of rabbit adipose-derived stem cells in 3D culture." *Tissue Eng Part A.* 18(17-18):1760-70.
- Liao X, Zhou X, Mak NK, Leung KN. (2013). "Tryptanthrin inhibits angiogenesis by targeting the VEGFR2-mediated ERK1/2 signalling pathway." *PLoS One.* 8(12):e82294.
- Liloglou T, Bediaga NG, Brown BR, Field JK, Davies MP. (2014). "Epigenetic biomarkers in lung cancer." *Cancer Lett.* 342(2):200-12.
- Li Z, Liu C, Xie Z, Song P, Zhao RC, Guo L, Liu Z, Wu Y. (2011). "Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation." *PLoS One.* 6(6):e20526.
- Lindroos B, Aho KL, Kuokkanen H, Rätty S, Huhtala H, Lemponen R, Yli-Harja O, Suuronen R, Miettinen S. (2010). "Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum." *Tissue Eng Part A.* 16(7):2281-94.
- Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. (2011). "The potential of adipose stem cells in regenerative medicine." *Stem Cell Rev.* 7(2):269-91.

- Locke M, Feisst V, Dunbar PR. (2011). "Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need." *Stem Cells*. 29(3):404-11.
- Londoño C, Büscher D, Bereza A, Abad JL, Camarillo E. (2008). "Obtención de células madre immortalizadas derivadas de lipoaspirado para su diferenciación hacia diferentes linajes." *IFMBE Proceedings*. 18: 667–70.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature*. 389(6648):251-60.
- Lunyak VV, Rosenfeld MG. (2008). "Epigenetic regulation of stem cell fate." *Hum Mol Genet*. 17(R1):R28-36.
- Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. (2009). "Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial." *Bone Marrow Transplant*. 43:447–454.
- Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzmán P. (2003). "Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation." *Arch Med Res*. 34(6):476-88.
- McCormick RK. (2007). "Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility." *Altern Med Rev*. 12(2):113-45.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. (2008). "Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells." *Nature*. 454(7205):766-70.
- Mera C, Roa A, Ramírez S. (2007). "Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación." *Rev Cienc Salud*. 5(1):67-89.

- Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. (2014). "DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos." *Genes Dev* 28(8): 812-828.
- Min M, Mayor U, Dittmar G, Lindon C. (2014). "Using in vivo-biotinylated ubiquitin to describe a mitotic exit ubiquitome from human cells." *Mol Cell Proteomics*. 13(9):2411-25.
- Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. (2012). "Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine." *Stem Cells*. 30(5):804-10.
- Mizuno H. (2010). "The potential for treatment of skeletal muscle disorders with adipose-derived stem cells." *Curr Stem Cell Res Ther*. 5(2):133-6.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. (2002). "Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells." *Plast Reconstr Surg*. 109(1):199-209; discussion 210-1.
- Mummery C. (2004). "Solace for the broken hearted?" *Nature*. 433:585-587.
- Montecinos BR, Zeni SN. (2009). "Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica." *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 43(2) 177-93.
- Morgani SM, Canham MA, Nichols J, Sharov AA, Migueles RP, Ko MS, Brickman JM. (2013). "Totipotent Embryonic Stem Cells Arise in Ground-State Culture Conditions." *Cell Rep*. 3(6): 1945-1957.
- Mokry J, Pisal R. (2015). "The Basic Principles of Stem Cells." In: *Stem Cells Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Edited: Vishwakarma A, Sharpe P, Songtao S, Ramalingam M. pp: 237-248. ISBN: 978-0-12-397157-9
- Mundy GR, Sterling JA. (1996). "Bone-Resorbing Cells." In: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Edited: Rosen, J.C. ISBN: 978-1-118-45388-9.
- Nakajima H. (2011). "Role of transcription factors in differentiation and reprogramming of hematopoietic cells." *Keio J Med*. 60(2):47-55.

- Nardi NB, Da-Silva L. (2006). "Mesenchymal stem cells: Isolation in vitro expansion and characterization." *Handb Exp Pharmacol.* 174:249-82.
- Neissa JI, Guerrero C. (2004). "Del Código Genético al Código Epigenético: Nuevas Estrategias Terapéuticas." *Rev Fac Med Univ Nac Colomb.* 4(52):395-401.
- Nikitina T, Wang D, Gomberg M, Grigoryev SA, Zhurkin VB. (2013). "Combined micrococcal nuclease and exonuclease III digestion reveals precise positions of the nucleosome core/linker junctions: implications for high-resolution nucleosome mapping." *J Mol Biol.* 425(11): 1946-60.
- Ning H, Yang F, Jiang M, et al. (2008). "The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study." *Leukemia.* 22:593–599.
- Nowsheen S, Aziz K, Tran PT, Gorgoulis VG, Yang ES, Georgakilas AG. (2014). "Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer." *Cancer Lett.* 342(2): 213-22.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." *Nat Rev Immunol.* 11(2):85-97.
- Pak J. (2011). "Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series." *J Med Case Rep.* 5:296.
- Palacios-González C, Harris J, Testa G. (2014). "Multiplex parenting: IVG and the generations to come." *J Med Ethics.* 40(11):752-8.
- Park S, Choi Y, Jung N, Yu Y, Ryu KH, Kim HS, Jo I, Choi BO, Jung SC. (2016). "Myogenic differentiation potential of human tonsil-derived mesenchymal stem cells and their potential for use to promote skeletal muscle regeneration." *Int J Mol Med.* 37(5):1209-20.
- Pavyde E, Usas A, Maciulaitis R. (2016). "Regenerative pharmacology for the treatment of acute kidney injury: skeletal muscle stem/progenitor cells for renal regeneration?" *Pharmacol Res.* 113:802-7.

- Pearson H. (2006). "Stem-cell tagging shows flaws." *Nature* 439:519-523.
- Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowicz AM, García AJ. (2006). "Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by runx2/cbfa1 serine phosphorylation." *J Cell Sci.* 119(3):581-91.
- Plasschaert RN, Bartolomei MS. (2014). "Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells." *Development.* 141(9):1805-13.
- Posfai E, Tam OH, Rossant J. (2014). "Mechanisms of pluripotency in vivo and in vitro." *Curr Top Dev Biol* 107:1-37.
- Pozharny Y, Lambertini L, Ma Y, Ferrara L, Litton CG, Diplas A, Jacobs AR, Chen J, Stone JL, Wetmur J, Lee MJ. (2010). "Genomic loss of imprinting in first-trimester human placenta." *Am J Obstet Gynecol.* 202(4):391-8.
- Prochazkova M, Chavez MG, Prochazka J, Felfy H, Mushegyan V, Klein OD. (2015). "Embryonic versus adult stem cells." *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* 18:249-262.
- Prósper F, Gavira JJ, Herreros J, Rábago G, Luquin R, Moreno J, Robles JE. (2006). "Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre." *Ant Sist Sanit Navar.* 29(Suppl2):219-234.
- Quan L, Wang Y, Liang J, Qiu T, Wang H, Zhang Y, Zhang Y, Hui Q, Tao K. (2016). "Screening for genes, transcription factors and miRNAs associated with the myogenic and osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells." *Int J Mol Med.* 2016 Oct 25. doi: 10.3892/ijmm.2016.2788. [Epub ahead of print].
- Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. (2002). "Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration." *J Cell Biol.* 157(5):851-64.

- Queller DC. (2003). "Theory of genomic imprinting conflict in social insects." *BMC Evol Biol.* 3:15.
- Radford EJ, Ferrón SR, Ferguson-Smith AC. (2011). "Genomic imprinting as an adaptative model of developmental plasticity." *FEBS Lett.* 13(585): 2059-66.
- Ramírez-Espinosa JJ, González-Dávalos L, Shimada A, Piña E, Varela-Echavarría A, Mora O. (2016). "Bovine (*Bos taurus*) Bone Marrow Mesenchymal Cell Differentiation to Adipogenic and Myogenic Lineages." *Cells Tissues Organs.* 201(1):51-64.
- Rasmusson I. (2006). "Immune modulation by mesenchymal stem cells." *Exp Cell Res.* 12(312):2169-79.
- Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD, Pfeifer GP. (2009). "A human B cell methylome at 100-base pair resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(3):671-8.
- Razin A, Riggs AD. (1980). "DNA methylation and gene function." *Science.* 210(4470):604-10.
- Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. (2008). "Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue." *Exp Biol Med (Maywood).* 233(7):901-13.
- Reik W. (2007). "Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development." *Nature.* 447(7143):425-32.
- Reynolds J, Lamba DA. (2014). "Human embryonic stem cell applications for retinal degenerations." *Experimental Eye Research.* 123:151-60.
- Riggs AD. (1975). "X inactivation, differentiation, and DNA methylation." *Cytogenet Cell Genet.* 14(1):9-25.
- Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. (2002). "Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs." *Naturwissenschaften.* 89(8):338-51.
- Riordan NH, Ichim TE, Min WP, Wang H, Solano F, Lara F, Alfaro M, Rodriguez JP, Harman RJ, Patel AN, Murphy MP, Lee RR, Minev B. (2009). "Non-

- expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis." *J Transl Med.* 24;7:29.
- Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C. (2005). "Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse." *J Exp Med.* 201(9):1397-405.
- Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. (2004). "DNA methylation: an epigenetic process of medical importance." *Rev Invest Clin.* 56(1):56-71.
- Rosen ED. (2005). "The transcriptional basis of adipocyte development." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73(1):31-4.
- Ross MH, Pawlina W. (2013). *Histología (eBook online) Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.* pp. 996. EAN: 9789500606646.
- Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. (2004). "Circulating mesenchymal stem cells." *Int J Biochem Cell Biol.* 36(4):585-97.
- Rutenberg MS, Hamazaki T, Singh AM, Terada N. (2004). "Stem cell plasticity, beyond alchemy." *Int J Hematol.* 79(1):15-21.
- Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, Khochbin S. (2011). "The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm." *J Biomed Biotechnol.* 2011: 970382.
- Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. (2010). "Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes." *Obesity (Silver Spring).* 18(5):884-9.
- Sajnani-Perez G, Chilton JK, Aricescu AR, Haj F, Stoker AW. (2003). "Isoform-specific binding of the tyrosine phosphatase PTPsigma to a ligand in developing muscle." *Mol Cell Neurosci.* 22(1):37-48.
- Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. (2003). "Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome." *Genomics* 82(3):323-30.
- Schmittwolf C, Kirchhof N, Jauch A, Dürr M, Harder F, Zenke M, Müller AM. (2005). "In vivo haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents." *EMBO J.* 24(3):554-66.

- Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Force Aldred S, Fedorov Y. (2009). "Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells." *PLoS One*. 4(5):e5605.
- Seibel MJ. (2006). "Biochemical markers of bone turnover part II: clinical applications in the management of osteoporosis." *Clin Biochem Rev*. 27(3):123-38.
- Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N. (2011). "A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue." *Biotechnol Lett*. 33:1257-64.
- Shao X, Zhang C, Sun MA, Lu X, Xie H. (2014). "Deciphering the heterogeneity in DNA methylation patterns during stem cell differentiation and reprogramming." *BMC Genomics*. 15:978.
- Shen J, Hovhannisyanyan H, Lian JB, Montecino MA, Stein GS, Stein JL, Van Wijnen AJ. (2003). "Transcriptional induction of the osteocalcin gene during osteoblast differentiation involves acetylation of histones H3 and H4." *Mol Endocrinol*. 17:743–56.
- Shipunova NN, Petinati NA, Drize NI. (2013). "Effect of hydrocortisone on multipotent human mesenchymal stromal cells." *Bull Exp Biol Med*. 155(1):159-63.
- Slack JM. (2000). "Stem cells in epithelial tissues." *Science*. 287(5457):1431-3.
- So AY, Jung JW, Lee S, Kim HS, Kang KS. (2011). "DNA methyltransferase controls stem cell aging by regulating BMI1 and EZH2 through microRNAs." *PLoS One*. 6(5):e19503.
- Song Y, Wang XF, Wang YG, Sun YC, Lv PJ. (2016). "Osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells-biomaterial mixture in vivo after 3D bio-printing." *Beijing Da Xue Xue Bao*. 48(1):45-50.
- Spitkovsky D, Hescheler J. (2008). "Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications." *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 17(2):79-90.

- Squillaro T, Severino V, Alessio N, Farina A, Di Bernardo G, Cipollaro M, Peluso G, Chambery A, Galderisi U. (2015). "De-regulated expression of the BRG1 chromatin remodeling factor in bone marrow mesenchymal stromal cells induces senescence associated with the silencing of NANOG and changes in the levels of chromatin proteins." *Cell Cycle*. 14(8):1315-26.
- Stancheva I, Schirmer EC. (2014). "Nuclear envelope: connecting structural genome organization to regulation of gene expression." *Adv Exp Med Biol*. 773:209-44.
- Stemers FJ, Chang W, Lee G, Barker DL, Shen R, Gunderson KL. (2006). "Whole-genome genotyping with the single-base extension assay." *Nat Methods*. 3(1):31-3.
- Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Juritz S, Birk R, Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Schultz J, Hörmann K, Kinscherf R, Faber A. (2014). "Evaluation of the effects of different culture media on the myogenic differentiation potential of adipose tissue- or bone marrow-derived human mesenchymal stem cells." *Int J Mol Med*. 33(1):160-70.
- Stevens M, Cheng JB, Li D, Xie M, Hong C, Maire CL, Ligon KL, Hirst M, Marra MA, Costello JF, Wang T. (2013). "Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods." *Genome Res*. 23(9): 1541-53.
- Stochaj U, Kodiha M, Shum-Tim D, Colmegna I. (2013). "Implications of multipotent mesenchymal stromal cell aging." *Regen Med*. 8(2):211-22.
- Summer R, Fine A. (2008). "Mesenchymal progenitor cell research. Limitations and Recommendations" *Proc Am Thorac Soc*. 5(6):707-10.
- Sung MS, Mun JY, Kwon O, Kwon KS, Oh DB. (2013). "Efficient myogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by the transduction of engineered MyoD protein." *Biochem Biophys Res Commun*. 437(1):156-61.
- Szilvassy SJ. (2003). "The Biology of hematopoietic stem cells." *Arch Med Res* 34: 446-60.

- Thomson T, Lin H. (2009). "The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect." *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:355-76.
- Tome M, Lopez-Romero P, Albo C, Sepulveda JC, Fernandez-Gutierrez B, Dopazo A, Bernad A, Gonzalez MA. (2011). "MiR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells." *Cell Death Differ.* 18(6):985–95.
- Toyoda M, Matsubara Y, Lin K, Sugimachi K, Furue M. (2009). "Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues." *Cell Biochem Funct.* 27(7):440-7.
- Trohatou O, Zagoura D, Bitsika V, Pappa KI, Antsaklis A, Anagnou NP, Roubelakis MG. (2014). "Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties." *Stem Cells Transl Med.* 3(1):54-68.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. (2003). "Characterization of multipotential progenitor cells derived from human trabecular bone." *Stem Cells*21: 681-93.
- Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Lin H. (2009). "MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation." *J Biol Chem.* 284(10):6507-19.
- Urduinguio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. (2009). "Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies." *Lancet Neurol.* 8(11):1056-72.
- van Camp JK, Beckers S, Zegers D, Van Hul W. (2014). "Wnt signaling and the control of human stem cell fate." *Stem Cell Rev.* 10(2):207-29.
- van Esterik FA, Zandieh-Doulabi B, Kleverlaan CJ, Klein-Nulend J. (2016). "Enhanced Osteogenic and Vasculogenic Differentiation Potential of Human Adipose Stem Cells on Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds in Fibrin Gels." *Stem Cells Int.* 2016:1934270.

- Vater C, Kasten P, Stiehler M. (2011). "Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells." *Acta Biomater.* 7(2):463-77.
- Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R, Polak JM. (2005). "Stem cells." *Lancet.* 366(9485):592-602.
- Vlahopoulos S, Zimmer WE, Jenster G, Belaguli NS, Balk SP, Brinkmann AO, Lanz RB, Zoumpourlis VC, Schwartz RJ. (2005). "Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene." *J Biol Chem.* 280(9):7786-92.
- Waddington CH. (2012). "The epigenotype. 1942." *Int J Epidemiol* 41(1):10-3.
- Wagers AJ, Weissman IL. (2004). "Plasticity of adult stem cells." *Cell.* 116(5):639-48.
- Wagner W. (2012). "Implications of long-term culture for mesenchymal stem cells: Genetic defects or epigenetic regulation?" *Stem Cell Res Ther.* 3(6):54.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. (2005). "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood." *Exp Hematol.* 33(11):1402-1416.
- Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. (2004). "Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports." *Cell Transplant.* 13:595–600.
- Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. (2002). "Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees." *Osteoarthritis Cartilage.* 10(3):199-206.
- Wang H, Jiang M, Bi H, Chen X, He L, Li X, Wu J. (2014). "Conversion of female germline stem cells from neonatal and prepubertal mice into pluripotent stem cells." *J Mol Cell Biol.* 6(2):164-71.

- Wang XF, Lv PJ, Song Y, Wang Y, Sun YC. (2015). "Short-term effect of CaCl₂ on human adipose-derived mesenchymal stem cells proliferation and osteogenic differentiation." *Beijing Da Xue Xue Bao.* 47(6):971-6.
- Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. (2016). "Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering." *Stem Cells Int.* 2016:3206807.
- Wei Y, Chen YH, Li LY, Lang J, Yeh SP, Shi B, Yang CC, Yang JY, Lin CY, Lai CC, Hung MC. (2011). "CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." *Nat Cell Biol.* 13(1):87–94.
- Weijers EM, Van Den Broek LJ, Waaijman T, Van Hinsbergh VW, Gibbs S, Koolwijk P. (2011). "The influence of hypoxia and fibrinogen variants on the expansion and differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells." *Tissue Eng Part A.* 17(21-22):2675-85.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. (2001). "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations." *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:387-403.
- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. (2003). "Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal «stem» cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not." *Br J Haematol.* 121(2):368-374.
- Wilkins JF, Úbeda F. (2011). "Diseases associated with genomic imprinting." *Prog Mol Biol Transl Sci.* 101:401-45.
- Wilting RH, Dannenberg JH. (2012). "Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance." *Drug Resist Updat.* 15(1-2):21-38.
- Woo DH, Hwang HS, Shim JH. (2016). "Comparison of adult stem cells derived from multiple stem cell niches." *Biotechnol Lett.* 38(5):751-9.

- Wu H, Ren Y, Li S, Wang W, Yuan J, Guo X, Liu D, Cang M. (2012). "In vitro culture and induced differentiation of sheep skeletal muscle satellite cells." *Cell Biol Int.* 36(6):579-87.
- Wu Q, Ma Q, Shehadeh LA, Wilson A, Xia L, Yu H, Webster KA. (2010). "Expression of the Argonaute protein PiwiL2 and piRNAs in adult mouse mesenchymal stem cells." *Biochem Biophys Res Commun.* 396(4):915-20.
- Wutz A. (2013). "Epigenetic regulation of stem cells: The role of chromatin in cell differentiation." *Adv Exp Med Biol.* 786:307–328.
- Yablonka-Reuveni Z, Seifert RA. (1993). "Proliferation of chicken myoblasts is regulated by specific isoforms of platelet-derived growth factor: evidence for differences between myoblasts from mid and late stages of embryogenesis." *Dev Biol.* 156(2):307-18.
- Yamaguchi DT. (2014). "'Ins" and "Outs" of mesenchymal stem cell osteogenesis in regenerative medicine." *World J Stem Cells.* 6(2):94-110.
- Yamout B, Hourani R, Salti H, Barada W, El-Hajj T, Al-Kutoubi A, Herlopian A, Baz EK, Mahfouz R, Khalil-Hamdan R, Kreidieh NM, El-Sabban M, Bazarbachi A. (2010). "Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study." *J Neuroimmunol.* 227(1-2):185-9.
- Yu KR, Kang KS. (2013). "Aging-related genes in mesenchymal stem cells: a mini-review." *Gerontology.* 59(6):557-63.
- Yuan Q, Zeng X, Chen L, Peng E, Ye Z. (2010). "Comparison of myogenic differentiation ability of adipose-derived stem cells from different sites in rabbit." *ZhongguoXiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 24(10):1228-32.
- Younesi E, Bayati V, Hashemitabar M, Azandeh SS, Bijannejad D, Bahreini A. (2015). "Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells: fetal bovine serum or human serum?" *Anat Cell Biol.* 48(3):170–6.

- Xi J, Liu Y, Liu H, Chen H, Emborg ME, Zhang SC. (2012). "Specification of midbrain dopamine neurons from primate pluripotent stem cells." *Stem Cells*. 30(8):1655-63.
- Zambon JP, Siqueira L, Sawaki AN, Duailibi S, Leite K, Magalhaes RS, Orlando G, Ross CL, Peloso A, Almeida F. (2014). "Histological changes induced by Polyglycolic-Acid (PGA) scaffolds seeded with autologous adipose or muscle-derived stem cells when implanted on rabbit bladder." *Organogenesis*. 10(2):278-288.
- Zang S, Zhuo Q, Chang X, Qiu G, Wu Z, Yang G. (2014)." Study of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (HASCs) on bacterial cellulose." *Carbohydr Polym*. 104:158-65.
- Zeinaloo A, Zanjani KS, Bagheri MM, Mohyeddin-Bonab M, Monajemzadeh M, Arjmandnia MH. (2011). "Intracoronary administration of autologous mesenchymal stem cells in a critically ill patient with dilated cardiomyopathy." *Pediatr Transplant*. 15(8):E183-6.
- Zeng G, Lai K, Li J, Zou Y, Huang H, Liang J, Tang X, Wei J, Zhang P. (2013). "A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived stem cells." *Organogenesis*. 9(4):287-95.
- Zhai L, Wang L, Teng F, Zhou L, Zhang W, Xiao J, Liu Y, Deng W. (2016). "Argonaute and Argonaute-Bound Small RNAs in Stem Cells." *Int J Mol Sci*. 17(2),208.
- Zhang F, Deng B, Wen J, Chen K, Liu W, Ye S, Huang H, Jiang S, Xiong Y. (2015). "PPAR γ and MyoD are differentially regulated by myostatin in adipose-derived stem cells and muscle satellite cells." *Biochem Biophys Res Commun*. 458(2):375-80.
- Zhang H, Zhu YQ, Wu YQ, Zhang P, Qi J. (2014). "Detection of promoter hypermethylation of Wnt antagonist genes in fecal samples for diagnosis of early colorectal cancer." *World J Gastroenterol*. 20(20): 6329-35.
- Zhang JF, FuWM, He ML, XieWD, Lv Q,Wan G, Li G, Wang H, Lu G, Hu X, Jiang S, Li JN, Lin MC, Zhang YO, Kung HF. (2011). "MiRNA-20a

promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling.” *RNA Biol* 8(5):829–38.

Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, Donnenberg AD. (2010). “Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue.” *Cytometry A*. 77(1):22-30.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002). “Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.” *Mol Biol Cell*. 13(12):4279-95.

(<http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1.asp>)

(<http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-13.-envejecimiento-musculo-esqueletico/13.2-remodelacion-osea>)

El doctorando Inmaculada Zafra Camacho y los directores de la tesis Consolación Melguizo Alonso, Jose Carlos Prados Salazar y Ana Rosa Rama Ballesteros, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

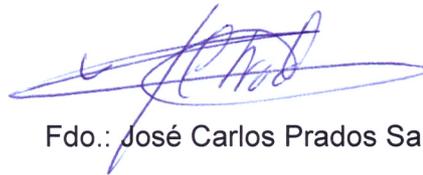
Granada, a 25 de Noviembre de 2016

Director/es de la Tesis



Fdo.: Consolación Melguizo Alonso

Director/es de la Tesis



Fdo.: José Carlos Prados Salazar



Director/es de la Tesis

Fdo.: Ana Rosa Rama Ballesteros



Doctorando

Fdo.: Inmaculada Zafra Camacho